

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Isabela Rios da Silva

**Avaliação morfométrica do colágeno total, tipo I e tipo III e análise da expressão *in situ*
de citocinas em queloides**

Uberaba - MG
2017

Isabela Rios da Silva

Avaliação morfométrica do colágeno total, tipo I e tipo III e análise da expressão *in situ* de citocinas em queloides

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Bertulucci Rocha Rodrigues
Coorientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

UBERABA - MG
2017

Ficha Catalográfica

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

S58a Silva, Isabela Rios da
Avaliação morfométrica do colágeno total, tipo I e tipo III e análise da
expressão *in situ* de citocinas em queloides / Isabela Rios da Silva. -- 2017.
69 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues
Coorientador: Dr. Virmondes Rodrigues Júnior

1. Pele. 2. Queloides. 3. Colágeno. 4. Citocinas. I. Rodrigues, Denise
Bertulucci Rocha. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III.
Título.

CDU 616.5

Isabela Rios da Silva

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO TOTAL, TIPO I E TIPO III E
ANÁLISE DA EXPRESSÃO *IN SITU* DE CITOCINAS EM QUELOIDES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Uberaba-MG, 10 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora:

Profª Drª Denise Bertulucci Rocha Rodrigues - Orientadora

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profª Drª Marlene Antônia dos Reis

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profª Drª Livia Ferreira Oliveira

Universidade Federal de Uberlândia

Por todo amor, carinho e incentivo durante esta caminhada, dedico este trabalho aos meus pais Roberto e Julcimara; aos meus avós Neuza, Eurípedes e Cora; e ao meu noivo Mousar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me mostrar em cada momento sua presença e o quanto é importante ter fé.

Aos meus queridos pais **Roberto e Julcimara**, pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e não medirem esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Obrigada por terem me ensinado a praticar os bons valores e por me indicarem o caminho mais correto.

Agradeço aos meus avós, **Neuza, Eurípedes e Cora**, por me receberem sempre de braços abertos, por me mostrarem a simplicidade e a beleza do amor entre avós e netos e por caminharem comigo nesta jornada.

Ao meu amado noivo **Mousar**, por todos esses anos de companheirismo, amizade, carinho e por sempre me incentivar nos momentos mais difíceis. Obrigada por todo o amor e por estar sempre presente ao meu lado.

À minha querida Orientadora **Denise**, por acreditar no meu potencial, por ser esta professora maravilhosa que se tornou uma amiga e por me dar a oportunidade de conhecer esse mundo complexo e apaixonante da pesquisa.

Ao meu coorientador **Virmondés** por todos os momentos que me recebeu com toda atenção e por não medir esforços para repassar seus conhecimentos.

À minha amiga **Poliana**, pela confiança, oportunidade e por ter me possibilitado conhecer este mundo novo.

Aos amigos da cirurgia plástica **Dr. Manoel, Dr. Thomaz, Dr. Vinícius, Dr. Ivan, Dr. Aloísio, Nilza, Sônia e Irina** pelos maravilhosos momentos vividos no ambulatório de queiloide, por todo o carinho com que me receberam e por se tornarem além de colegas de trabalho, amigos tão queridos.

À **Dra. Luciana**, por ter me recebido de braços abertos no ambulatório, pela amizade, por todos os ensinamentos trocados e por ser essa médica maravilhosa que não mede esforços para proporcionar o bem-estar aos seus pacientes.

Agradeço as amigas da Patologia Geral, **Crislaine, Mariana, Bianca, Liliane, Laura Aguiar, Luanna e Maria Helena** por serem meu porto seguro, por me ajudarem e me acolherem desde o início da minha caminhada na pós-graduação. Por serem fiéis, compreensivas e por se tornarem minhas amigas do coração dentro e fora da instituição.

Aos **professores** credenciados na pós-graduação pelos ensinamentos e convivência durante as disciplinas cursadas.

À minha amiga **Rayane**, por todo o trabalho realizado, ensinamentos, auxílio nas técnicas histológicas e por ter me presenteado com sua amizade durante esta caminhada.

À minha amiga **Danila**, por me ajudar desde o início e por ter se tornado tão especial e companheira.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, **Ton, Djalma, Mariana, Christiane, Ana Carolina, Jonatas, Lucila, Lorena, Maria, João Paulo, Cleyson, Guilherme, Cecília,**

Rodolfo, Siomar e César por todos os momentos de alegrias, troca de informações e conhecimentos e por se me acolherem nesta grande família.

Ao querido **Marcos Vinicius**, por me acolher com tanto carinho no laboratório e por não medir esforços para me ensinar e compartilhar seus conhecimentos. Por ser essa pessoa tão admirável que me presenteou com sua amizade sincera.

As técnicas do laboratório de Imunologia, **Mônica e Betania**, pelas conversas, carinho, por me ajudarem sempre e por cuidarem tão bem do laboratório.

Aos secretários da pós-graduação, **Tuânia e André**, pelo belíssimo trabalho desempenhado, por sempre estarem prontos para nos ajudar e sanar todas as nossas dúvidas.

Aos **pacientes**, por nos proporcionarem momentos maravilhosos de troca de informações e de experiências, por nos dar a oportunidade de conhecer mais um pouco sobre suas vidas e poder aprender sempre mais. Sem vocês nada deste trabalho seria possível.

Aos demais **colegas da pós-graduação** pela troca de informações, por me permitir conhecer cada um, aprendendo um pouco com seus projetos e experiências de vida.

Aos **alunos de graduação** pelo respeito e por me ensinarem tanto durante o treinamento didático.

À **Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Universidade de Uberaba (UNIUBE) e a Pós-graduação em Ciências da Saúde (PGCS)** por fornecerem estrutura para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos **Membros da comissão examinadora** da qualificação e defesa por todas as trocas de informações e ensinamentos que serão levados por toda a vida.

E aos **órgãos de fomento** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Campeões não são feitos em academias. Campeões são feitos de algo que eles têm profundamente dentro de si — um desejo, um sonho, uma visão.

Muhammad Ali

Apoio financeiro

O presente trabalho foi realizado com os recursos financeiros da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Os queloides são resultantes de alterações fisiológicas no processo cicatricial. São caracterizados pelo crescimento além das bordas da lesão inicial e pela não regressão espontânea. Seus sinais e sintomas incluem dor, prurido, rubor e enrijecimento local e pode causar desconfortos psicológicos, devido à desfiguração estética muito comum nestas lesões. Caracteriza-se pela deposição excessiva de colágeno e diversas citocinas podem estar contribuindo na fisiopatologia. O objetivo deste estudo foi avaliar através de morfometria as fibras colágenas e analisar *in situ* a expressão das citocinas em lesões de queloides e compará-las ao grupo controle. Um total de 33 pacientes foram acompanhados no ambulatório da cirurgia plástica, tratados com triancinolona 20mg/ml intralesional e encaminhados para excisão da lesão. Os fragmentos foram armazenados em RNA later e em formol tamponado. O grupo controle constituiu-se de 40 fragmentos de cicatriz normal retiradas, em sua maioria, de pacientes secundíparas ou múltíparas durante cesariana. Para a captura de imagens e quantificação das fibras colágenas foram utilizados o sistema Leica Qwin Plus® e Image J®. Os resultados demonstraram uma predominância do sexo feminino (60,60%), etnia não branca (60,60) e descendência negra direta (66,66%). Os queloides apresentaram aumento significativo no colágeno total e tipo III ($p < 0,0001$; $p = 0,0001$). Significativamente, a expressão de mRNA para o TGF- β nos queloides apresentou-se aumentada, a de IFN- γ , IFN- γ R1 e IL-10 foram menores, sem diferença estatística para o IFN- γ R1 e o TNF- α não apresentou diferença significativa ($p < 0,001$; $p = 0,009$; $p = 0,246$; $p = 0,037$; $p = 0,911$) comparados ao grupo controle. Correlações entre colágeno tipo III a expressão de mRNA do TGF- β foram positivas e significativas ($p = 0,001$, $z = 3,210$), do IFN- γ , IFN- γ R1 e IL-10 negativa e significativa ($p = 0,015$, $z = -2,425$; $p = 0,021$, $z = -2,303$; $p = 0,014$, $z = -2,445$) e do TNF- α sem diferença estatística ($p = 0,555$, $z = 0,590$). Dessa forma, com estes resultados, pode-se sugerir que as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias podem estar auxiliando diretamente na patogênese do queleide principalmente ao induzir uma cicatrização mais imatura, com síntese excessiva de colágeno e com contração cicatricial ineficiente. Além disso, o TGF- β parece ser o maior fator de indução da ativação e proliferação dos fibroblastos, sendo um alvo importante de estudos para elucidar a fisiopatologia do queleide.

Palavras-chave: Queloide, Colágeno, Citocinas.

ABSTRACT

Keloids are the result of physiological changes in the healing process. Characterized by growth beyond the borders of the initial lesion and by non-spontaneous regression. Its signs and symptoms include pain, itching, flushing and local stiffness and can cause psychological discomforts due to the aesthetic disfigurement very common in these lesions. It is characterized by the excessive deposition of collagen and several cytokines may be contributing to the pathophysiology. The objective of this study was to evaluate the collagen fibers, analyze in situ expression of cytokines in keloid lesions, and compare to the control group. 33 patients were followed up at the plastic surgery outpatient, treated with triamcinolone 20 mg/ml and referred for excision of the lesion. The fragments were stored in later RNA and buffered formalin. The control group consisted of 40 normal scar fragments taken from secondary or multiparous patients during cesarean section. The Leica Qwin Plus® and Image J® system were used for image capture and quantification of the collagen fibers. The results showed a predominance of women (60.60%), non-white (60.60) and direct black ancestry (66.66%). Keloid showed a significant increase in total and type III collagen ($p < 0.0001$, $p = 0.0001$). Significantly, the expression of mRNA for TGF- β in keloid was increased, the expression of IFN- γ , IFN- γ R1 and IL-10 were lower, and with no statistical difference for IFN- γ R1 and TNF- α showed no statistical difference ($p < 0.001$, $p = 0.009$, $p = 0.246$, $p = 0.037$; $p = 0.911$) compared to the control group. Correlations between collagen type III and TGF- β mRNA expression were positive and significant ($p = 0.001$, $z = 3.210$), and IFN- γ , IFN- γ R1 and IL-10, were negative and significant ($p = 0.015$, $z = -2.425$, $p = 0.021$, $z = -2.303$, $p = 0.014$, $z = -2.445$) and TNF- α with no statistical difference ($p = 0.555$, $z = 0.590$). Thus, with these results, it can be suggested that pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines may be directly assisting in the pathogenesis of the keloid mainly by inducing a more immature healing, with excessive collagen synthesis and with inefficient wound contraction. In addition, TGF- β appears to be the major induction factor for fibroblast activation and proliferation, and is an important target for studies to elucidate the keloid pathophysiology.

Keywords: keloid, Collagen, Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras:

Figura 1 - Quantificação da porcentagem de colágeno total.....	42
Figura 2 - Quantificação dos tipos de colágeno.....	43
Figura 3 - Análise do Índice de Maturação.....	44
Figura 4 - Análise da expressão de cópias de mRNA para o IFN- γ	44
Figura 5 - Análise da expressão de cópias de mRNA para o IFN- γ R1.....	45
Figura 6 - Análise da expressão de mRNA do TNF- α	46
Figura 7 - Análise da expressão de cópias de mRNA para o TGF- β	46
Figura 8 - Análise da expressão de cópias de mRNA para a IL-10.....	47
Figura 9 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o IFN- γ	48
Figura 10 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o IFN- γ	48
Figura 11 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o IFN- γ R1.....	49
Figura 12 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o IFN- γ R1.....	50
Figura 13 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o TNF- α	50
Figura 14 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o TNF- α	51
Figura 15 - Correlação entre TGF- β e colágeno tipo I.....	52
Figura 16 - Correlação entre TGF- β e colágeno tipo III.....	52
Figura 17 - Correlação entre IL-10 e colágeno tipo I.....	53
Figura 18 - Correlação entre IL-10 e colágeno tipo III.....	54
Figura 19 - Correlação entre o colágeno tipo I e colágeno tipo III.....	54

Pranchas:

Prancha 1: Análise morfométrica das fibras colágenas.....	55
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição da média de idade e gênero dos pacientes com queloides comparados ao grupo controle.....	40
Tabela 2 – Distribuição da localização da cicatriz de queloides comparados ao grupo controle.....	41
Tabela 3 – Raça e descendência negra em pacientes com queloides.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABS: Álcool absoluto

AMG – UFTM: Ambulatório Maria da Glória da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

AP-1: Proteína ativadora 1

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CD45: Antígeno comum dos leucócitos

CT: Ciclo Limiar

dNTP: Desoxiribonucleotídeos fosfatados

EUA: Estados Unidos

HC – UFTM: Hospital de clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

H&E: Hematoxilina e eosina

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1

IFN- γ : Interferon gamma

IFN- γ R1: Receptor 1 do Interferon gamma

IL-10: Interleucina 10

IM: Índice de Maturação

kDa: Kilodalton

KO: Knockout

MAP-kinase: Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

miR: MicroRNA

MMP: Metaloproteinase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NF- κ B: Fator nuclear Kappa B

NK: Natural Killers

PS: Picrosirius

p53: Proteína 53

RNA: Ácido ribonucleico

rS: Teste de Spearman

qPCR: *Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa quantitativo*

SMAD: Proteína intracelular transdutora de sinal do fator de transformação do crescimento

TCTP: Proteína tumoral controlada traducionalmente

TIMP: Inibidor de metaloproteinase

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α : Fator de necrose tumoral alpha

U: Teste de Wilcoxon

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VCAM-1: Molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 PELE E CICATRIZAÇÃO.....	16
1.2 QUELOIDE.....	20
1.3 ASPECTOS IMUNES.....	24
1.3.1 O papel das citocinas na formação dos queloides.....	24
2 JUSTIFICATIVA	32
3 HIPÓTESE	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVO GERAL.....	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS	35
5.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
5.2 CASUÍSTICA.....	35
5.3 COLETA DE MATERIAL.....	36
5.4 HISTOLOGIA.....	36
5.4.1 Preparo do material para análise histoquímica.....	36
5.4.2 Análise morfométrica.....	36
5.5 BIOLOGIA MOLECULAR.....	37
5.5.1 Extração de RNA.....	37
5.5.2 Confecção de cDNA.....	38
5.5.3 Reações de PCR quantitativo.....	38
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5.7 NORMAS PARA A CONFECÇÃO DO MANUSCRITO.....	39
6 RESULTADOS	40
7 DISCUSSÃO	56
8 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFTM	71
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 PELE E CICATRIZAÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, representa mais de 15% do peso corpóreo e dependendo da região apresenta-se mais rígida ou mais flexível (KANITAKIS, 2002). Constitui uma interface dinâmica entre o meio interno e externo exercendo funções de proteção, barreira contra micro-organismos e termoregulação (WYSOCKI, 1999).

A pele é classificada como um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e é constituída por duas camadas, a epiderme e a derme (FORE, 2006). A camada mais externa, chamada de epiderme, é subdividida em quatro camadas, a camada basal, espinhosa, granulosa e córnea (GARTNER, 2011). A camada basal é um local de intensas mitoses e renovações celulares, sendo que à medida que as células migram para as camadas mais externas, tornam-se mais cuboides e com perda de funções (MONTAGNA, 1967). Outras células importantes encontradas na epiderme são os queratinócitos, melanócitos e as células de Langerhans (ARDA; GOKSUGUR; TUZUN, 2014).

Uma das funções mais complexas da pele englobam os mecanismos de imunidade local, sendo os principais constituintes da imunidade cutânea inata, os macrófagos, células natural killers, mastócitos e proteínas do sistema complemento. Já as células da imunidade adaptativa incluem os linfócitos e células dendríticas (BANGERT; BRUNNER; STINGL, 2011; TSIROGIANNI; MOUTSOPOULOS; MOUTSOPOULOS, 2006).

A derme une-se à epiderme através da camada papilar, que apresenta saliências chamadas de papilas dérmicas com função de apresentar maior aderência entre as duas camadas, e sua camada reticular é mais espessa, profunda e formada por tecido conjuntivo denso (GARTNER, 2011).

Por ser um órgão de comunicação do meio interno com o meio externo está suscetível a diversos tipos de traumas como queimaduras, incisões cirúrgicas, lacerações, cortes e ulcerações, que são reparados pela cicatrização. Este processo é caracterizado por uma cascata de eventos complexos, dinâmicos e sobrepostos, que são divididos em três fases, intituladas inflamatória, proliferativa e de remodelação (DRYDEN; SHOEMAKER; KIM, 2013). O período inflamatório inicia-se imediatamente após a lesão e têm uma duração que pode variar de 24 a 48 horas (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Os sinais clássicos da inflamação

Introdução

1 são dor, calor, rubor e edema e perda de função, conseqüentes do aumento no fluxo sanguíneo
2 e da permeabilidade capilar (WORLEY, 2004).

3 Através da análise macroscópica e microscópica das fases cicatriciais, o primeiro
4 estágio foi caracterizado pela hemorragia imediatamente após a lesão, formação do coágulo
5 de fibrina e a migração de numerosos eritrócitos, neutrófilos e monócitos em um período de
6 24 horas (SIMPSON; ROSS, 1972). As primeiras células a migrarem dos capilares para o
7 sítio da lesão são os neutrófilos e os monócitos, sendo que inicialmente os neutrófilos
8 apresentam-se em maior número, porém, após algumas horas, os macrófagos, derivados dos
9 monócitos, predominam em quantidade (LI et al., 2007).

10 A fase proliferativa inicia-se no segundo ou terceiro dia e pode durar até duas semanas
11 (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Após 3 dias da lesão, ainda há a presença do
12 coágulo de fibrina e células sanguíneas, porém, fibroblastos ainda não são observados nas
13 proximidades da lesão. No 5º dia já se observa fibroplasia e neovascularização e no 7º dia há a
14 formação do tecido de granulação, porém, até o décimo dia, a contração cicatricial não é
15 visualizada. Dessa forma, sugere-se que fibroplasia e angiogênese são insuficientes para
16 iniciar o processo de aproximação das bordas da lesão (WELCH; ODLAND; CLARK, 1990).

17 A última fase, inicia-se na segunda semana e pode durar até um ano, sendo mais longa
18 em relação as duas etapas anteriores (KEAST; ORSTED, 1998). Sua principal característica é
19 a deposição do colágeno na ferida e do ponto de vista clínico é a etapa mais importante, pois a
20 qualidade e a quantidade de deposição de matriz extracelular irão determinar o sucesso da
21 cicatrização (WITTE; BARBUL, 1997).

22 A matriz extracelular é composta por duas principais classes de macromoléculas, as
23 proteínas fibrosas, que incluem as fibras colágenas e a elásticas, e as glicoproteínas ao qual
24 englobam a fibronectina, proteoglicanas e a laminina (MECHAM, 2012). As fibras colágenas
25 são as proteínas maiores e mais abundantes da matriz extracelular. Vinte e oito diferentes
26 tipos de colágeno já foram descobertos, tendo funções específicas nos vários tecidos, bem
27 como diferentes modos de organização supramolecular (MYLLYHARJU; KIVIRIKKO,
28 2001).

29 Cada tipo de colágeno é composto por três cadeias α polipeptídicas, apresentando
30 seqüências repetidas de $(\text{Gly-X-Y})_n$, sendo X frequentemente uma prolina, Y uma
31 hidroxiprolina e n maior ou igual a 1. Estas repetições desencadeiam a formação da tripla
32 hélice, uma peculiaridade estrutural da superfamília do colágeno (RICARD-BLUM;
33 RUGGIERO, 2005). A tripla hélice é relativamente rígida e há casos em que a resistência da

Introdução

1 molécula à extensão e compressão é de extrema importância para sua função biológica. Em
2 alguns colágenos, a tripla hélice é interrompida por sequências globulares que proporcionam
3 maior flexibilidade à molécula (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995).

4 Na pele, a síntese de colágeno é realizada pelos fibroblastos e os genes responsáveis
5 pela produção do colágeno tipo I são o COL1A1, localizado no cromossomo 17, que codifica
6 a cadeia $\alpha 1(I)$ e o COL1A2 localizado no cromossomo 7 que codifica a cadeia $\alpha 2(I)$
7 (HUERRE et al., 1982). O colágeno tipo III é produzido através do gene COL3A1, localizado
8 no cromossomo 2 (SOLOMON et al., 1985). Várias vias de sinalização, tais como, MAP
9 kinase e NF- κ B induzem a síntese de colágeno através da transcrição do mRNA, sendo
10 traduzido no RER e hidroxilado e glicosilado em pró-colágeno (SCHMIDT et al., 1998; XU
11 et al., 1998). Posteriormente ocorre a excreção para o meio extracelular através de exocitose,
12 onde por meio de enzimas proteolíticas, há a clivagem de seus própeptídeos terminais C e N,
13 transformando-o em um tropocolágeno. Em seguida, os tropocolágenos ligam-se entre si
14 formando as fibrilas colágenas, que darão origem às fibras colágenas (BOOTH; POLAK;
15 UITTO, 1980).

16 Os tipos de colágeno mais presentes na derme são o colágeno tipo I, que representa
17 80% da totalidade e o colágeno III, compondo os demais 20% (VON DER MARK, 1981). O
18 colágeno tipo I é a proteína extracelular mais abundante nos vertebrados, forma mais de 90%
19 da massa orgânica dos ossos e é o mais presente nos tendões, pele, ligamentos e córnea. A
20 tripla hélice do colágeno tipo I é formada por um heterotrímero composto por duas cadeias
21 idênticas $\alpha 1(I)$ e uma cadeia $\alpha 2(I)$ (BILEZIKIAN; RAISZ; MARTIN, 2008).

22 O colágeno tipo III é um homotrímero, composto por três cadeias $\alpha 1(III)$ e é
23 amplamente distribuído em tecidos contendo colágeno tipo I. Sua distribuição é
24 essencialmente paralela às fibras do colágeno tipo I, pois suas moléculas homotrímeras
25 possuem a capacidade de permitir a mistura com o colágeno tipo I (GELSE; POSCHL;
26 AIGNER, 2003). O colágeno tipo I é considerado o colágeno maduro e é responsável pela
27 força e tensão dos tecidos, já o colágeno tipo III representa o colágeno imaturo, sendo
28 sintetizado durante as fases iniciais da cicatrização (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN,
29 1998).

30 Na pele não lesada, o colágeno apresenta-se organizado de forma entrelaçada, o que é
31 encontrado nas fases finais da cicatrização quando há a presença de maior quantidade de
32 colágeno do tipo I. Nos períodos iniciais da cicatrização o colágeno apresenta-se mais fino e
33 disposto de forma aleatória. Esta diferença está relacionada ao processo de maturação da

Introdução

1 ferida, sendo que nos momentos iniciais da fase de remodelação há uma maior produção de
2 colágeno tipo III, que no decorrer do tempo vai sendo degradado concomitantemente com o
3 aumento na síntese de colágeno tipo I (BAILEY et al., 1975; BROUGHTON et al., 2006).

4 Umas das colorações utilizadas para avaliar a presença das fibras colágenas é a
5 coloração pelo *picrosirius* (PS), quando visualizadas por microscópio de luz com lente
6 polarizada, apresenta uma birrefringência característica, na qual as fibras do tipo I
7 apresentam-se vermelho-amareladas e as fibras do tipo III são visualizadas pela coloração
8 esverdeada (JUNQUEIRA; BIGNOLAS; BRENTANI, 1979; LATTOUF et al., 2014).

9 Foi demonstrado que o volume de densidade do colágeno total e da elastina em tecidos
10 de queloide apresentaram-se aumentados em relação ao grupo controle, tanto na derme
11 profunda, quanto na superficial. Esses resultados sugerem a possibilidade de que os
12 fibroblastos anormais do queloide sintetizam colágeno e elastina em excesso no início da
13 cicatrização, porém a porcentagem de elastina não é tão significativa quanto a do colágeno, o
14 que segundo os autores explica os poucos artigos estudados em relação à elastina no queloide
15 (CHEN et al., 2011).

16 A patogênese do queloide tem sido estudada por diversos grupos (JIN, 2014; LUAN
17 et al., 2016; ZHANG et al., 2011). Em cultura *in vitro* de fibroblastos de queloide, foram
18 encontrados aumentos significativos de colágeno do tipo I e valores inalterados de colágeno
19 tipo III, concluindo que as fibras do tipo III não contribuíam na patogênese do queloide
20 (UITTO et al., 1985). Entretanto, outros autores acreditam que pode ter ocorrido uma
21 alteração no cultivo *in vitro* destas células, pois, através de imunohistoquímica, a expressão de
22 colágeno do tipo I e III foi significativamente maior no queloide, comparados ao controle, e
23 desta forma estas fibras parecem ter um papel importante na formação dessa alteração
24 cicatricial (WULANDARI et al., 2016). Da mesma forma, em outro estudo, níveis
25 significativamente aumentados de colágenos tipo I e III foram encontrados utilizando a
26 técnica de *northern blot* (NAITOH et al., 2001).

27 Assim, a maioria dos estudos têm chamado atenção pela presença aumentada dos
28 colágenos do tipo I e III, entretanto são diversos os mecanismos e hipóteses envolvidos nessa
29 neoformação intensa.

1.2 QUELOIDE

Os possíveis primeiros relatos sobre o aparecimento de queiloide foram descobertos através de uma transliteração hieroglífica de documentos chamados de Papiros de Smith, datados de 3.000 anos atrás e descritos pela civilização egípcia (ALLEN; ART, 2005).

Alibert, em 1806, apresentou a primeira descrição na literatura científica, classificando o queiloide como lesões semelhantes ao câncer, devido ao seu crescimento tecidual exagerado, denominando-as de “les cancroïdes”. Posteriormente, o mesmo autor apresentou o termo queiloide, uma palavra derivada do grego na qual “khele” significa garra e “oeides” semelhante a, devido à comparação da lesão com as patas de um caranguejo (ADDISON, 1854).

Através de uma análise da literatura e esculturas encontradas de povos antigos da Nigéria, chamados de Iorubá, comprovou-se o conhecimento deles em relação à formação do queiloide e suas observações incluem predisposição familiar, tempo de aparecimento da lesão, crescimento além das margens iniciais da cicatriz e a não possibilidade de cura (OMO-DARE, 1973).

Os queloides são caracterizados pelo crescimento exagerado de tecido que se estende além das bordas da cicatriz inicial e a não regressão da lesão com o passar do tempo. Outras alterações cicatriciais como as cicatrizes hipertróficas apresentam semelhanças com os queloides, causando muitas vezes confusão de diagnóstico (BERMAN; BIELEY, 1995).

Por ser um tipo único de cicatrização fibrótica, o queiloide é encontrado apenas em humanos (TUAN; NICHTER, 1998). Dessa forma, estudos vêm sendo feitos com modelos animais para aprimorar os conhecimentos nessa linha de pesquisa. Autores implantaram tecido de queiloide em camundongos e encontraram similaridade entre as características do queiloide e do implante, tais como o aumento da lesão e da quantidade de fibroblastos, além da deposição excessiva de colágeno. Dessa forma, sugeriu-se que esses modelos animais podem auxiliar no conhecimento da patogênese e da eficiência de drogas utilizadas no tratamento dos queloides (LEE, Y. S. et al., 2016; WANG, H.; LUO, 2013).

O histórico familiar é considerado relevante no aparecimento do queiloide, sendo que, aproximadamente 56% dos pacientes apresentam parentes de primeiro ou segundo grau com queiloide, e deste total, em 33% dos casos, a mãe é identificada como o familiar com queiloide (TANAYDIN et al., 2016). Esta aproximação familiar também pode estar relacionada à maior possibilidade de recidiva, pois em casos de histórico familiar positivo, 28,6% dos pacientes

Introdução

1 não apresentaram recidiva e 55,6% apresentaram reincidência da lesão, ambos os casos após
2 excisão cirúrgica (FURTADO; HOCHMAN; FERREIRA, 2012; LANE; WALLER; DAVIS,
3 2005). Dessa forma, sugere-se que a incidência do queiloide pode estar associada à
4 predisposição genética, devido a estudos indicando que a formação do queiloide está
5 relacionada a polimorfismos em locis de regiões cromossômicas como 1q41, 3q22.3-23, e
6 15q21.3 (NAKASHIMA et al., 2010). No queiloide encontra-se também uma maior incidência
7 em pacientes não brancos, com taxas entre 84,4 a 87%, e em mulheres entre 67% a 87,5%
8 (BERMAN; FLORES, 1997; LANE et al., 2005; TANAYDIN et al., 2016; UD-DIN et al.,
9 2013).

10 A idade mínima dos pacientes que procuram tratamento pode variar de 16 a 21 anos e
11 a máxima de 42 a 63 anos, com uma média de idade de 24,7 a 34,5 (SON et al., 2014;
12 WILSON, 2013). O aparecimento da lesão está entre 11 a 40 anos, indicando a atuação de
13 hormônios como sendo um dos fatores que contribuem na patogênese do queiloide (SHAMSI
14 MEYMANDI; REZAZADEH; EKHLASI, 2014). Estudos indicam a influência
15 principalmente de hormônios sexuais como a testosterona e o estrógeno, que induzem uma
16 maior incidência de queiloide na puberdade e na gravidez. Além disso, em fases como a
17 menopausa, onde há diminuição na regulação hormonal, relata-se uma regressão da lesão
18 (MOUSTAFA; ABDEL-FATTAH; ABDEL-FATTAH, 1975; SCHIERLE; SCHOLZ;
19 LEMPERLE, 1997). Foi encontrado que 80% dos pacientes com queiloide, apresentando ou
20 não histórico familiar desenvolveram a lesão após os 11 anos, sendo que, 92,3% não
21 apresentaram alterações no primeiro furo no lóbulo da orelha durante a infância, porém
22 desenvolveram queiloide durante a perfuração de brincos e *piercings* após os 11 anos de idade
23 (LANE et al., 2005).

24 Os locais comumente encontrados são na região abdominal, lóbulo da orelha, tórax,
25 costas, ombros e braços (CAVALIE et al., 2015; SEO; SUNG, 2012). O queiloide ocorre após
26 lesões de diversas causas, como perfuração de brincos e *piercings*, cirurgias, queimaduras,
27 vacinas, catapora, acnes, traumas e também por causas desconhecidas pelos pacientes
28 (BERMAN; FLORES, 1997; CAMACHO-MARTINEZ et al., 2013). Os sinais e sintomas
29 incluem questões físicas como prurido, dor, rubor, enrijecimento local e em alguns casos
30 restrição de mobilidade, bem como alterações psicológicas devido à desfiguração estética
31 muito comum no queiloide (BOCK et al., 2006; MEDHI et al., 2013).

32 Cortes histológicos de fragmentos de queiloide mostraram um epitélio escamoso
33 estratificado hiperqueratinizado, derme superficial com fibroblastos paralelos à superfície

Introdução

1 epidermal, presença de infiltrado inflamatório e de feixes densos de colágeno hialino
2 (HUNASGI et al., 2013). A derme justaposta apresentou-se mais vascularizada, com presença
3 de grande quantidade de linfócitos e fibroblastos e menor quantidade de macrófagos,
4 eosinófilos e neutrófilos polimorfonucleares quando comparados à pele normal (APPLETON;
5 BROWN; WILLOUGHBY, 1996).

6 Há uma diferença clara entre a organização do colágeno no quelóide e nas cicatrizes
7 normais. As fibras colágenas da pele normal mostraram-se entrelaçadas (EHRLICH et al.,
8 1994), já no quelóide são observadas fibras espessas e dispostas de forma desorganizada,
9 apontando que no quelóide falta uma orientação apropriada das fibras necessárias para a
10 contração cicatricial (EHRLICH et al., 1994; VERHAEGEN et al. 2009). Esta contração,
11 dependendo do seu desenvolvimento, traz sucesso ou fracasso ao processo cicatricial
12 (GRINNELL, 1994).

13 Inúmeros são os tratamentos descritos para o quelóide, porém nenhum deles apresenta
14 uma completa eficácia. A radioterapia, crioterapia e a terapia fotodinâmica mostraram-se
15 opções efetivas e relativamente seguras para o tratamento de quelóide e todas apresentaram
16 diminuição das lesões e dos sintomas (GUPTA; KUMAR, 2001; SHEN et al., 2015; UD-
17 DIN et al., 2013). A pressão no local tem sido considerada um fator relevante na regressão da
18 lesão e nas taxas de recorrência pós-cirúrgica. Estudos mostraram que a aplicação de géis de
19 silicone, diminuiu o tamanho da lesão em 19,2% e apresentou 30,7% de satisfação do paciente
20 após o uso (BERMAN et al., 2013; MEDHI et al., 2013).

21 A injeção intralesional de um corticoide chamado triancinolona, apresentou
22 diminuição dos sintomas, regressão da lesão e baixas taxas de recidiva, entre 4,5 a 6%, em
23 menos de um ano (CARVALHAES et al., 2015). Autores demonstraram através de cultura
24 que a triancinolona não altera a proliferação celular dos fibroblastos do quelóide por não atuar
25 na regulação dos níveis de p53 e p2, sugerindo que este tratamento não induz apoptose dos
26 fibroblastos do quelóide (HUANG et al., 2013). Este medicamento induziu a diminuição nos
27 níveis de TGF- β produzidos pelos fibroblastos da pele normal em 45,4%, porém, nos
28 fibroblastos do quelóide diminuíram apenas 20% da produção desta citocina (CARROLL et
29 al., 2002). Autores demonstraram que o corticoide atua inibindo fatores de transcrição pró-
30 inflamatórios como o NF-kB, modulando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como o
31 TNF- α e a IL-6 (DE BOSSCHER et al., 1997). Relata-se também sua influência no fator de
32 transcrição AP-1, que possui função de modular a transcrição de genes pró-inflamatórios,

Introdução

1 como os das metaloproteinases-2 (MMP-2) e metaloproteinases-9 (MMP-9), induzindo a lise
2 de proteínas da MEC e do colágeno (ALJADA et al., 2001)

3 Devido sua função de inibir divisão celular e proliferação de fibroblastos, o Mitomicin
4 foi alvo de tentativas para tratamento do queuloide, porém, quando utilizado na sua forma
5 tópica e intralesional apresentou resultados desapontadores, tais como deficiência na
6 cicatrização, dor, ulceração e necrose (SEO; SUNG, 2012).

7 Tratamentos combinados também são utilizados, como a aplicação de laser diiodo
8 juntamente com a triancinolona, no qual alguns autores apontam porcentagem de regressão de
9 75% da lesão inicial em todos os casos analisados (KASSAB; EL KHARBOTLY, 2012).
10 Através da junção entre a aplicação de bleomicina com a eletroporação, os autores
11 encontraram uma diminuição média de 87% no volume cicatricial, bem como diminuição dos
12 sintomas, sugerindo que, por ser um tratamento mais caro e complexo, deve ser utilizado em
13 pacientes com lesões maiores e que não respondem aos demais tratamentos (MANCA et al.,
14 2013).

15 Independente do tratamento, a maior eficácia foi comprovada através da combinação
16 dos tratamentos com a excisão cirúrgica (DOORNBOS et al., 1990). Foi demonstrado que
17 83,75% dos pacientes tratados com excisão cirúrgica seguida de uma injeção de 5-fluoracil e
18 toxina botulínica apresentaram satisfação com o resultado final (WILSON, 2013). A aplicação
19 da triancinolona juntamente com a excisão cirúrgica é um dos tratamentos mais difundidos e
20 que apresentaram menores taxas de recorrência, sendo que, a taxa de pacientes que não
21 apresentaram recidiva após a excisão e tratamento variou de 91,5 a 94% (BASHIR et al.,
22 2015).

23 Até o momento, não há uma explicação plausível para o aparecimento do queuloide,
24 dessa forma, vários estudos e suposições são realizados. A presença de queuloide em locais de
25 maior tensão cicatricial é muito comum, dessa forma, foi desenvolvido um modelo *in vitro*
26 tridimensional com o intuito de simular a tensão cicatricial *in vivo*. Os resultados indicaram
27 um aumento significativo na expressão de genes relacionados à tensão como a Hsp27, PAI-2 e
28 integrina $\alpha 2\beta 1$ na síntese da MEC, bem como alongamento e proliferação de fibroblastos,
29 sugerindo a atuação da tensão local como sendo um dos fatores preditivos para o queuloide
30 (SUAREZ et al., 2014).

31 Outro fator relevante é a superprodução de colágeno, sendo que os fibroblastos do
32 queuloide mantidos em cultura sintetizaram doze vezes mais colágeno em relação aos
33 fibroblastos de cicatriz normal (YOUNAI et al., 1994). Autores demonstraram *in vitro*, que os

1 fibroblastos do quelóide exibem um maior crescimento celular, em resposta à cicatrização,
2 quando comparados aos fibroblastos normais da derme, sugerindo que esta alteração contribui
3 na patogênese do quelóide (CALDERON; LAWRENCE; BANES, 1996)

4 Através de análise histológica, observou-se que no quelóide foi encontrado
5 simultaneamente células sofrendo necrose e apoptose e fibroblastos propagando a fibrose.
6 Dessa forma, através da observação desse processo, caracterizou-se o quelóide como uma
7 lesão fibrótica, avascular e colagenosa. Os autores acreditam que, controlando estes processos
8 pode-se criar uma nova linha de intervenção terapêutica no tratamento do quelóide
9 (APPLETON; BROWN; WILLOUGHBY, 1996).

10 Diversos estudos buscam uma explicação para a formação do quelóide, porém
11 diversos fatores parecem estar envolvidos, dessa forma, entender os processos que envolvem
12 o sistema tegumentar e o processo cicatricial são de extrema relevância para o estudo do
13 quelóide.

15 1.3 ASPECTOS IMUNES

17 1.3.1 O papel das citocinas na formação dos quelóides

19 O IFN- γ possui uma estrutura dimérica de 25 kilodalton (kDa), com dois polipeptídeos
20 auto associados de forma antiparalela produzindo uma molécula que apresenta um duplo eixo
21 de simetria, sendo principalmente produzida por células natural killers (NK) e linfócitos T. É
22 uma citocina com propriedades antifibróticas, antivirais e antiproliferativas e tem sido
23 considerada relevante no processo cicatricial (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012;
24 EALICK et al., 1991; ISHIDA et al., 2004).

25 Modelos animais são muito utilizados no estudo da atuação do IFN- γ frente à
26 cicatrização. Com o intuito de avaliar o estímulo do IFN- γ após uma lesão, camundongos
27 normais (B₆D₂F₁) submetidos à excisão e subsequente aplicação sistêmica de IFN- γ ,
28 apresentaram uma diminuição na contração cicatricial, bem como na deposição de colágeno
29 comparados a animais normais não estimulados (MILES et al., 1994).

30 Em animais *knockout* de IFN- γ após 3 dias do ferimento, a lesão diminuiu 40% e em
31 animais normais a área lesionada diminuiu apenas a metade em 6 dias. Após administração de
32 anti-IFN- γ em animais normais, foi encontrado um aumento nas taxas de fechamento
33 cicatricial (ISHIDA et al., 2004). Outro estudo mostrou que através da administração local de

Introdução

1 IFN- γ após injúria, houve uma diminuição na quantidade de fibroblastos, de proliferação
2 capilar e atraso cicatricial comparados aos grupos não tratados com a citocina (STOUT;
3 GRESSER; THOMPSON, 1993). Em modelos experimentais, sugere-se que o IFN- γ pode
4 interromper eventos fundamentais da cicatrização, aumentando a incidência de complicações
5 e modulando negativamente o processo cicatricial.

6 Em humanos, para avaliar a atuação do IFN- γ na cicatrização, cultura de fibroblastos
7 foram preparadas com IFN- γ em diferentes concentrações. Doses de IFN- γ de 1000 a 2000
8 U/ml provocaram uma inibição da síntese de colágeno e da proliferação dos fibroblastos,
9 porém a inibição dos fibroblastos iniciou-se somente a partir de 48 horas de tratamento. Dessa
10 forma, sugere-se que o IFN- γ , apesar de ser um rápido inibidor de fibrose, apresenta inibição
11 tardia da proliferação dos fibroblastos (DUNCAN; BERMAN, 1985). Foi demonstrado que o
12 IFN- γ induz ativação de vias Jak/STAT1 e age no nível transcricional inibindo a síntese de
13 mRNA do colágeno e conseqüentemente a formação das fibras colágenas. (DARNELL;
14 KERR; STARK, 1994; ROSENBLOOM et al., 1984)

15 Através de excisão cirúrgica seguida de aplicações intralesionais de IFN- γ em
16 queloides, foi observado uma taxa de recidiva de 40% em 12 semanas de acompanhamento e
17 a recorrência da lesão após excisão cirúrgica sem tratamento apresenta uma taxa acima de
18 50%. Dessa forma, os autores concluíram que o tratamento com IFN- γ não apresenta
19 vantagens quando comparado à excisão cirúrgica isolada. E a ineficácia destas aplicações
20 pode estar relacionada às baixas doses aplicadas e à absorção sistêmica da droga (BROKER et
21 al., 1996).

22 Com a utilização da técnica de *western blot*, foi demonstrado que na ausência de TGF-
23 β , os fibroblastos normais da derme não produzem colágeno tipo I, porém ao adicionar
24 10ng/ml de TGF- β , a síntese de colágeno foi induzida, porém após a inserção de 10ng/ml de
25 IFN- γ , houve supressão significativa na síntese do colágeno. Já os fibroblastos do queleide
26 produzem montantes significativos de colágeno tipo I na ausência do TGF- β e ao adicionar
27 10ng/ml de TGF- β a síntese de colágeno foi aumentada, mas doses de 10, 100, 1000 ng/ml de
28 IFN- γ não afetaram a síntese de colágeno basal nem a induzida (HASEGAWA et al., 2003).

29 Dessa forma, durante os processos cicatriciais normais ou aberrantes como o queleide,
30 o IFN- γ vem sendo considerado um inibidor tanto da proliferação dos fibroblastos quanto da
31 síntese de componentes da MEC, além de atuar como antagonista dos efeitos do TGF- β .

32 Para IFN- γ desempenhar adequadamente seu papel, é necessário a atuação eficaz de
33 seu receptor. O receptor de interferon (IFN- γ R1) humano é uma glicoproteína de 472

Introdução

1 aminoácidos com massa molecular aparente de 90 kDa (VALENTE et al., 1992). A estrutura
2 do polipeptídeo do IFN- γ R1 é formado por uma cadeia α , necessária para ligação e
3 sinalização e uma cadeia β atuante principalmente na sinalização, desempenhando um menor
4 papel na ligação. O domínio intracelular do receptor da cadeia α possui duas sequências
5 importantes, uma sequência de LPKS requerida pela a associação entre a cadeia α com a
6 tirosina quinase Jak1, e a outra uma sequência YDKPH, que quando fosforilada forma o local
7 de ancoragem Stat1 latente. O domínio intracelular do receptor da cadeia β apresenta uma
8 sequência box1/ box2, requerida para a associação com Jak2 (BACH; AGUET;
9 SCHREIBER, 1997).

10 Devido ao duplo eixo de simetria formado pela conformação da molécula de IFN- γ ,
11 sugere-se que uma única molécula homodímera pode se ligar a duas moléculas de IFN- γ R1,
12 sendo essa ligação muito específica pois não é inibida por outras classes de interferon,
13 (BACH et al., 1997; FARRAR; SCHREIBER, 1993).

14 Há relatos de que o IFN- γ R1 está expresso em todos os tipos celulares, com exceção
15 dos eritrócitos. Plaquetas expressam IFN- γ R1 em níveis de 300 receptores por célula e
16 considerando um grande número de plaquetas na circulação é possível que esta célula tenha
17 um papel importante no transporte desse receptor através do sistema circulatório (FARRAR;
18 SCHREIBER, 1993; MOLINAS; WIETZEBIN; FALCOFF, 1987).

19 Através da técnica de imunohistoquímica, a expressão positiva do IFN- γ R1 foi
20 encontrada em células B de linfonodos, de tonsilas e de apêndice e foi ainda encontrado que
21 os macrófagos dos tecidos linfoides são fortemente positivos. Através de citometria de fluxo
22 analisou-se células sanguíneas, de linfonodos, tonsilas, baço e timo, confirmando que a
23 maioria dos linfócitos B são IFN- γ R1 positivos enquanto linfócitos T são negativos no
24 linfonodo e positivos no sangue periférico. Em órgãos não linfóides foi encontrado
25 positividade para o IFN- γ R1 em células endoteliais de vasos de tamanho pequeno a médio.
26 Este padrão de distribuição do IFN- γ R1 pode ajudar a entender as várias funções do IFN- γ
27 (VALENTE et al., 1992).

28 Um aumento na expressão do IFN- γ R1 parece ser influenciado pela interação entre
29 fibroblastos e queratinócitos (FRANSSON et al., 1995). A ausência do IFN- γ R1 foi
30 encontrado em pacientes com infecção por *Schistosoma mansoni* e foi associada à formação
31 de fibrose. (REZENDE et al., 1997) Um polimorfismo no gene deste receptor pode estar
32 relacionado à fibrose hepática severa nestes casos de infecção e acredita-se que este receptor

Introdução

1 pode ser relevante no controle de formação de fibrose presente em outras doenças (DESSEIN
2 et al., 1999).

3 Não foram encontradas evidências da atuação deste receptor no processo cicatricial e
4 no processo de formação de queloides, porém, em outras doenças o IFN- γ R1 parece atuar no
5 controle da formação fibrótica e pode apresentar relevância no processo cicatricial por sua
6 grande abundância nas plaquetas, que são fundamentais na cicatrização.

7 O TNF- α é uma glicoproteína de aproximadamente 17 kDa quando solúvel, sendo
8 primariamente produzido por macrófagos/monócitos, células abundantes e presentes durante
9 os períodos iniciais da cicatrização, além de estar relacionada à resposta fibrótica em vários
10 órgãos, inclusive na pele (CARSWELL et al., 1975; GARNER et al., 1993; YING et al.,
11 1991).

12 Com o intuito de avaliar os níveis de TNF- α durante as fases cicatriciais, foi
13 observado que o TNF- α apresentou um pico 30 minutos após a lesão e após uma hora
14 apresentou diminuição em suas taxas, porém com valores elevados em relação à pele normal,
15 sugerindo que o TNF- α é indicativo de fases iniciais da cicatrização (BIRINCIOGLU et al.,
16 2016). Através de cultura de células endoteliais tratadas com TNF- α , observou-se um
17 aumento na síntese de moléculas de adesão como leucócito-endotélio-1, ICAM-1 e VCAM-1,
18 concluindo que o TNF- α representa um papel importante no recrutamento de células para o
19 local da lesão (BRADLEY; POBER, 1996).

20 Através de cultura, fibroblastos induzidos com TNF- α apresentaram diminuição de
21 50% na síntese de colágeno quando comparados a fibroblastos não tratados, e através de um
22 ensaio nuclear, foi encontrado uma inibição na atividade transcricional, devido à diminuição da
23 síntese de procolágeno α 1(I). Os autores sugerem que o TNF- α seja importante modulador da
24 síntese de colágeno, pois diminui a transcrição de genes, os níveis de mRNA e a produção de
25 colágeno em culturas de fibroblastos (SOLIS-HERRUZO; BRENNER; CHOJKIER, 1988).

26 Utilizando anticorpos específicos para algumas citocinas, em células mononucleares
27 do sangue periférico, foi encontrado um aumento nos níveis de TNF- α nos pacientes com
28 quelóide quando comparados ao grupo controle. Os autores relatam que este aumento pode
29 estar relacionado a uma resposta secundária dos macrófagos e fibroblastos aos níveis
30 incontrolados da acumulação de colágeno nos pacientes com quelóide (MCCAULEY et al.,
31 1992).

32 O TNF- α pode ser um modulador da produção de colágeno. Culturas de fragmentos de
33 pele humana foram estimulados com TNF- α e através da análise dos níveis de hidroxiprolina

Introdução

1 e biomarcadores para degradação de colágeno foi constatado um aumento na degradação de
2 colágeno tipo I em relação a culturas sem o estímulo. Através de *western blot* e
3 imunohistoquímica foi confirmado aumento nos níveis de enzimas que degradam colágeno
4 como a MMP-1 e MMP-3 em relação aos controles (AGREN et al., 2015).

5 Autores implantaram uma esponja com TNF- α em camundongos e continuaram
6 aplicando esta citocina diariamente com o intuito de avaliar a atuação local do TNF- α no
7 desenvolvimento do tecido de granulação. Posteriormente, estas esponjas foram retiradas,
8 cortadas em pequenos pedaços e coradas com Weigert van Gieson para visualização do
9 colágeno. A partir do quarto dia de aplicação, a formação de colágeno apresentou-se
10 significativamente menor no grupo tratado com TNF- α em relação ao controle. Culturas de
11 fibroblastos do tecido de granulação de camundongos e de humanos também foram analisados
12 sendo que em ambos encontrou-se um efeito inibitório na produção do colágeno em culturas
13 tratadas com TNF- α em relação as não tratadas (RAPALA, 1996).

14 Observa-se o efeito do TNF- α na supressão da síntese do colágeno através da inibição
15 da produção pelos fibroblastos e da indução da produção de enzimas que degradam o
16 colágeno.

17 As citocinas anti-inflamatórias também apresentam um relevante papel no processo
18 cicatricial. O TGF- β é uma molécula homodimérica de aproximadamente 25 kDa que
19 apresenta funções de controlar o crescimento, diferenciação e função de várias células de
20 derivação epitelial e mesenquimal (ROBERTS et al., 1990). É uma citocina de extrema
21 relevância durante o desenvolvimento, homeostase e reparo tecidual (WERNER; GROSE,
22 2003)

23 Durante a cicatrização, esta citocina é produzida pelas plaquetas e por células do
24 tecido como fibroblastos e macrófagos, atuando como quimioatrativo para demais
25 fibroblastos, neutrófilos e macrófagos bem como estimulante para a síntese de componentes
26 da MEC como colágeno e fibronectina (TAKEHARA, 2000; VARGA; ROSENBLOOM;
27 JIMENEZ, 1987). Autores encontraram dois picos dessa citocina na cicatrização normal, o
28 primeiro, nos instantes iniciais da cicatrização, comprovando sua liberação pelas plaquetas e o
29 segundo algumas horas após, sugerindo a liberação pelas demais células do tecido (WANG,
30 G. et al., 2014).

31 A síntese do colágeno, pode ser induzida pelo TGF- β , que se liga ao receptor serina-
32 tirosina cinase ubíquo (T β RII), e então o receptor TGF- β I (T β RI) é recrutado e fosforilado
33 pelo T β RII. O sinal então propaga-se através de Smads, uma família de proteínas

Introdução

1 intracelulares, que por sua vez, transportam informação ao núcleo estimulando a transcrição
2 dos genes (COL1A1, COL1A2 e COL3A1), induzindo a produção dos colágenos do tipo I e
3 do tipo III (DERYNCK; ZHANG, 2003). Uma superexpressão do T β RI e T β RII e uma maior
4 fosforilação de proteínas Smad foi encontrado em fibroblastos do queiloide, que parecem
5 induzir uma produção excessiva de colágeno (CHIN et al., 2001). Estudos apontam que uma
6 insuficiência na eliminação da superexpressão desses receptores, durante a fase de
7 remodelação, pode levar a um efeito autócrino persistente do TGF- β sobre os fibroblastos do
8 queiloide, levando uma maior síntese de colágeno (SCHMID et al., 1998).

9 O TGF- β tem sido descrito como potente ativador da síntese de MEC pelos
10 fibroblastos e conseqüentemente responsável pela excessiva deposição de colágeno no
11 queiloide. Autores encontraram, através de western blot, um aumento de TGF- β em cultura de
12 fibroblastos do queiloide quando comparados a cultura de fibroblastos da derme normal,
13 sugerindo o importante papel do TGF- β como uma citocina indutora de fibrose (LEE, T. Y. et
14 al., 1999). Fibroblastos do queiloide mantidos em cultura e estimulados com TGF- β
15 apresentaram taxas maiores de síntese de colágeno e encontrou-se que esta citocina estimula a
16 proliferação de fibroblastos do queiloide via aumento na expressão de miR-21, um microRNA
17 encontrado em tumores malignos (LIU et al., 2016).

18 Cultura de fibroblastos normais estimulados com TGF- β apresentaram um aumento
19 significativo na síntese de colágeno do tipo I e III e fibronectina quando comparados ao grupo
20 não estimulado. E nesse mesmo estudo, através de hibridização dot blot foi encontrado que as
21 quantidades de mRNA do colágeno I e III continuaram a aumentar até 72 horas da retirada do
22 estímulo com o TGF- β (VARGA et al., 1987).

23 Da mesma forma, foram analisados através de cultura o comportamento dos
24 fibroblastos do queiloide e foi encontrado que quando estimulados pelo TGF- β , estas células
25 produziram 12 vezes mais colágeno do que os fibroblastos de cicatriz normal. Em contato
26 com anticorpos anti-TGF-beta houve redução nas taxas de síntese de colágeno em 40%,
27 mostrando uma sensibilidade dos fibroblastos do queiloide a este fator de crescimento
28 (YOUNAI et al., 1994).

29 Estudos em modelos animais também auxiliam nas descobertas em relação à atuação
30 do TGF- β na formação da fibrose. Camundongos normais foram submetidos a duas incisões,
31 sendo que em uma delas foram realizadas aplicações locais de TGF- β e na outra de anti-TGF-
32 β . Através de imunohistoquímica foi observado que a ferida tratada com anti-TGF- β

Introdução

1 apresentou menor deposição de fibronectina e colágenos tipo I e III comparada à outra lesão
2 (SHAH; FOREMAN; FERGUSON, 1995).

3 Para avaliar a atividade contrátil dos fibroblastos, utilizando um ensaio de contração
4 com o auxílio de um gel de colágeno foi demonstrado que na ausência de TGF- β , os
5 fibroblastos normais da derme apresentaram taxa de contração de 87,1% da área inicial. Após
6 adição de 10ng/ml de TGF- β a contração aumentou 68,8% da área inicial e foi
7 significativamente inibida pela presença de 10ng/ml de IFN- γ . Já os fibroblastos do queeloide
8 mostraram aumento na contração de 57,7% da área inicial em 24 horas comparado aos
9 fibroblastos normais na ausência do TGF- β e após adicionar 10ng/ml de TGF- β a contração
10 aumentou 48,3% da área inicial, entretanto 10, 100, 1000 ng/ml de IFN- γ não afetaram a
11 indução da contração basal nem a induzida (HASEGAWA et al., 2003). O TGF- β apresenta
12 efeitos antagônicos com o IFN- γ . Em animais knock-out de IFN- γ , foi encontrado um
13 aumento significativo na expressão de TGF- β nos estágios iniciais da cicatrização em relação
14 aos animais normais, indicando que o IFN- γ pode modular negativamente o processo
15 cicatricial (ISHIDA et al., 2004).

16 Dessa forma podemos considerar o TGF- β como um estimulador da síntese de
17 colágeno, da proliferação de fibroblastos e da contração cicatricial, além de ser um fator com
18 funções antagônicas ao IFN- γ .

19 A IL-10 é uma molécula homodímera, considerada uma citocina imunomoduladora
20 que possui funções anti-inflamatórias relevantes. Está relacionada com a supressão da
21 resposta inflamatória, inibição de citocinas proinflamatórias como a IL-6 e IL-8, bem como na
22 inibição da migração de células imunes como monócitos, macrófagos e neutrófilos (MOORE
23 et al., 1993; SYTO et al., 1998; WERNER; GROSE, 2003).

24 A utilização de estudos com modelos animais está sendo extremamente importantes no
25 reconhecimento das funções dos componentes da cicatrização e muitos deles focam na
26 atuação da IL-10 frente a este processo.

27 Para avaliar a presença da IL-10 durante a cicatrização, foi estudado através de RT-
28 PCR e E.L.I.S.A os níveis de mRNA e proteína em fragmentos pele normal e de tecido lesado
29 em camundongos. Observou-se que na pele lesionada um pico nos níveis desta citocina 3
30 horas após a lesão, retorno aos níveis basais em 24 horas e posteriormente aumento nas 72
31 horas após. Presença de células foram também analisadas nos diferentes estágios da
32 cicatrização, sendo que após 6 horas houve presença de infiltrados de neutrófilos, e entre 24 e
33 72 horas esses neutrófilos apresentava-se amplamente substituídos por macrófagos. No

Introdução

1 citoplasma, dois tipos diferentes de células mononucleares com sinais de localização de
2 mRNA para IL-10 foram observadas. Os autores sugerem que o primeiro pico está
3 relacionado à liberação de IL-10 pelas células epidermais precedido da infiltração de
4 neutrófilos e o segundo pico pode ser resultado da produção por células mononucleares como
5 as células epidermais regeneradoras, que parece estar relacionada com a infiltração máxima
6 de macrófagos para o local da lesão (SATO; OHSHIMA; KONDO, 1999).

7 Com o objetivo de comprovar as funções da IL-10 na cicatrização, modelos animais
8 foram submetidos a excisões e tratados com IL-10. No terceiro dia, esses animais
9 apresentaram diminuição da inflamação, restauração da arquitetura normal da derme e
10 deposição de colágeno normal comparados aos controles. Nos animais tratados com IL-10, foi
11 também observado através de imunohistoquímica para CD45, uma diminuição de células
12 inflamatórias, e através de PCR, diminuição de mediadores proinflamatórios como as
13 proteínas heat shock 47, proteína quimioatrativa de monócito-1 e da IL-6 que apresentou
14 diferença estatística (PERANTEAU et al., 2008).

15 Um estudo avaliou diversos aspectos da cicatrização utilizando camundongos knock-
16 out (KO) para IL-10 e controles. Em relação ao fechamento cicatricial, após lesão os
17 camundongos KO apresentaram aproximação das bordas e epitelização acelerada em relação
18 aos animais normais. Através da coloração com picrossírius e posterior quantificação de
19 colágeno, foi demonstrado um aumento significativo da porcentagem das fibras colágenas dos
20 animais KO quando comparados aos controles. Por fim, para analisar a qualidade cicatricial
21 foi aplicado um teste de ruptura na pele cicatrizada, apontando uma diminuição
22 estatisticamente significativa na força de ruptura dos animais KO em relação aos animais
23 normais. Os autores concluíram que a falta de IL-10 resultou em cicatrização e aproximação
24 de bordas aceleradas, maior deposição de colágeno e consequente diminuição da força de
25 ruptura local, sugerindo que a IL-10 pode retardar o processo cicatricial, modular a deposição
26 de colágeno e afetar a qualidade do tecido de reparação (EMING et al., 2007).

27 Elucidando a atuação da IL-10 frente aos fibroblastos e consequente formação de
28 fibrose, cultura de fibroblastos tratadas com IL-10 apresentaram diminuição na expressão de
29 mRNA para colágeno tipo I em relação a culturas não tratadas. Através da utilização do
30 densitômetro, observou-se que esta redução na expressão do colágeno tipo I foi de 1/3 a 1/4
31 com aplicação de doses de 50ng/ml de IL-10 (YAMAMOTO; ECKES; KRIEG, 2001).

32 Outro estudo, analisou o processo cicatricial em animais e em humanos através da
33 aplicação de baixas doses de IL-10 humana recombinante (rhIL-10) durante o processo

Introdução

1 cicatricial. Em animais, após o tratamento com a citocina foi encontrado uma diminuição
2 significativa de células inflamatórias como macrófagos e monócitos e melhora no processo
3 bem como na aparência cicatricial. Em humano, a aplicação resultou em melhora no aspecto
4 cicatricial e diminuição do rubor, indicando que esta citocina pode ser uma alternativa
5 terapêutica para minimização e/ou profilaxia de cicatrização (KIERAN et al., 2013).

6 Com estes estudos podemos observar a atuação anti-inflamatória da IL-10, sua atuação
7 na melhoria do aspecto cicatricial, bem como no impedimento da formação excessiva de
8 colágeno muito comum em queloides.

1 2. JUSTIFICATIVA

2
3 O queiloide causa prurido, dor, contraturas, excesso de cicatrização, o que pode afetar
4 seriamente a qualidade de vida do paciente, tanto fisiologicamente, quanto
5 psicologicamente (BOCK et al., 2006; GAUGLITZ et al., 2011). Ele pode ser consequente de
6 pequenas lesões à pele com acne, piercing na orelha, e grandes lesões como queimaduras
7 (TUAN; NICHTER, 1998).

8 Apresenta altas taxas de recidiva após excisão cirúrgica e até o momento não existe
9 um tratamento totalmente eficaz. Seu conceito, etiologia, prevalência, formas de tratamento e
10 aspectos clínicos e histopatológicos ainda são muito discutidos, trazendo um desafio para os
11 pesquisadores e profissionais da saúde.

12 Os tipos de colágeno mais presentes na derme são o colágeno tipo I com 80% e o III
13 com 20% (VON DER MARK, 1981), e por ser um tipo de cicatrização exacerbada estudos
14 mostram que o queiloide apresenta porcentagens significativamente maiores de colágeno
15 quando comparados com cicatrizes normais (NAITOH et al., 2001; WULANDARI et al.,
16 2016).

17 Por se tratar de uma lesão relacionada a alterações nos aspectos cicatriciais, discute-se
18 o importante papel de citocinas, quimiocinas e células do sistema imune que podem estar
19 desregulados durante a formação do queiloide, bem como fatores que podem estar
20 influenciando na deposição excessiva de colágeno e/ou na falta de ação de enzimas que
21 possuem como função degradar o colágeno.

22 Por isso é de grande importância mais estudos sobre o tema e seus fatores relacionados
23 com o intuito de buscar formas de tratamento e prevenção adequadas aos pacientes com
24 queiloide.

1 3. HIPÓTESE

2

3 Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias influenciam no processo cicatricial,
4 levando a uma excessiva deposição de colágeno e induzindo uma cicatrização imatura nos
5 queloides.

1 4. OBJETIVOS

2
3 **4.1. Objetivo Geral**

4 Avaliar as fibras colágenas e a expressão *in situ* de citocinas pró-inflamatórias e anti-
5 inflamatórias em lesões de queloides comparadas com grupo controle.

6
7 **4.2. Objetivos específicos**

8
9 Analisar e quantificar o colágeno do tipo I e III em biópsias de pacientes com
10 queloides comparadas com grupo controle.

11 Analisar e quantificar o índice de maturação do colágeno em biópsias de pacientes
12 com queleide comparadas com o grupo controle.

13 Analisar *in situ* a expressão do IFN- γ , IFN- γ R1, TNF- α , TGF- β 1 e IL-10, em biópsias
14 de pacientes com queloides e compará-los ao grupo controle.

15 Correlacionar os tipos de colágenos com a expressão de IFN- γ , IFN- γ R1, TNF- α ,
16 TGF- β 1 e IL-10.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. 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 o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.2. Casuística

Neste estudo, utilizou-se 73 biópsias, sendo 33 obtidas de biópsias de pacientes com quelóide e 40 cicatrizes normais.

Os pacientes com quelóides foram atendidos em consultas pela equipe de cirurgiões plásticos no Ambulatório Maria da Glória (AMG-UFTM) situado na rua Frei Paulino, s/n, CEP: 38025-180, integrado ao Hospital de Clínicas da UFTM (HC-UFTM) na cidade de Uberaba - MG, que funciona toda sexta feira no período da manhã, das 7:00 às 12:00 horas. Este ambulatório tem o intuito de conhecer os pacientes com quelóide 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 quelóide os pacientes que apresentavam cicatrização anormal, com crescimento das bordas da lesão além das margens da cicatriz inicial, além de sinais e sintomas como dor, prurido, rubor e endurecimento local.

Excluiu-se, através de entrevista, os pacientes que apresentavam cicatrizes hipertróficas, cicatrizes de segunda intenção e pacientes com uso de imunossupressor sistêmico, portadores de doenças autoimunes e imunodeficientes.

O primeiro contato com o paciente realizou-se através de consulta para o diagnóstico de quelóide, indicação e início de aplicação intralesional de corticoide, triancinolona 20mg/ml, uma vez ao mês até a melhora do quadro e conseqüente encaminhamento cirúrgico para retirada da lesão. Após a excisão manteve-se a tratamento para evitar a recidiva.

A maioria dos fragmentos de pele dos controles foram retirados de pacientes secundíparas ou múltíparas durante a realização da cesariana, retirando parte da cicatriz normal da cesárea anterior (Tabela 2).

5.3. Coleta do material

A coleta do material foi realizada nas salas de pequena cirurgia do ambulatório de cirurgia plástica pelos médios responsáveis pelo setor. Para cirurgia, inicialmente, realizou-se a marcação da lesão com caneta cirúrgica, anestesia com lidocaína 2%, corte da lesão com bisturi, excisão da pele com queleide e sutura. Uma parte do fragmento foi armazenada em RNA later (Ambion®) para realização de RT-PCR e a outra parte em formol tamponado para análise histológica.

5.4. Histologia

5.4.1. Preparo do material para análise histoquímica

Os fragmentos fixados em formaldeído 10% passaram pelo processo de desidratação em álcoois com concentrações crescentes (70 a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Realizou-se cortes seriados com 4µm de espessura e os fragmentos foram capturados em lâminas de vidro. Realizou-se a coloração de hematoxilina e eosina na lâmina de número 1, picrosirius na lâmina de número 2 as demais foram armazenadas para futuras análises.

Para coloração de Picrosirius foi realizada a desparafinização (xilol I, II e III, ABS I, II e III e álcool 95%), hidratação em água corrente por 5 minutos e mergulho em água destilada. Logo após, um bando de 6 minutos em solução de picrosirius (sirius red F3B200 0,1g e solução aquosa saturada de ácido pícrico 100 ml), lavagem em água corrente de 3 a 4 minutos, banho em hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavagem em água corrente de 10 a 15 minutos, desidratação e diafanização (álcool 95, álcoois I, II e III e xilol II) e por fim prosseguiu-se com a montagem da lâmina com lamínula e meio de montagem.

5.4.2. Análise morfológica

Para a quantificação da porcentagem das fibras colágenas, dividiu-se as lâminas coradas pelo PS em quatro quadrantes e o número representativo de medidas calculado através da média acumulada (WILLIAMS, 1977). A partir deste cálculo analisou-se 10 imagens por quadrante, totalizando 40 imagens por lâmina, sendo uma lâmina para cada caso. As lâminas foram examinadas sob luz polarizada, com objetiva de 40x (aumento final de 1600x). A imagem digitalizada mostrava a área constituída de colágeno, com aspecto birrefringente. A visualização da birrefringência de coloração vermelho-amarelada

1 representou o colágeno tipo I, que com um cursor do computador foi selecionada e
2 posteriormente capturada e calculada sua porcentagem de área. Essa análise foi realizada
3 seguindo protocolos estabelecidos na literatura (JUNQUEIRA et al., 1979; LATTOUF et al.,
4 2014). O colágeno tipo III foi avaliado pela observação da coloração birrefringente
5 esverdeada seguindo os mesmos protocolos acima citados. A análise do colágeno total
6 englobou a observação e marcação das duas cores birrefringentes características dos
7 colágenos I e III segundo descrição relatada acima (Prancha 1).

8 O índice de maturação (IM) foi calculado através da relação entre as porcentagens de
9 colágeno do tipo I sobre o tipo III, no qual resultados com valores acima de 1 (um)
10 apresentaram predominância de colágeno I, ou seja, maduro e valores abaixo de 1 indicaram
11 maior predominância de colágeno tipo III, um colágeno considerado imaturo (COELHO-
12 LEMOS et al., 2004).

13 Para a quantificação do colágeno total e a captura das imagens dos campos para
14 análise das diferenciações de colágeno tipo I e tipo III utilizou-se uma câmera de vídeo
15 acoplada a um microscópio de luz comum, com sistema Leica Qwin Plus® (Leica
16 Microsystems, Inc., Wetzlar, Germany) instalado em um microcomputador. Utilizou-se um
17 sistema analisador de imagens interativo Image J® (NIH, Bethesda, Maryland, US) para
18 análise da porcentagem de colágeno I e III.

19

20 **5.5. Biologia molecular**

21

22 *5.5.1. Extração de RNA*

23 Para a extração do RNA total utilizou-se o kit de extração de RNA (RNA SV Total
24 RNA Isolation System, Promega - EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.
25 Fragmentos de tecidos, armazenados em RNA later, foram processados por maceração
26 mecânica com o aparelho tissue tearor, transferidos para tubo eppendorf contendo tampão de
27 lise e misturados por inversão. Adicionou-se 350µl de tampão de diluição e as amostras foram
28 aquecidas em banho-maria a 70°C por 3 minutos e centrifugadas a 10 minutos a 13000xg à
29 4°C. Após esta centrifugação transferiu-se o sobrenadante para novos tubos eppendorfs e
30 adicionado 200µl de etanol a 95%. Transferiu-se o material para um conjunto de separação do
31 kit, contendo uma membrana, sendo posteriormente centrifugado por 1 minuto a 13000xg à
32 4°C. O RNA foi lavado com 600µl de solução de lavagem de acordo com as especificações do
33 fabricante (RNA Wash Solution) por 1 minuto e centrifugado (13000xg à 4°C). Eliminou-se a

Material e Métodos

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

9 10 *5.5.2. Confecção de cDNA*

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

19 20 *5.5.3. Reações de PCR quantitativo (qPCR)*

21 A expressão quantitativa de mRNA dos genes IFN- γ , IFN- γ R1, TNF- α , TGF- β e IL-
22 10 foram analisadas por reações de PCR em tempo real, nas amostras de cDNA de fragmento
23 pele com queleide e cicatriz controle. Utilizou-se o sistema Taqman no aparelho de PCR em
24 tempo real (Applied Biosystems – USA). Primers adequados para tais reações forma
25 utilizados, sendo cada expressão normalizada com base em controles endógenos, como a β -
26 actina, uma proteína constitutiva presente no citoesqueleto de diversos tipos celulares. O
27 cDNA sintetizado a partir do RNA mensageiro teve sua utilização como determinado pelo
28 fabricante. Analisou-se os resultados com base no valor de CT (*cycle threshold* – ou ciclo
29 limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu
30 um dado limiar. Utilizou-se o método C_T comparativo ($\Delta\Delta C_T$), por meio de fórmulas
31 aritméticas para alcançar o resultado da quantificação relativa de mRNA. O valor do

1 *threshold* foi calibrado para 0,02 e a fórmula utilizada para calcular o $\Delta\Delta C_T$ foi: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$
2 (treated) – C_T (control) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3 **5.6. Análise estatística**

4
5 A análise estatística foi realizada por meio do programa *Statview* (Abaccus - EUA). A
6 verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de Shapiro-
7 Wilk. As variáveis apresentaram distribuição não normal e foram expressas em mediana com
8 valores mínimo e máximo e percentis. As variáveis apresentaram distribuição normal com
9 variância não homogênea ou distribuição não normal foram analisadas pelos testes de Mann-
10 Whitney. A correlação entre duas variáveis contínuas com distribuição não normal foi
11 analisada pelo teste de Spearman. Para comparar duas variáveis contínuas nos mesmos
12 pacientes foi aplicado o teste de Wilcoxon. As variáveis qualitativas foram expressas através
13 da média e desvio padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos
14 quando a probabilidade foi menor 5% ($p < 0,05$).

15 16 **5.7. Normas para a confecção do manuscrito**

17
18 Para a elaboração escrita do trabalho, foi consultado o manual para apresentação de
19 trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da Associação Brasileira de
20 Normas Técnicas (ABNT) organizado pela biblioteca universitária da UFTM (ALVES;
21 SILVA; ALMEIDA, 2013).

Resultados

6. RESULTADOS

Foram avaliadas 73 biópsias, sendo 33 de pacientes com quelóide e 40 cicatrizes normais. A média de idade dos pacientes com quelóide foi de $29,15 \pm 16,45$ e no grupo controles $29,08 \pm 7,47$ (Tabela 1).

Do total de biópsias analisadas de pacientes com quelóide, 20 (60,60%) eram do sexo feminino e 13 (39,39%) do sexo masculino e no grupo controle 38 (95%) pacientes eram do sexo feminino e 2 (5%) do sexo masculino (Tabela 1).

De acordo com localização e o número das excisões dos quelóides foram obtidas, 26 no lóbulo da orelha (78,78%), 5 no abdome (15,15%) e 2 no tórax (6,06). No grupo controle obteve-se 36 no abdome (90%), 1 na mão (2,5%), 1 no braço (2,5%) e 1 no pescoço (2,5%). Os motivos de aparecimento do quelóide foram devido a cirurgia em 6 casos (18,18%), perfuração de brinco/piercing em 26 pacientes (78,78%) e por acne em 1 caso (3,03%) (Tabela 2).

Em relação à raça dos pacientes com quelóide, 13 (39,39) eram da raça branca e 20 não branca (60,60) e a descendência negra estava presente em 22 pacientes (66,66%) e em 11 casos não havia relação direta com a raça não branca (33,33%) (Tabela 3).

Ao analisar a existência de casos de quelóide na família, 13 (39,39%) pacientes relataram haver casos de familiares de 1º grau com quelóide e 20 (60,60%) falaram que não tinham conhecimento de nenhum familiar com quelóide (Tabela 3).

Tabela 1 – Distribuição da média de idade e gênero dos pacientes com quelóide comparados ao grupo controle.

Média de idade e gênero	Quelóide	Controle
Total Biópsias	33	40
Média de Idade	29,15	29,08
Gênero Feminino	20 (60,60%)	38 (95%)
Gênero Masculino	13 (39,39%)	2 (5%)

Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

1

Resultados

1 Tabela 2 – Distribuição da localização da cicatriz de queloides comparados ao grupo controle
2

Locais biópsia	Queloide	Controle
Lóbulo orelha	26 (78,78%)	-
Abdome	5 (15,15%)	36 (90%)
Tórax	2 (6,06%)	-
Mão	-	1 (2,5%)
Braço	-	1 (2,5%)
Mama	-	1 (2,5%)
Pescoço	-	1 (2,5%)

3

4 Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

5

6 Tabela 3 – Raça e descendência negra em pacientes com queloides.

7

Queloide	Taxas
Etnia Branca	13 (39,39%)
Etnia não branca	20 (60,60%)
Descendência negra	22 (66,66%)
Sem descendência negra	11 (33,33%)
Histórico familiar	13 (39,39%)

8

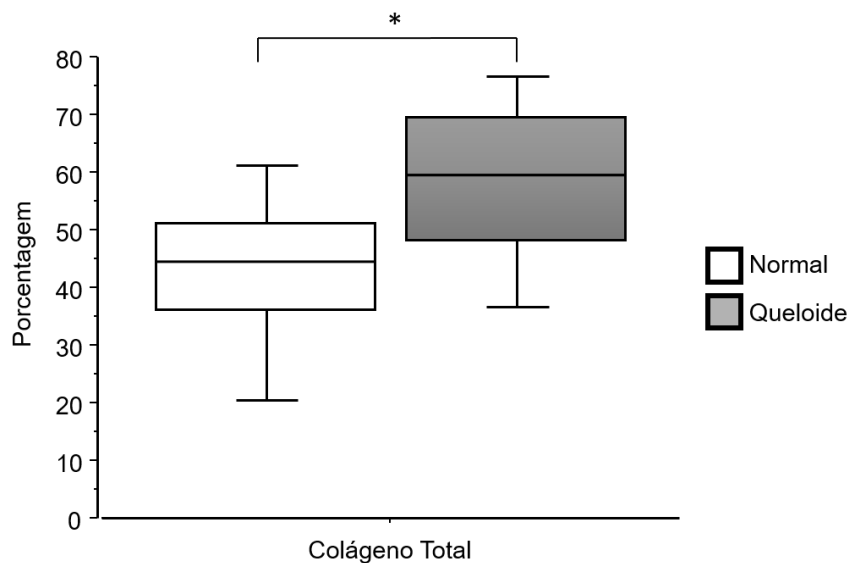
9 Fonte: Elaborada pelo autor, 2016.

Resultados

1 Os tipos de colágenos foram avaliados pela coloração do PS visto em luz comum e
 2 analisados em luz polarizada, tanto nas biópsias dos pacientes com queloides como no grupo
 3 controle (Prancha 1A, 1B, 1C e 1D). Houve uma porcentagem significativamente maior de
 4 colágeno total nos pacientes com queiloide comparados ao controle (Mann-Whitney;
 5 $p < 0,0001$) (Figura 1).

6

7 Figura 1 – Quantificação da porcentagem de colágeno total



8

9 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

10 Porcentagem de colágeno total presente em biópsias de pacientes com queiloide comparadas com o grupo
 11 controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil
 12 de 10 a 90%. $p < 0,05$.

13

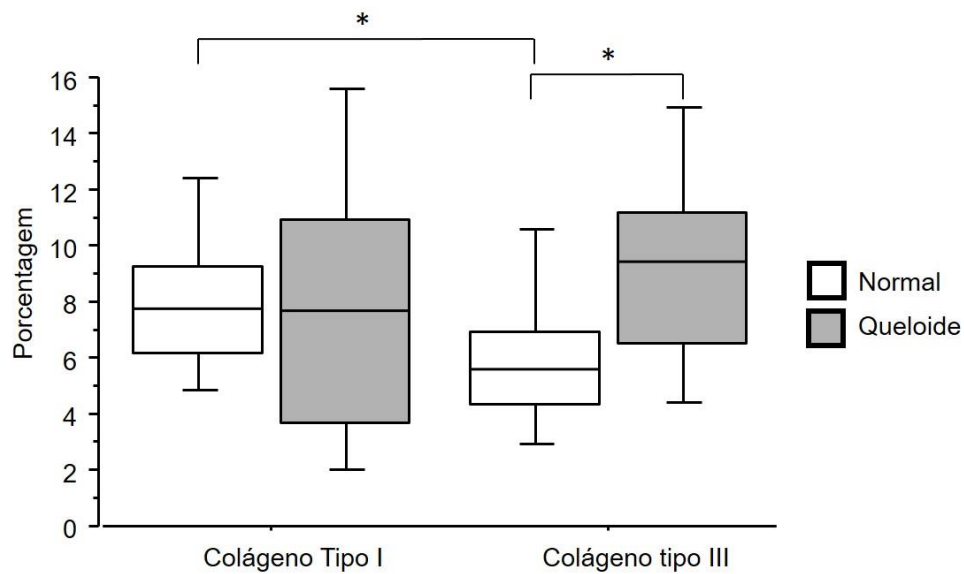
14

15 Ao analisar os tipos de colágeno produzidos no processo cicatricial, observou-se que o
 16 colágeno tipo I presente na biópsia dos pacientes com queloides não apresentou diferença
 17 significativa quando comparados com grupo controle (Mann-Whitney; $p = 0,653$). Já o
 18 colágeno tipo III foi significativamente maior nos pacientes com queiloide quando comparados
 19 ao controle (Mann-Whitney; $p = 0,0001$). A porcentagem de colágeno do tipo I foi
 20 significativamente maior no grupo controle quando comparado com o colágeno tipo III
 21 (Wilcoxon; $p < 0,0001$). E nos pacientes com queiloide, a porcentagem de colágeno I e III é
 22 semelhante, sem diferença significativa (Wilcoxon; $p = 0,126$) (Figura 2; Prancha 1C e 1D).

22

1 Figura 2 – Quantificação dos tipos de colágeno

2



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

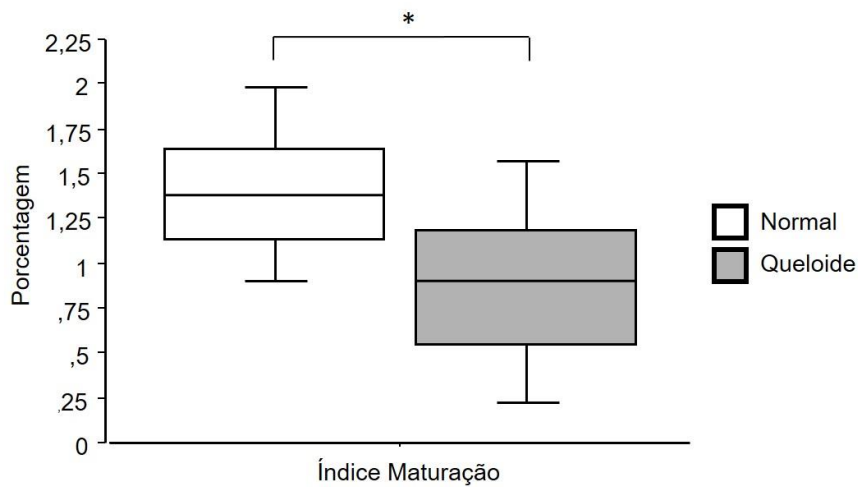
5 Porcentagem de colágenos tipo I e III presente em biópsias de pacientes com que-loide comparadas com o grupo
6 controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a linha vertical o percentil
7 de 10 a 90%. $p < 0,05$.

8

9 Em relação ao índice de maturação de colágeno calculado a partir das porcentagens de
10 colágeno I e III presentes nas biópsias dos pacientes com que-loide comparadas com o grupo
11 controle observou-se que o que-loide apresenta um colágeno significativamente mais imaturo
12 que o controle (Mann-Whitney; $p < 0,0001$) (Figura 3).

13

1 Figura 3 – Análise do Índice de Maturação



2

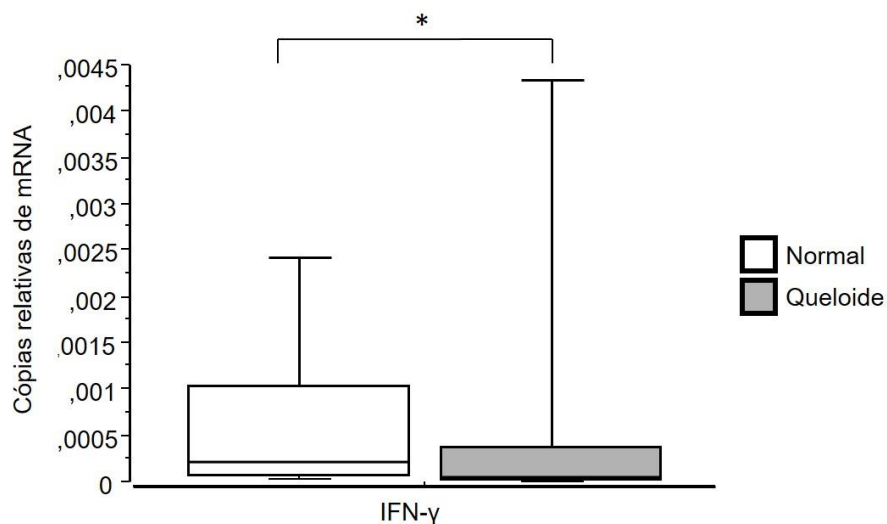
3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4 Índice de maturação calculado a partir das porcentagens de colágeno I e III presentes em biópsias de pacientes
5 com quelóide comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de
6 25% a 75% e a linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

7

8 O número de cópias relativas de mRNA para o IFN- γ foi significativamente menor nos
9 pacientes com quelóide quando comparados aos controles (Mann-Whitney; $p = 0,009$) (Figura
10 4).

11

12 Figura 4 – Análise da expressão de cópias de mRNA para o IFN- γ 

13

14 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

15 Quantidade de cópias relativas de mRNA para IFN- γ presentes em biópsias de pacientes com quelóide
16 comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a
17 linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

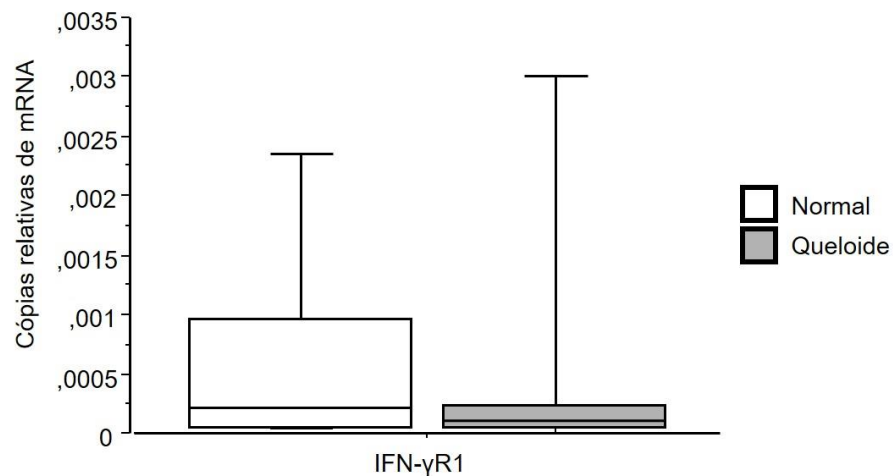
Resultados

1 Em relação a análise do número relativo de cópias de mRNA do IFN- γ R1, observou-se
 2 que os pacientes com queiloide apresentaram um menor número relativo de cópias de mRNA
 3 quando comparados aos controles, porém sem diferença estatística (Mann-Whitney; $p=0,246$)
 4 (Figura 5).

5

6 Figura 5 – Análise da expressão de cópias de mRNA para o IFN- γ R1

7



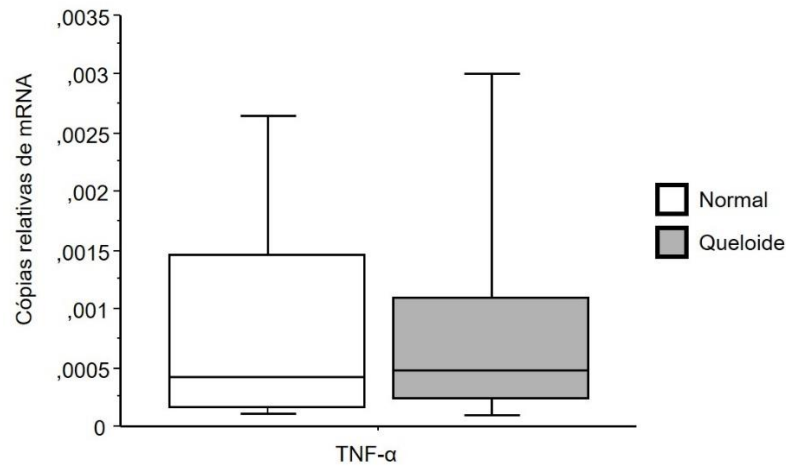
8

9 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

10 Quantidade de cópias relativas de mRNA para IFN- γ R1 presentes em biópsias de pacientes com queiloide
 11 comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a
 12 linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p<0,05$.

13

14 Ao analisar o número relativo de cópias de mRNA para o TNF- α não houve diferença
 15 significativa entre os pacientes com queiloide quando comparados com o grupo controle
 16 (Mann-Whitney; $p=0,911$) (Figura 6).

1 Figura 6 – Análise da expressão de mRNA do TNF- α 

2

3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4 Quantidade de cópias relativas de mRNA para TNF- α presentes em biópsias de pacientes com queloide
5 comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a
6 linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

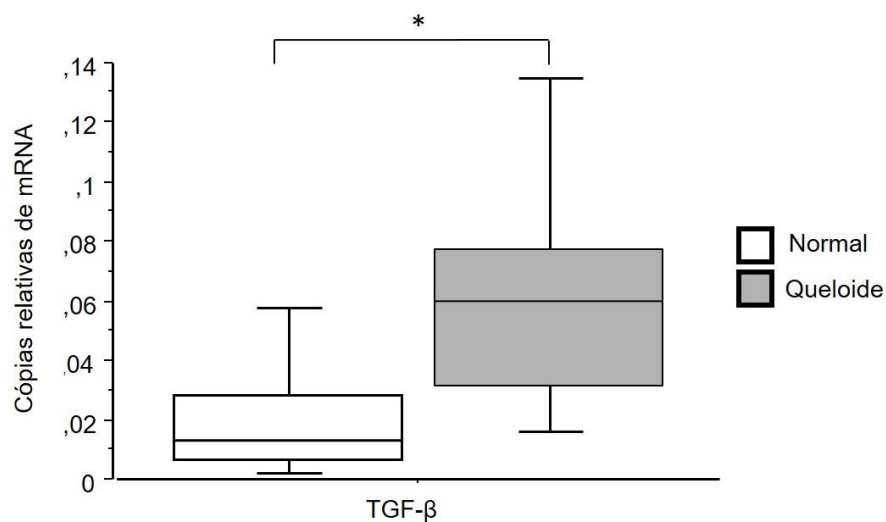
7

8 A expressão de mRNA para o TGF- β foi significativamente maior nos pacientes com
9 queloide quando comparados ao grupo controle (Mann-Whitney; $p < 0,001$) (Figura 7).

10

11 Figura 7 – Análise da expressão de cópias de mRNA para o TGF- β

12



13

14 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

15 Quantidade de cópias relativas de mRNA para TGF- β presentes em biópsias de pacientes com queloide
16 comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a
17 linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p < 0,05$.

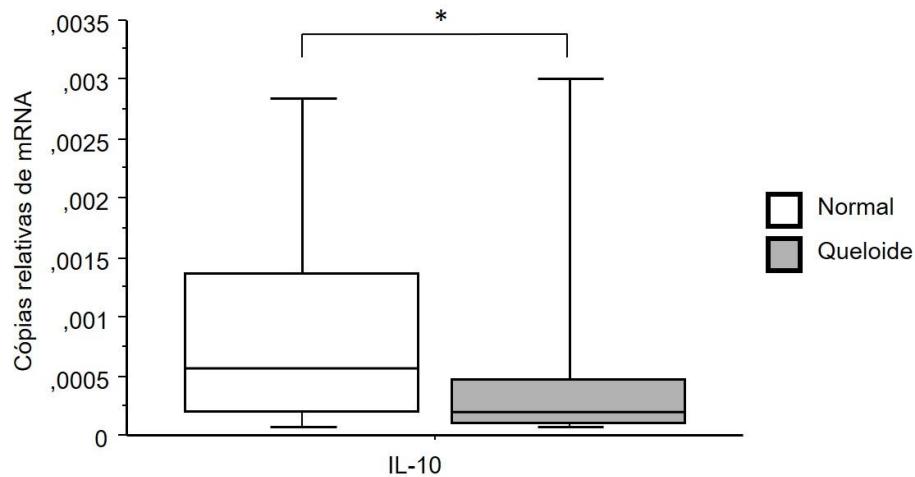
Resultados

1 Entretanto, a expressão de mRNA para IL-10 foi significativamente menor nos
 2 pacientes com queloide quando comparados aos controles (Mann-Whitney; $p=0,037$) (Figura
 3 8).

4

5 Figura 8 – Análise da expressão de cópias de mRNA para a IL-10

6



7

8 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

9 Quantidade de cópias relativas de mRNA para IL-10 presentes em biópsias de pacientes com queloide
 10 comparadas com o grupo controle. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75% e a
 11 linha vertical o percentil de 10 a 90%. $p<0,05$.

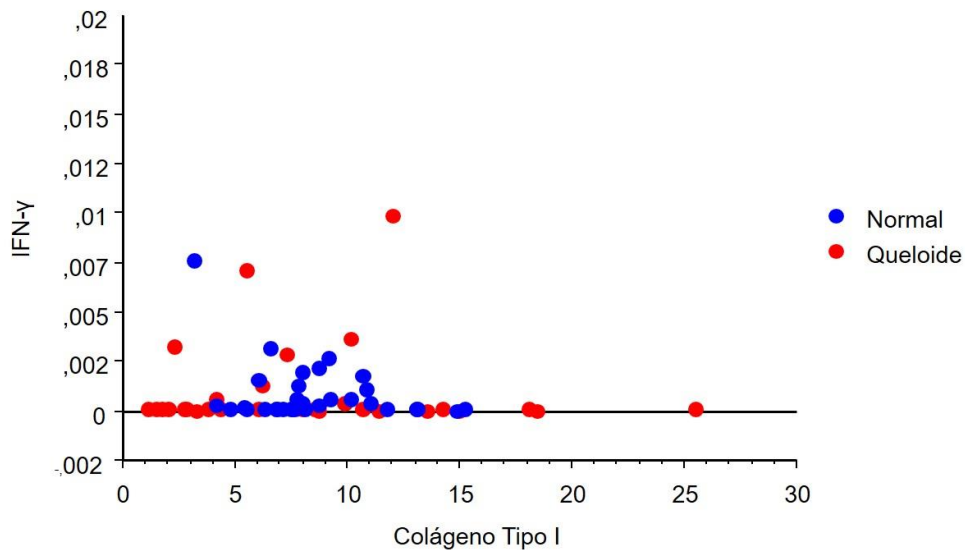
12

13 Ao analisar a correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o IFN- γ entre os
 14 grupos estudados, foi observado que não houve uma correlação significativa (Spearman;
 15 $p=0,519$, $z=-0,645$) (Figura 9).

Resultados

1 Figura 9 - Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o IFN- γ

2



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016

5 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e o número de cópias relativas de mRNA do IFN- γ em
6 pacientes com quelóide, comparadas com o grupo controle (Spearman; $p=0,519$, $z=0,645$).

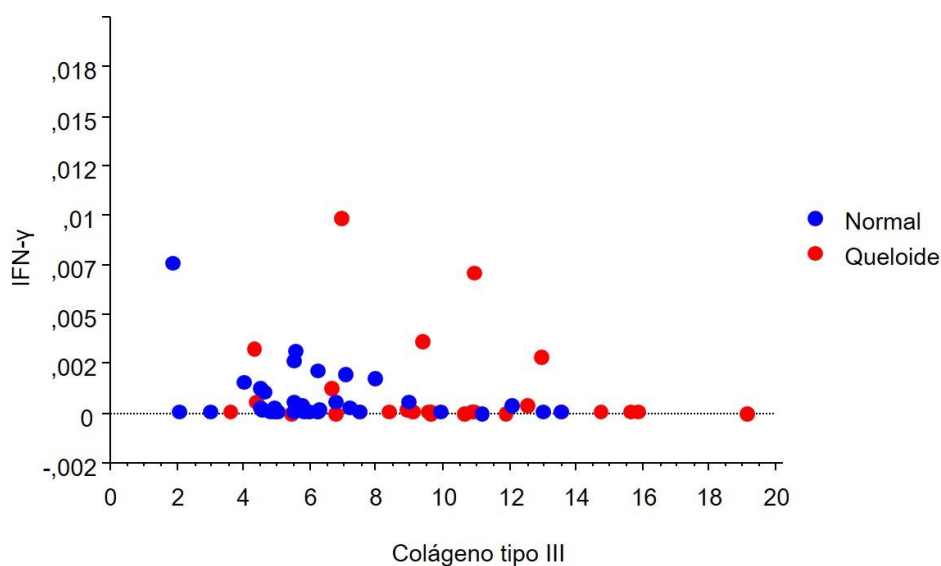
7

8 Contudo, foi encontrado uma correlação negativa e significativa entre a porcentagem
9 de colágeno tipo III e o IFN- γ entre os grupos estudados (Spearman; $p=0,015$, $z=-2,425$)
10 (Figura 10).

11

12 Figura 10: Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o IFN- γ

13



14

15 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

16 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de cópias relativas de mRNA do IFN- γ em
17 pacientes com quelóide, comparadas com o grupo controle. $p<0,05$.

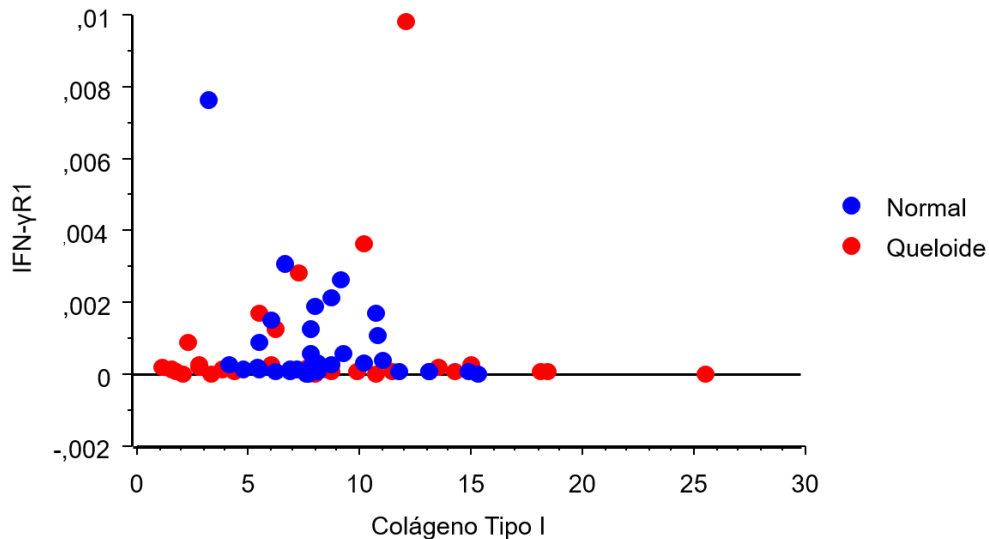
Resultados

1 Nos dois grupos analisados, ao comparar a porcentagem de colágeno tipo I e o IFN-
2 γ R1 foi observado que não houve uma correlação significativa (Spearman; $p=0,288$, $z=-$
3 $1,061$) (Figura 11).

4

5 Figura 11: Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o IFN- γ R1

6



7

8 Elaborado pelo autor, 2016.

9 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e o número de cópias relativas de mRNA do IFN- γ R1 em
10 pacientes com queloide, comparadas com o grupo controle. $p<0,05$.

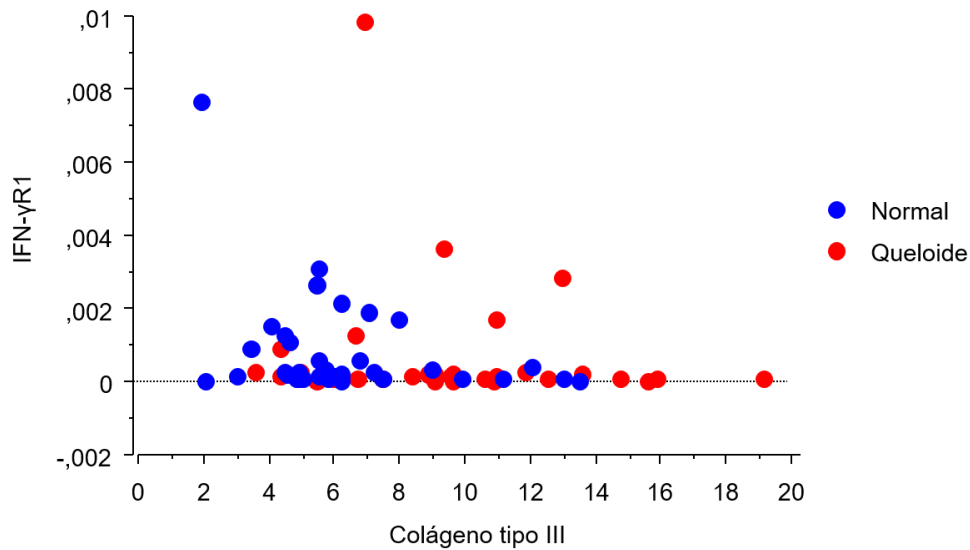
11

12 Mas foi encontrado uma correlação negativa e significativa entre a porcentagem de
13 colágeno tipo III e o IFN- γ R1 entre os dois grupos analisados (Spearman; $p=0,021$, $z=-2,303$)
14 (Figura 12).

15

Resultados

1 Figura 12: Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o IFN- γ R1
2



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

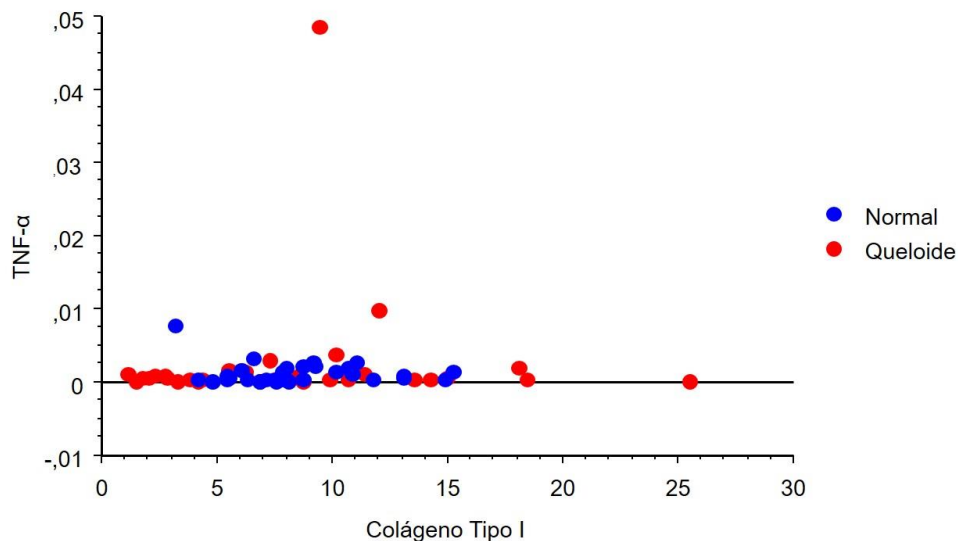
5 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de cópias relativas de mRNA do IFN- γ R1 em
6 pacientes com queloides, comparadas com o grupo controle. $p < 0,05$.

7

8 Ao comparar a porcentagem de colágeno tipo I e o TNF- α entre os grupos estudados,
9 observamos que não houve uma correlação significativa (Spearman; $p = 0,283$, $z = 1,072$)
10 (Figura 13).

11

12 Figura 13: Correlação entre porcentagem de colágeno tipo I e o TNF- α



13

14 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

15 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e o número de cópias relativas de mRNA do TNF- α em
16 pacientes com queloides, comparadas com o grupo controle. $p < 0,05$.

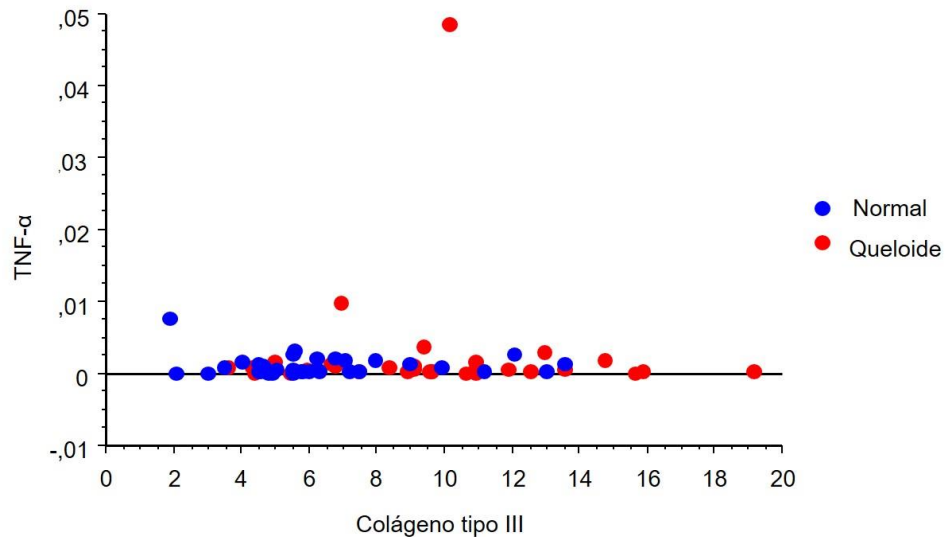
Resultados

1 Da mesma forma, não foi encontrado correlação significativa entre os grupos
 2 analisados ao comparar a porcentagem de colágeno tipo III e o TNF- α (Spearman; $p=0,555$,
 3 $z=0,590$) (Figura 14).

4

5 Figura 14: Correlação entre porcentagem de colágeno tipo III e o TNF- α

6



7

8 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

9 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de cópias relativas de mRNA do TNF- α em
 10 pacientes com queloide, comparadas com o grupo controle. $p<0,05$.

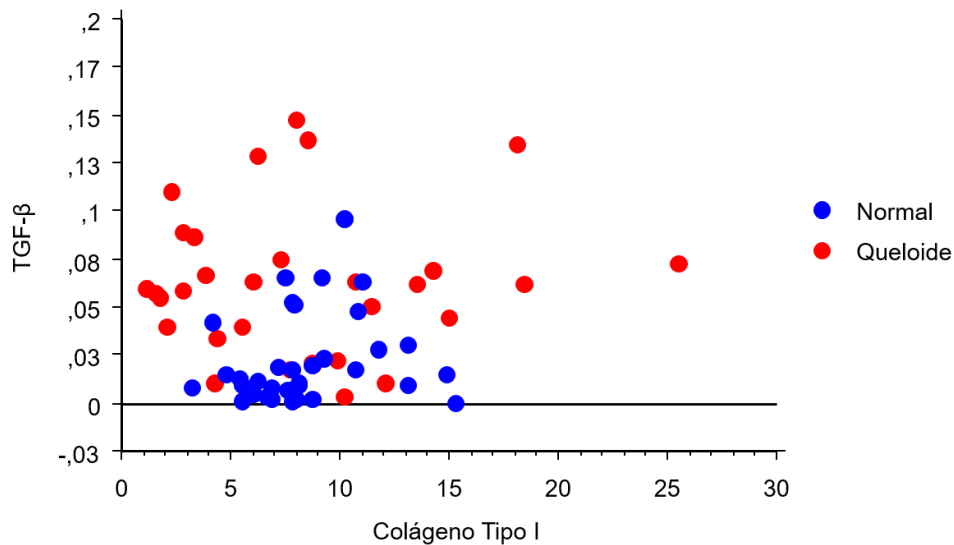
11

12 Ao comparar a porcentagem de colágeno tipo I e o TGF- β entre os grupos estudados,
 13 observamos que não houve uma correlação significativa (Spearman; $p=0,809$, $z=0,241$)
 14 (Figura 15)

Resultados

1 Figura 15 – Correlação entre TGF- β e colágeno tipo I

2



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016

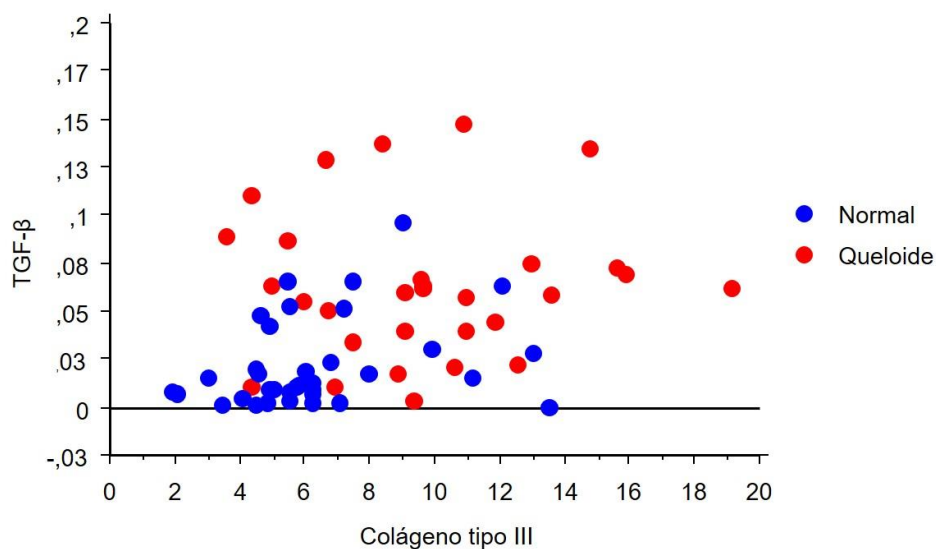
5 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e o número de cópias relativas de mRNA do TGF- β em
6 pacientes com queiloide, comparadas com o grupo controle. $p < 0,05$.

7

8 No entanto, ao analisar a relação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o TGF- β
9 entre os grupos observamos que houve uma correlação positiva e significativa (Spearman;
10 $p = 0,001$, $z = 3,210$) (Figura 16).

11

12 Figura 16 – Correlação entre TGF- β e colágeno tipo III



13

14 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

15 Figura 10 - Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de cópias relativas de mRNA do
16 TGF- β em pacientes com queiloide, comparadas com o grupo controle. $p < 0,05$.

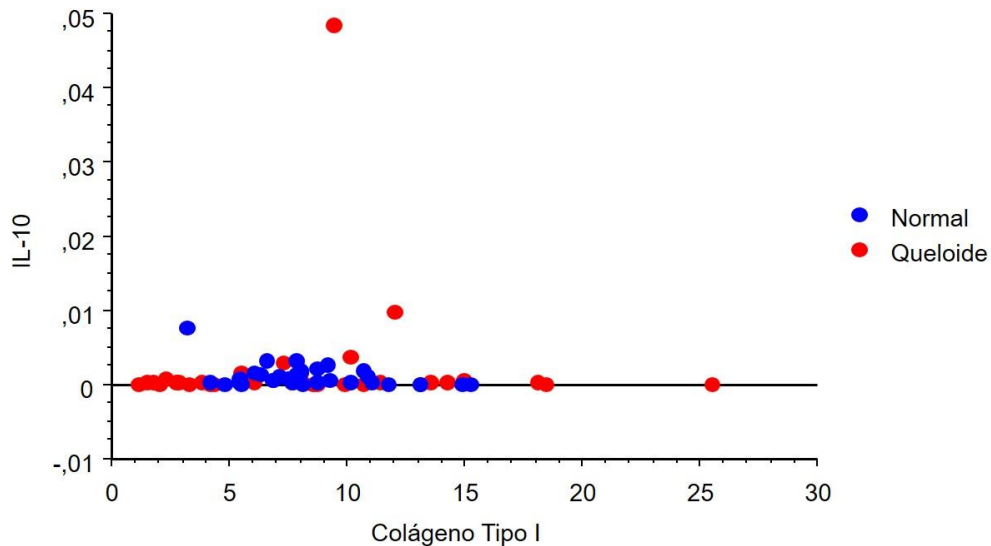
Resultados

1 Ao comparar a porcentagem de colágeno tipo I e IL-10 entre os grupos estudados,
 2 observamos que não houve uma correlação significativa (Spearman; $p=0,492$, $z=-0,686$)
 3 (Figura 13).

4

5 Figura 17 – Correlação entre IL-10 e colágeno tipo I

6



7

8

9 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

10 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e o número de cópias relativas de mRNA da IL-10 em
 11 pacientes com queiloide, comparadas com o grupo controle. $p<0,05$.

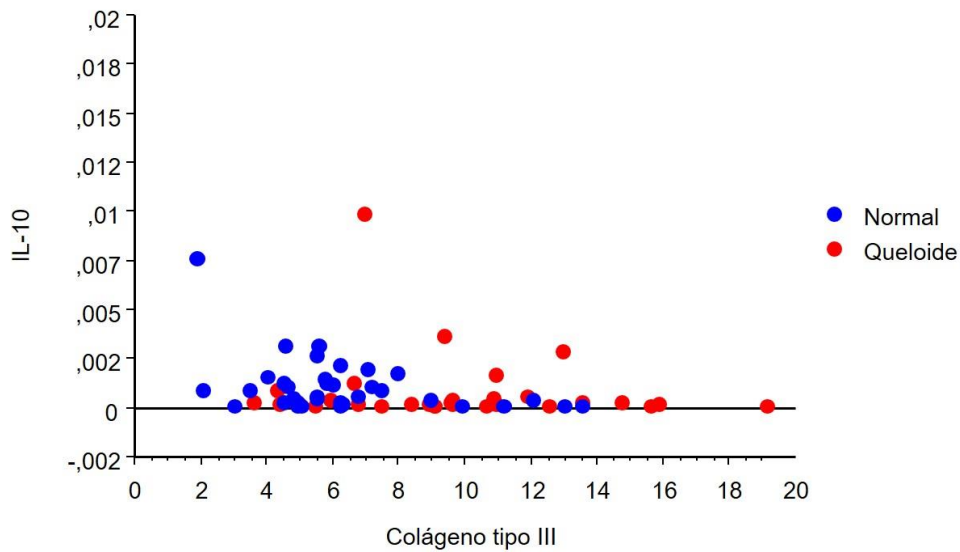
12

13 Porém, através da análise comparativa entre a porcentagem de colágeno tipo III e a IL-
 14 10 nos grupos estudados, observamos que houve uma correlação negativa e significativa
 15 (Spearman; $p=0,014$, $z=-2,445$) (Figura 18).

16

Resultados

1 Figura 18 – Correlação entre IL-10 e colágeno tipo III



2

3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

4 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de cópias relativas de mRNA da IL-10 em
5 pacientes com queiloide, comparadas com o grupo controle. $p < 0,05$.

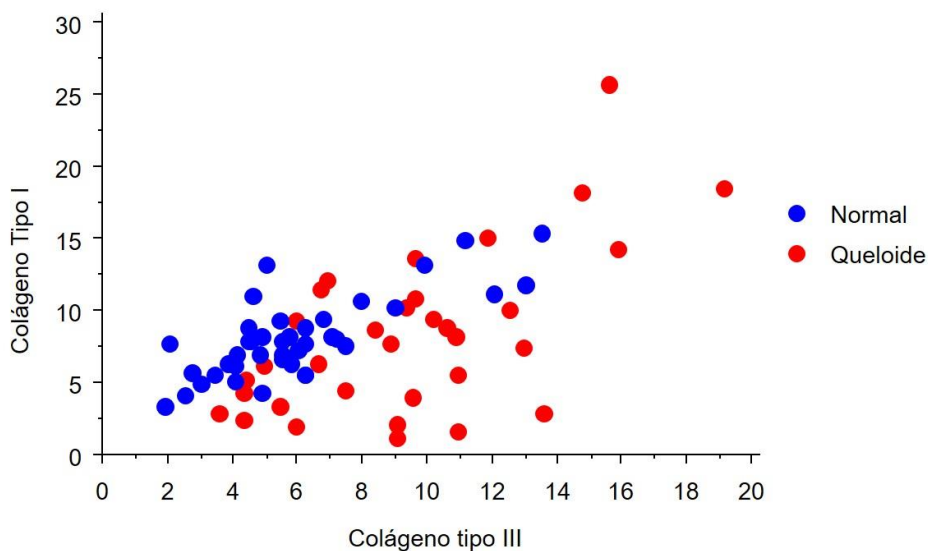
6

7 Ao analisar a comparação da porcentagem de colágeno tipo I e III entre os grupos
8 estudados, observou-se uma correlação positiva e significativa (Spearman; $p < 0,0001$,
9 $z = 4,293$) (Figura 19).

10

11 Figura 19 – Correlação entre o colágeno tipo I e colágeno tipo III

12



13

14

15 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016

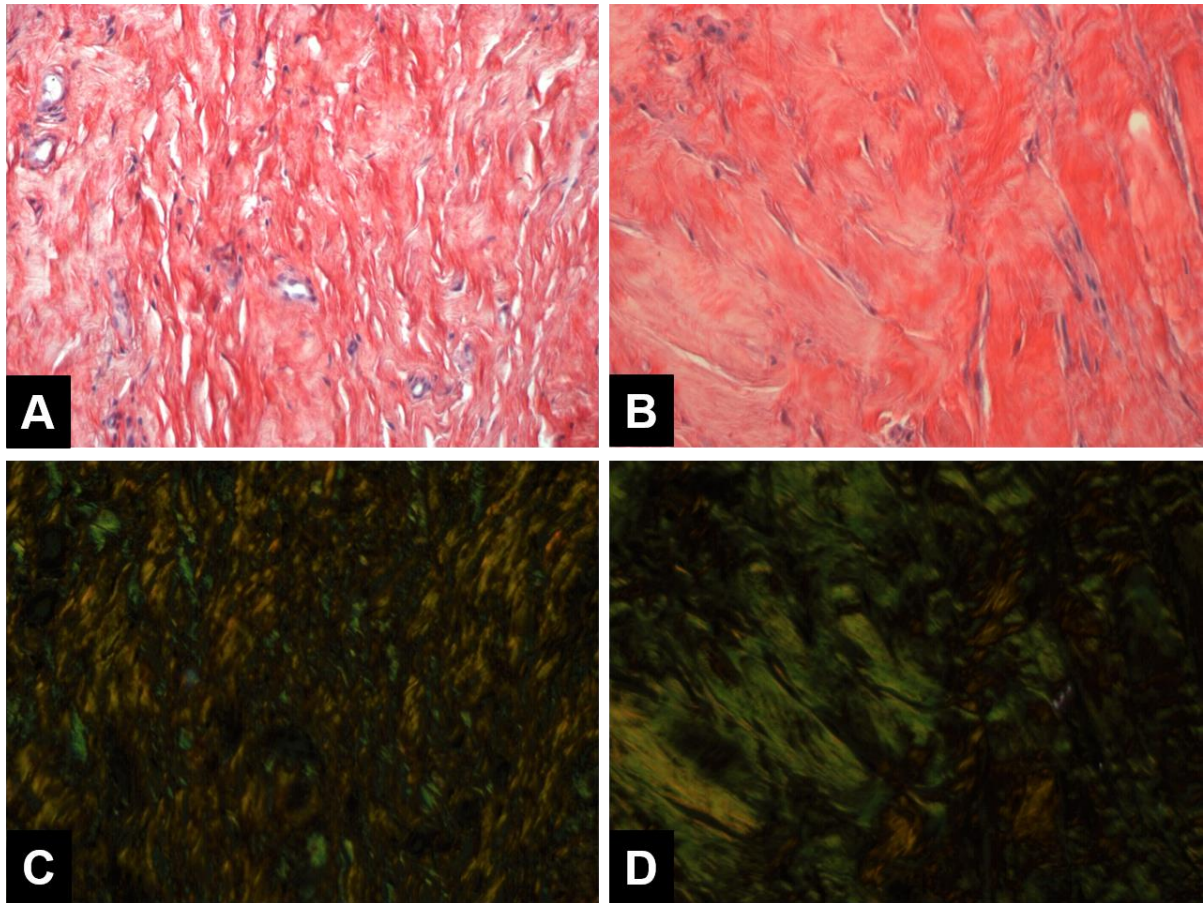
16 Correlação entre a porcentagem de colágeno tipo I e do tipo III em pacientes com queiloide, comparadas com o
17 grupo controle. $p < 0,05$.

18

Resultados

1 Prancha 1 – Análise morfométrica das fibras colágenas

2



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2016

5 A) Corte histológico de cicatriz normal corada com PS visualizado na luz comum (40x). B) Corte histológico de
6 fragmento de pele de paciente com queiloide corada com PS visualizado na luz comum (40x). C) Corte
7 histológico de cicatriz normal corado com PS e visto em luz polarizada, indicando o predomínio de colágeno
8 tipo I observado na coloração vermelho-amarelada (40x). D) Corte histológico de fragmento de pele de paciente
9 com queiloide corado com PS e visualizado em luz polarizada indicando o aumento de colágeno tipo III
10 observado na coloração esverdeada (40x).

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram avaliadas as porcentagens de colágeno total, do tipo I e do tipo III e a quantidade relativa de cópias de mRNA para TGF- β , IFN- γ , IFN- γ R1, TNF- α e IL-10 em fragmentos de queiloide comparados com cicatrizes normais.

A média de idade dos pacientes com queiloide, no presente estudo, foi de 29,15 \pm 16,45 anos, predominando o sexo feminino (60,60%) e a etnia não branca (60,60%). Semelhante aos nossos resultados, a literatura mostra que pacientes com queiloide apresentam média de idade entre 24 e 35,7 anos e o aparecimento destas lesões ocorrem entre 11 e 40 anos de idade (FURTADO et al., 2012; MEDHI et al., 2013; TANAYDIN et al., 2016). Tem sido sugerido que essa faixa etária está associada a alterações hormonais, cirurgias, traumas, maior exposição a lesões por perfurações, tais como brincos/piercings, e ainda, uma maior recidiva durante a gravidez (BERMAN; FLORES, 1997; KIM et al., 2013; SHAMSI MEYMANDI et al., 2014). Em nosso estudo, houve prevalência da etnia não branca que tem sido também relatada na literatura e estudos têm sido feitos para comprovar a presença de fatores genéticos decorrentes da hereditariedade familiar e da frequência em populações étnicas específicas comuns do queiloide (BERMAN; FLORES, 1997; BROWN et al., 2008; LANE et al., 2005).

No presente estudo o colágeno total foi significativamente maior nos pacientes com queiloide comparados ao grupo controle. Estudos comprovam que os fibroblastos do queiloide produzem mais colágeno do que os fibroblastos da pele normal e que fragmentos de queiloide apresentam um maior volume de densidade de colágeno total quando comparados ao grupo controle (ABERGEL et al., 1985; CHEN et al., 2011). Nossos resultados vão de acordo com a literatura, onde esse aumento de colágeno pode estar relacionado a vários fatores (NAITOH et al., 2001; WULANDARI et al., 2016). Acredita-se que nas lesões de queiloide há uma diminuição na produção de MMPs e um aumento na síntese TIMPs, desregulando o processo de degradação do excesso de colágeno produzido (ULRICH et al., 2010; YEH; SHEN; TAI, 2009). O excesso na síntese de colágeno está associado a superexpressão de alguns genes nos fibroblastos que também são expressos em tumores, tais como o TCTP (proteína tumoral controlada traducionalmente), gene relacionado ao MORF 15 e a Anexina A2, que podem ser responsáveis pela proliferação celular aumentada no queiloide. Há ainda, uma diminuição na atividade apoptótica dos fibroblastos, devido a uma mutação na p53 quando comparados aos fibroblastos da pele normal (DE FELICE et al., 2009; SAED et al., 1998; SATISH et al., 2006).

1 MicroRNAs tais como o miR-21, tem como alvo o gene da via de sinalização Smad7,
2 que é importante na inibição da síntese de colágeno pelos fibroblastos através da indução do
3 TGF- β . Autores mostraram através de qPCR que as expressões de mRNA para miR-21,
4 Col1A1 e Col3A1 estavam elevadas em amostras de queuloide quando comparadas ao grupo
5 controle e a expressão de Smad7 estava diminuída. Dessa forma, sugere-se que miR-21 nos
6 fibroblastos do queuloide regulam negativamente a expressão de Smad7, promovendo um
7 aumento na expressão de genes fibroproliferativos como Col1A1 e Col3A1, contribuindo para
8 a formação do queuloide (ZHOU et al., 2016). Dessa forma, vários fatores podem estar
9 envolvidos na deposição excessiva de colágeno formado no queuloide.

10 Nossos resultados mostraram que nas cicatrizes normais houve uma porcentagem
11 significativamente maior de colágeno tipo I (mais maduro) em relação ao colágeno tipo III. A
12 literatura indica que no processo de cicatrização normal, a quantidade de colágeno tipo III é
13 predominante nas fases iniciais, e durante as fases finais encontra-se os dois tipos de
14 colágeno, com predomínio significativo de colágeno do tipo I (GAY et al., 1978). A
15 conformação final da cicatrização normal ocorre devido à uma harmonização nas funções dos
16 fibroblastos, MMPs, TIMPs e citocinas que regulam o processo de degradação e produção das
17 fibras colágenas (BAINBRIDGE, 2013; BETTINGER et al., 1996; SINGER; CLARK,
18 1999).

19 Em nosso estudo foi encontrado um aumento significativo de colágeno tipo III
20 (colágeno imaturo) nos pacientes com queuloide quando comparados ao grupo controle. Uma
21 diminuição nas interligações das fibras colágenas do tipo III em queloides, parece interferir na
22 composição da MEC, dificultando sua maturação e o reestabelecimento da estabilidade
23 cicatricial, e levando desta forma, um aumento na síntese de colágeno tipo III (DI CESARE et
24 al., 1990). Em nefrite túbulointersticial experimental, foi demonstrado que o excesso de
25 colágeno do tipo III é formado por miofibroblastos, e esta célula parece ser a responsável pelo
26 aumento da síntese de mRNA α 1(III) e portanto, colaborando na formação da fibrose (TANG;
27 VAN; QI, 1997). O TGF- β 1 tem sido apontado como um importante fator de crescimento na
28 diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e esta citocina parece também inibir os
29 mecanismos de apoptose pela ativação das vias de sinalização P13K/AKT, mantendo desta
30 forma, estes miofibroblasto em atividade pró-fibrotica (GABBIANI et al., 1972;
31 KULASEKARAN et al., 2009). Estudos demonstram ainda que, os fibroblastos isolados de
32 queloides são mais sensíveis a ativação pelo TGF- β que fibroblastos de pele normais
33 (BETTINGER et al., 1996). Assim, vários fatores podem estar associados com o excesso na

1 síntese do colágeno tipo III nos queloides e o TGF- β pode ser um fator de suma importância
2 nesse estímulo, uma vez que, em nosso estudo encontramos uma correlação positiva e
3 significativa desta citocina associada com o colágeno do tipo III.

4 Em nossos resultados, a expressão de mRNA para o IFN- γ foi significativamente
5 menor nos pacientes com queleide quando comparados aos controles. A ação antifibrótica do
6 IFN- γ tem sido estudada em doenças renais, hepáticas e ainda, em queloides (OLDROYD et
7 al., 1999) (BERMAN; DUNCAN, 1989; KNIGHT et al., 2007). Em cultura de fibroblastos
8 de queleide, foi demonstrado que diferentes doses de IFN- γ não apresentaram atuação
9 antagoniza ao efeito fibrótico do TGF- β nos fibroblastos do queleide (HASEGAWA et al.,
10 2003). Em modelos experimentais, o IFN- γ foi encontrado como inibidor tanto da
11 proliferação de fibroblastos no local da lesão quanto da síntese de colágeno (MILES et al.,
12 1994; STOUT et al., 1993). Ainda, pacientes com queloides, tratados com recombinante de
13 IFN- γ intralesional, apresentaram uma redução do tamanho da lesão, diminuição da
14 quantidade de feixes de colágenos e da atividade fibroblásticas, e aumento do processo
15 inflamatório (GRANSTEIN et al., 1990). Entretanto, apesar dos efeitos anti-fibrotico, alguns
16 pacientes relataram uma dor de cabeça leve com a aplicação do IFN- γ intralesional
17 (LARRABEE et al., 1990). A sinalização do IFN- γ se inicia através da sua ligação aos seus
18 respectivos receptores, e no presente estudo, encontramos uma diminuição na expressão de
19 mRNA do IFN- γ R1 porém sem diferença significativa. Não foi encontrado na literatura uma
20 relação do IFN- γ R1 em queloides. Porém, na fibrose hepática severa, associada à infecção
21 pelo *Schistosoma mansoni*, foi demonstrado um polimorfismo no gene que codifica o IFN- γ
22 R1 e os autores sugerem que este receptor seja um dos possíveis genes candidatos no controle
23 de outras doenças fibrotica anormais (DESSEIN et al., 1999). Assim, acreditamos que uma
24 diminuição simultânea na expressão mRNA do IFN- γ e do IFN- γ R1 podem estar também
25 contribuindo para a formação de queleide, uma vez que, em nosso estudo, encontramos uma
26 correlação negativa e significativa entre a porcentagem de colágeno tipo III e o número de
27 cópias relativas de mRNA do IFN- γ e do IFN- γ R1.

28 No presente estudo, não encontramos diferença significativa no número relativo de
29 cópias de mRNA para o TNF- α nos grupos estudados. Nas fases iniciais da cicatrização, o
30 TNF- α tem papel importante, no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão e
31 ainda parece interferir na degradação do colágeno do tipo I em fragmentos de pele normal,
32 aumentando a atividade colagenolítica da MMP-1 (BIRINCIOGLU et al., 2016) (AGREN et
33 al.). Em cultura de fibroblastos humanos foi demonstrado que o TNF- α inibe tanto gene da

Discussão

1 transcrição do colágeno bem como sua síntese, de forma moderada (SOLIS-HERRUZO et al.,
2 1988). Assim, não encontramos estudos do TNF- α associados com queloides e embora esta
3 citocina seja importante no processo cicatricial, seu papel em queloides n \tilde{y} o est \tilde{a} bem
4 elucidado.

5 Ainda, no presente estudo, os pacientes com queiloide apresentaram uma express \tilde{a} o de
6 mRNA para IL-10 significativamente menor quando comparados aos controles. N \tilde{a} o foi
7 encontrado na literatura a express \tilde{a} o da IL-10 em queloides, entretanto, em cultura de
8 fibroblastos obtidas de pacientes com esclerodermia e pele normal, estimulados com IL-10,
9 foi encontrado uma diminu \tilde{c} o da express \tilde{a} o de mRNA de col \tilde{a} geno α 1(I) nos dois grupos
10 estudados. Os autores acreditam que a IL-10 pode influenciar na express \tilde{a} o de mRNA dos
11 componentes da MEC e ainda modificar o desenvolvimento de fibrose tecidual
12 (YAMAMOTO et al., 2001). Por ser uma citocina anti-inflamat \tilde{a} ria que desempenha um
13 papel importante no processo cicatricial, les \tilde{e} es induzidas em animais knockout de IL-10
14 apresentaram resposta inflamat \tilde{a} ria exacerbada e excessiva deposi \tilde{c} o de col \tilde{a} geno
15 comparados a animais normais. Dessa forma, foram feitas aplica \tilde{c} oes intralesionais desta
16 citocina em humanos, na qual resultou em melhora no aspecto cicatricial e diminu \tilde{c} o do
17 rubor da les \tilde{a} o, indicando que esta citocina pode ser uma alternativa terap \tilde{e} utica para
18 minimiza \tilde{c} o e/ou profilaxia de cicatriza \tilde{c} o exacerbada (KIERAN et al., 2013). Dessa forma,
19 nossos resultados indicam que a IL-10 pode representar um papel importante na patog \tilde{e} nese
20 do queiloide e a correla \tilde{c} o negativa e significativa entre o col \tilde{a} geno tipo III e a express \tilde{a} o de
21 IL-10 pode estar relacionada a esta baixa express \tilde{a} o de IL-10 nos queloides.

1 8. CONCLUSÃO

2
3 Pacientes com queloides apresentaram aumento significativo de colágeno total,
4 colágeno tipo III e do número de cópias de mRNA para o TGF- β , diminuição significativa na
5 expressão de IFN- γ e IL-10 e uma não diferença significativa na expressão de IFN- γ R1 e
6 TNF- α . Com estes resultados pode-se sugerir que estas citocinas podem estar auxiliando
7 diretamente na patogênese do queleide principalmente ao induzir uma cicatrização mais
8 imatura, impedindo a contração cicatricial adequada e levando a uma proliferação excessiva
9 de colágeno nestas lesões.

10 O TGF- β parece ser o maior fator de indução da ativação e proliferação dos
11 fibroblastos, sendo um alvo importante de estudos para elucidar a fisiopatologia do queleide.
12 Dessa forma, mais estudos sobre os mecanismos de ação destas citocinas devem ser
13 realizados.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012. ISBN 9788535259728.

ABERGEL, R. P. et al. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. **J Invest Dermatol**, v. 84, n. 5, p. 384-90, May 1985.

ADDISON, T. On the Keloid of Alibert, and on True Keloid. **Med Chir Trans**, v. 37, p. 27-47, 1854.

AGREN, M. S. et al. Tumor necrosis factor-alpha-accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. **Eur J Cell Biol**, v. 94, n. 1, p. 12-21, Jan 2015.

ALJADA, A. et al. Hydrocortisone suppresses intranuclear activator-protein-1 (AP-1) binding activity in mononuclear cells and plasma matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9). **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 12, p. 5988-91, Dec 2001.

ALLEN, J. P.; ART, M. M. O. **The Art of Medicine in Ancient Egypt**. Metropolitan Museum of Art, 2005. ISBN 9781588391704.

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.

ARDA, O.; GOKSUGUR, N.; TUZUN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin Dermatol**, v. 32, n. 1, p. 3-13, Jan-Feb 2014.

BACH, E. A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R. D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 563-91, 1997.

BAILEY, A. J. et al. Characterization of the collagen of human hypertrophic and normal scars. **Biochim Biophys Acta**, v. 405, n. 2, p. 412-21, Oct 20 1975.

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblasts. **J Wound Care**, v. 22, n. 8, p. 407-8, 410-12, Aug 2013.

BANGERT, C.; BRUNNER, P. M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol**, v. 29, n. 4, p. 360-76, Jul-Aug 2011.

BASHIR, M. M. et al. Comparison of single intra operative versus an intra operative and two post operative injections of the triamcinolone after wedge excision of keloids of helix. **J Pak Med Assoc**, v. 65, n. 7, p. 737-41, Jul 2015.

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

BERMAN, B.; DUNCAN, M. R. Short-term keloid treatment in vivo with human interferon alfa-2b results in a selective and persistent normalization of keloidal fibroblast collagen, glycosaminoglycan, and collagenase production in vitro. **J Am Acad Dermatol**, v. 21, n. 4 Pt 1, p. 694-702, Oct 1989.

Referências Bibliográficas

- BERMAN, B.; FLORES, F. Recurrence rates of excised keloids treated with postoperative triamcinolone acetonide injections or interferon alfa-2b injections. **J Am Acad Dermatol**, v. 37, n. 5 Pt 1, p. 755-7, Nov 1997.
- BERMAN, B. et al. A novel hydrogel scaffold for the prevention or reduction of the recurrence of keloid scars postsurgical excision. **J Am Acad Dermatol**, v. 69, n. 5, p. 828-30, Nov 2013.
- 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.
- BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; MARTIN, T. J. **Principles of Bone Biology**. Elsevier Science, 2008. ISBN 9780080568751.
- BIRINCIOLU, I. et al. Determination of skin wound age by using cytokines as potential markers. **J Forensic Leg Med**, v. 44, p. 14-19, Aug 24 2016.
- BOCK, O. et al. Quality of life of patients with keloid and hypertrophic scarring. **Arch Dermatol Res**, v. 297, n. 10, p. 433-8, Apr 2006.
- BOOTH, B. A.; POLAK, K. L.; UITTO, J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts. I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. **Biochim Biophys Acta**, v. 607, n. 1, p. 145-60, Mar 28 1980.
- BRADLEY, J. R.; POBER, J. S. Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions. **Lab Invest**, v. 75, n. 4, p. 463-72, Oct 1996.
- BROKER, B. J. et al. Keloid excision and recurrence prophylaxis via intradermal interferon-gamma injections: a pilot study. **Laryngoscope**, v. 106, n. 12 Pt 1, p. 1497-501, Dec 1996.
- BROUGHTON, G., 2ND; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg**, v. 117, n. 7 Suppl, p. 12S-34S, Jun 2006.
- 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.
- CALDERON, M.; LAWRENCE, W. T.; BANES, A. J. Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. **J Surg Res**, v. 61, n. 2, p. 343-7, Mar 1996.
- CAMACHO-MARTINEZ, F. M. et al. Results of a combination of bleomycin and triamcinolone acetonide in the treatment of keloids and hypertrophic scars. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 3, p. 387-94, May-Jun 2013.
- CARROLL, L. A. et al. Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. **Dermatol Surg**, v. 28, n. 8, p. 704-9, Aug 2002.
- CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 9, p. 3666-70, Sep 1975.

Referências Bibliográficas

- 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.
- CAVALIE, M. et al. Treatment of keloids with laser-assisted topical steroid delivery: a retrospective study of 23 cases. **Dermatol Ther**, v. 28, n. 2, p. 74-8, Mar-Apr 2015.
- CHEN, J. et al. Multiphoton microscopy study of the morphological and quantity changes of collagen and elastic fiber components in keloid disease. **J Biomed Opt**, v. 16, n. 5, p. 051305, May 2011.
- 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.
- COELHO-LEMOS, I. C. et al. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, n. 4, p. 241-4; discussion 245, Jul-Aug 2004.
- DARNELL, J. E., JR.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415-21, Jun 3 1994.
- DE BOSSCHER, K. et al. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 25, p. 13504-9, Dec 9 1997.
- DE FELICE, B. et al. Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts. **Mol Cell Biochem**, v. 327, n. 1-2, p. 191-201, Jul 2009.
- DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. **Nature**, v. 425, n. 6958, p. 577-84, Oct 9 2003.
- DESSEIN, A. J. et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 3, p. 709-21, Sep 1999.
- DI CESARE, P. E. et al. Alteration of collagen composition and cross-linking in keloid tissues. **Matrix**, v. 10, n. 3, p. 172-8, Jul 1990.
- DOORNBOOS, J. F. et al. The role of kilovoltage irradiation in the treatment of keloids. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 18, n. 4, p. 833-9, Apr 1990.
- DRYDEN, S. V.; SHOEMAKER, W. G.; KIM, J. H. Wound management and nutrition for optimal wound healing. **Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 21, n. 1, p. 37-47, Mar 2013.
- DUNCAN, M. R.; BERMAN, B. Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **J Exp Med**, v. 162, n. 2, p. 516-27, Aug 1 1985.
- EALICK, S. E. et al. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. **Science**, v. 252, n. 5006, p. 698-702, May 3 1991.

Referências Bibliográficas

- EHRlich, H. P. et al. Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar. **Am J Pathol**, v. 145, n. 1, p. 105-13, Jul 1994.
- EMING, S. A. et al. Accelerated wound closure in mice deficient for interleukin-10. **Am J Pathol**, v. 170, n. 1, p. 188-202, Jan 2007.
- FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 571-611, 1993.
- FORE, J. A review of skin and the effects of aging on skin structure and function. **Ostomy Wound Manage**, v. 52, n. 9, p. 24-35; quiz 36-7, Sep 2006.
- FRANSSON, J. et al. Proliferation and interferon-gamma receptor expression in psoriatic and healthy keratinocytes are influenced by interactions between keratinocytes and fibroblasts in a skin equivalent model. **Arch Dermatol Res**, v. 287, n. 6, p. 517-23, 1995.
- 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.
- GABBIANI, G. et al. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. **J Exp Med**, v. 135, n. 4, p. 719-34, Apr 1 1972.
- GARNER, W. L. et al. Phenotypic differences in cytokine responsiveness of hypertrophic scar versus normal dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v. 101, n. 6, p. 875-9, Dec 1993.
- GARTNER, L. **Tratado de Histologia**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2011. ISBN 9788535245783.
- GAUGLITZ, G. G. et al. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. **Mol Med**, v. 17, n. 1-2, p. 113-25, Jan-Feb 2011.
- GAY, S. et al. Collagen types in early phases of wound healing in children. **Acta Chir Scand**, v. 144, n. 4, p. 205-11, 1978.
- GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, n. 12, p. 1531-46, Nov 28 2003.
- GRANSTEIN, R. D. et al. A controlled trial of intralesional recombinant interferon-gamma in the treatment of keloidal scarring. Clinical and histologic findings. **Arch Dermatol**, v. 126, n. 10, p. 1295-302, Oct 1990.
- GRINNELL, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. **J Cell Biol**, v. 124, n. 4, p. 401-4, Feb 1994.
- GUPTA, S.; KUMAR, B. Intralesional cryosurgery using lumbar puncture and/or hypodermic needles for large, bulky, recalcitrant keloids. **Int J Dermatol**, v. 40, n. 5, p. 349-53, May 2001.
- HASEGAWA, T. et al. IFN-gamma fails to antagonize fibrotic effect of TGF-beta on keloid-derived dermal fibroblasts. **J Dermatol Sci**, v. 32, n. 1, p. 19-24, Jun 2003.

Referências Bibliográficas

- HUANG, L. et al. A study of the combination of triamcinolone and 5-fluorouracil in modulating keloid fibroblasts in vitro. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 66, n. 9, p. e251-9, Sep 2013.
- HUERRE, C. et al. Human type I procollagen genes are located on different chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 79, n. 21, p. 6627-30, Nov 1982.
- HUNASGI, S. et al. Keloid: A case report and review of pathophysiology and differences between keloid and hypertrophic scars. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 17, n. 1, p. 116-20, Jan 2013.
- ISHIDA, Y. et al. The essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TGF-beta in the skin wound-healing process. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1848-55, Feb 1 2004.
- JIN, Z. Increased c-Met phosphorylation is related to keloid pathogenesis: implications for the biological behaviour of keloid fibroblasts. **Pathology**, v. 46, n. 1, p. 25-31, Jan 2014.
- JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J**, v. 11, n. 4, p. 447-55, Jul 1979.
- KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, Jul-Aug 2002.
- KASSAB, A. N.; EL KHARBOTLY, A. Management of ear lobule keloids using 980-nm diode laser. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 269, n. 2, p. 419-23, Feb 2012.
- KEAST, D. H.; ORSTED, H. The basic principles of wound care. **Ostomy Wound Manage**, v. 44, n. 8, p. 24-8, 30-1, Aug 1998.
- KIERAN, I. et al. Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: results of two preclinical and phase II randomized control studies. **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 3, p. 428-36, May-Jun 2013.
- KIM, H. D. et al. Recurrent Auricular Keloids during Pregnancy. **Arch Plast Surg**, v. 40, n. 1, p. 70-2, Jan 2013.
- KNIGHT, B. et al. Interferon-gamma exacerbates liver damage, the hepatic progenitor cell response and fibrosis in a mouse model of chronic liver injury. **J Hepatol**, v. 47, n. 6, p. 826-33, Dec 2007.
- 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.
- 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.
- LARRABEE, W. F., JR. et al. Intralesional interferon gamma treatment for keloids and hypertrophic scars. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 116, n. 10, p. 1159-62, Oct 1990.
- LATTOUF, R. et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 62, n. 10, p. 751-8, Oct 2014.

Referências Bibliográficas

- LEE, T. Y. et al. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. **Ann Plast Surg**, v. 43, n. 2, p. 179-84, Aug 1999.
- LEE, Y. S. et al. Keloid-derived, plasma/fibrin-based skin equivalents generate de novo dermal and epidermal pathology of keloid fibrosis in a mouse model. **Wound Repair Regen**, v. 24, n. 2, p. 302-16, Mar 2016.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin Dermatol**, v. 25, n. 1, p. 9-18, Jan-Feb 2007.
- LIU, Y. et al. TGF-beta1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via up-regulating MicroRNA-21. **Sci Rep**, v. 6, p. 32231, 2016.
- 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.
- LUAN, Y. et al. Serum miRNAs Signature Plays an Important Role in Keloid Disease. **Curr Mol Med**, v. 16, n. 5, p. 504-14, 2016.
- MANCA, G. et al. Treatment of keloids and hypertrophic scars with bleomycin and electroporation. **Plast Reconstr Surg**, v. 132, n. 4, p. 621e-630e, Oct 2013.
- 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.
- MECHAM, R. P. Overview of extracellular matrix. **Curr Protoc Cell Biol**, v. Chapter 10, p. Unit 10 1, Dec 2012.
- MEDHI, B. et al. Efficacy and safety of an advanced formula silicone gel for prevention of post-operative scars. **Dermatol Ther (Heidelb)**, v. 3, n. 2, p. 157-67, Dec 2013.
- MILES, R. H. et al. Systemic administration of interferon-gamma impairs wound healing. **J Surg Res**, v. 56, n. 3, p. 288-94, Mar 1994.
- MOLINAS, F. C.; WIETZERBIN, J.; FALCOFF, E. Human platelets possess receptors for a lymphokine: demonstration of high specific receptors for H₁FN-gamma. **J Immunol**, v. 138, n. 3, p. 802-6, Feb 1 1987.
- MONTAGNA, W. Comparative anatomy and physiology of the skin. **Arch Dermatol**, v. 96, n. 4, p. 357-63, Oct 1967.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 165-90, 1993.
- MOUSTAFA, M. F.; ABDEL-FATTAH, M. A.; ABDEL-FATTAH, D. C. Presumptive evidence of the effect of pregnancy estrogens on keloid growth. Case report. **Plast Reconstr Surg**, v. 56, n. 4, p. 450-3, Oct 1975.
- MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens and collagen-related diseases. **Ann Med**, v. 33, n. 1, p. 7-21, Feb 2001.

Referências Bibliográficas

- NAITOH, M. et al. Upregulation of HSP47 and collagen type III in the dermal fibrotic disease, keloid. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 5, p. 1316-22, Feb 9 2001.
- 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.
- OLDROYD, S. D. et al. Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis. **Kidney Int**, v. 56, n. 6, p. 2116-27, Dec 1999.
- OMO-DARE, P. Yoruban contributions to the literature on keloids. **J Natl Med Assoc**, v. 65, n. 5, p. 367-72 passim, Sep 1973.
- PERANTEAU, W. H. et al. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 7, p. 1852-60, Jul 2008.
- PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 403-34, 1995.
- RAPALA, K. The effect of tumor necrosis factor-alpha on wound healing. An experimental study. **Ann Chir Gynaecol Suppl**, v. 211, p. 1-53, 1996.
- REZENDE, S. A. et al. Mice lacking the gamma interferon receptor have an impaired granulomatous reaction to *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, v. 65, n. 8, p. 3457-61, Aug 1997.
- RICARD-BLUM, S.; RUGGIERO, F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. **Pathol Biol (Paris)**, v. 53, n. 7, p. 430-42, Sep 2005.
- ROBERTS, A. B. et al. Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 327, n. 1239, p. 145-54, Mar 12 1990.
- ROSENBLOOM, J. et al. Transcriptional control of human diploid fibroblast collagen synthesis by gamma-interferon. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, n. 1, p. 365-72, Aug 30 1984.
- SAED, G. M. et al. Analysis of p53 gene mutations in keloids using polymerase chain reaction-based single-strand conformational polymorphism and DNA sequencing. **Arch Dermatol**, v. 134, n. 8, p. 963-7, Aug 1998.
- SATISH, L. et al. Gene expression patterns in isolated keloid fibroblasts. **Wound Repair Regen**, v. 14, n. 4, p. 463-70, Jul-Aug 2006.
- SATO, Y.; OHSHIMA, T.; KONDO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 265, n. 1, p. 194-9, Nov 1999.
- 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.

Referências Bibliográficas

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.

SCHMIDT, C. et al. Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. **J Biol Chem**, v. 273, n. 9, p. 5081-5, Feb 27 1998.

SEO, S. H.; SUNG, H. W. Treatment of keloids and hypertrophic scars using topical and intralesional mitomycin C. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 5, p. 634-8, May 2012.

SHAH, M.; FOREMAN, D. M.; FERGUSON, M. W. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 3), p. 985-1002, Mar 1995.

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.

SHEN, J. et al. Hypofractionated electron-beam radiation therapy for keloids: retrospective study of 568 cases with 834 lesions. **J Radiat Res**, v. 56, n. 5, p. 811-7, Sep 2015.

SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. **J Clin Invest**, v. 51, n. 8, p. 2009-23, Aug 1972.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 738-46, Sep 2 1999.

SOLIS-HERRUZO, J. A.; BRENNER, D. A.; CHOJKIER, M. Tumor necrosis factor alpha inhibits collagen gene transcription and collagen synthesis in cultured human fibroblasts. **J Biol Chem**, v. 263, n. 12, p. 5841-5, Apr 25 1988.

SOLOMON, E. et al. Chromosomal assignments of the genes coding for human types II, III, and IV collagen: a dispersed gene family. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 10, p. 3330-4, May 1985.

SON, I. P. et al. Pilot Study of the Efficacy of 578 nm Copper Bromide Laser Combined with Intralesional Corticosteroid Injection for Treatment of Keloids and Hypertrophic Scars. **Ann Dermatol**, v. 26, n. 2, p. 156-61, Apr 2014.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am J Surg**, v. 176, n. 2A Suppl, p. 26S-38S, Aug 1998.

STOUT, A. J.; GRESSER, I.; THOMPSON, W. D. Inhibition of wound healing in mice by local interferon alpha/beta injection. **Int J Exp Pathol**, v. 74, n. 1, p. 79-85, Feb 1993.

SUAREZ, E. et al. Skin equivalent tensional force alters keloid fibroblast behavior and phenotype. **Wound Repair Regen**, v. 22, n. 5, p. 557-68, Sep-Oct 2014.

SYTO, R. et al. Structural and biological stability of the human interleukin 10 homodimer. **Biochemistry**, v. 37, n. 48, p. 16943-51, Dec 1 1998.

Referências Bibliográficas

- TAKEHARA, K. Growth regulation of skin fibroblasts. **J Dermatol Sci**, v. 24 Suppl 1, p. S70-7, Dec 2000.
- 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.
- TANG, W. W.; VAN, G. Y.; QI, M. Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. **Kidney Int**, v. 51, n. 3, p. 926-31, Mar 1997.
- TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. M.; MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. **Injury**, v. 37 Suppl 1, p. S5-12, Apr 2006.
- TUAN, T. L.; NICHTER, L. S. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. **Mol Med Today**, v. 4, n. 1, p. 19-24, Jan 1998.
- UD-DIN, S. et al. Photodynamic therapy: an innovative approach to the treatment of keloid disease evaluated using subjective and objective non-invasive tools. **Arch Dermatol Res**, v. 305, n. 3, p. 205-14, Apr 2013.
- UITTO, J. et al. Altered steady-state ratio of type I/III procollagen mRNAs correlates with selectively increased type I procollagen biosynthesis in cultured keloid fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 17, p. 5935-9, Sep 1985.
- ULRICH, D. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 6, p. 1015-21, Jun 2010.
- VALENTE, G. et al. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 9, p. 2403-12, Sep 1992.
- VARGA, J.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S. A. Transforming growth factor beta (TGF beta) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. **Biochem J**, v. 247, n. 3, p. 597-604, Nov 1 1987.
- VERHAEGEN, P. D. et al. Differences in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. **Wound Repair Regen**, v. 17, n. 5, p. 649-56, Sep-Oct 2009.
- VON DER MARK, K. Localization of collagen types in tissues. **Int Rev Connect Tissue Res**, v. 9, p. 265-324, 1981.
- WANG, G. et al. Role of IL-17 and TGF-beta in peritoneal adhesion formation after surgical trauma. **Wound Repair Regen**, v. 22, n. 5, p. 631-9, Sep-Oct 2014.
- WANG, H.; LUO, S. Establishment of an animal model for human keloid scars using tissue engineering method. **J Burn Care Res**, v. 34, n. 4, p. 439-46, Jul-Aug 2013.
- WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **J Cell Biol**, v. 110, n. 1, p. 133-45, Jan 1990.

Referências Bibliográficas

- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**, v. 83, n. 3, p. 835-70, Jul 2003.
- WILLIAMS, M. A. **Autoradiography and immunocytochemistry. Quantitative methods in biology.** North-Holland, 1977.
- WILSON, A. M. Eradication of keloids: Surgical excision followed by a single injection of intralesional 5-fluorouracil and botulinum toxin. **Can J Plast Surg**, v. 21, n. 2, p. 87-91, Summer 2013.
- WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am**, v. 77, n. 3, p. 509-28, Jun 1997.
- WORLEY, C. A. The wound healing process symphony: Part I. **Dermatol Nurs**, v. 16, n. 1, p. 67, 72, Feb 2004.
- WULANDARI, E. et al. Expressions of Collagen I and III in Hypoxic Keloid Tissue. **Kobe J Med Sci**, v. 62, n. 3, p. E58-69, 2016.
- WYSOCKI, A. B. Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. **Nurs Clin North Am**, v. 34, n. 4, p. 777-97, v, Dec 1999.
- XU, J. et al. A three-dimensional collagen lattice activates NF-kappaB in human fibroblasts: role in integrin alpha2 gene expression and tissue remodeling. **J Cell Biol**, v. 140, n. 3, p. 709-19, Feb 9 1998.
- YAMAMOTO, T.; ECKES, B.; KRIEG, T. Effect of interleukin-10 on the gene expression of type I collagen, fibronectin, and decorin in human skin fibroblasts: differential regulation by transforming growth factor-beta and monocyte chemoattractant protein-1. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 281, n. 1, p. 200-5, Feb 16 2001.
- YEH, F. L.; SHEN, H. D.; TAI, H. Y. Decreased production of MCP-1 and MMP-2 by keloid-derived fibroblasts. **Burns**, v. 35, n. 3, p. 348-51, May 2009.
- YING, S. et al. TNF alpha mRNA expression in allergic inflammation. **Clin Exp Allergy**, v. 21, n. 6, p. 745-50, Nov 1991.
- YOUNAI, S. et al. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. **Ann Plast Surg**, v. 33, n. 2, p. 148-51, Aug 1994.
- ZHANG, G. Y. et al. Role of caveolin-1 in the pathogenesis of tissue fibrosis by keloid-derived fibroblasts in vitro. **Br J Dermatol**, v. 164, n. 3, p. 623-7, Mar 2011.
- ZHOU, R. et al. miR-21 promotes collagen production in keloid via Smad7. **Burns**, Oct 4 2016.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFTM**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Análise de polimorfismos genéticos e da expressão de citocinas, metaloproteases e inibidores de metaloproteases em queloides e cicatrizes hipertróficas.

Pesquisador: Virmondes Rodrigues Junior

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 4

CAAE: 45647315.4.0000.5154

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.754.375

Apresentação do Projeto:

Pesquisador solicita a inclusão do pesquisador Dr. Alberto Borges Peixoto e do Hospital Universitário Mário Palmério, da Universidade de Uberaba como ponto de recrutamento de pacientes, restrito à formação do grupo controle. O material será coletado através dos mesmos procedimentos descritos para a UFTM, ou seja, no momento da realização da segunda cesariana, onde se faz normalmente a retirada de toda a cicatriz da cirurgia anterior.

Objetivo da Pesquisa:

solicitação de inclusão de pesquisador e local de coleta.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

sem alterações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem alterações

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

apresentado memorando justificando as inclusões, bem como a autorização do local de coleta.

Endereço: Rua Madre Maria José, 122

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-100

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6776

E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 1.754.375

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado em reunião do colegiado do CEP em 30/09/2016.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_799884 E1.pdf	26/09/2016 14:33:07		Aceito
Outros	Carta_MPHU_Galvani_Agrelli.pdf	26/09/2016 14:19:40	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	Carta_de_emenda.docx	26/09/2016 14:18:47	Virmondes Rodrigues Junior	Aceito
Outros	Detalhamento de alterações.pdf	12/07/2015 23:20:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEP-Queloides-oficial - plataformabrasil com destaque de alterações.pdf	12/07/2015 23:19:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento livre e esclarecido queloides com destaque de alterações.pdf	12/07/2015 23:18:33		Aceito
Outros	Autorização Resp. Amb. Maria da Glória.pdf	03/07/2015 10:53:53		Aceito
Outros	Autorização de projeto de pesquisa pela gerência do HC-UFTM.pdf	03/07/2015 10:37:47		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	14/05/2015 10:19:52		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 30 de Setembro de 2016

Assinado por:

Mary Aparecida Spadotto Balarin
(Coordenador)

Endereço: Rua Madre Maria José, 122
 Bairro: Nossa Sra. Abadia CEP: 38.025-100
 UF: MG Município: UBERABA
 Telefone: (34)3700-6776 E-mail: cep@pesqpg.uftm.edu.br

ANEXO B – 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 quelóide, 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 quelóide 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 APÓS ESCLARECIMENTO

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

 Documento de Identidade

 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.