

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Isabela Rios da Silva

**Avaliação de mastócitos e da expressão imunohistoquímica de marcadores de Triptase,
HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 em cicatrizes de queiloide**

Uberaba - MG
2023

Isabela Rios da Silva

Avaliação de mastócitos e da expressão imunohistoquímica de marcadores de Triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 em cicatrizes de queiloide

Tese 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 Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Junior

UBERABA - MG
2023

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

S58a Silva, Isabela Rios da
Avaliação de mastócitos e da expressão imunohistoquímica de marcadores de Triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 em cicatrizes de queiloide / Isabela Rios da Silva. – 2023.
80 f.: il., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023

Orientadora: Profa. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Coorientador: Virmondes Rodrigues Junior

1. Queiloide. 2. Imuno-histoquímica. 3. Mastócitos. 4. Triptases. 5. Metaloproteinases da matriz. 6. Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia. I. Rodrigues, Denise Bertulucci Rocha. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.5-003.92

ISABELA RIOS DA SILVA

Avaliação de mastócitos e da expressão imunohistoquímica de marcadores de Triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 em cicatrizes de queuloide

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 Doutora em Ciências da Saúde.

Uberaba-MG, 13 de abril de 2023.

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Denise Bertulucci Rocha Rodrigues - Orientadora

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^ª Dr^ª Marcos Vinicius da Silva

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^ª Dr^ª Helioswilton Sales de Campos

Universidade Federal de Goiás

Prof^ª Dr^ª Thaís Soares Farnesi de Assunção

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^ª Dr^ª Geraldo Thedei Junior

Universidade de Uberaba

Dedico este trabalho a meus pais Roberto e Julcimara e meus avós Neuza, Eurípedes e Cora por todo amor, carinho e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me dar forças durante essa trajetória e por se mostrar presente em todos os momentos de minha vida.

Aos meus queridos pais **Roberto e Julcimara**, pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim e não medirem esforços para me ajudar na realização dos 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.

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 **Virmond**es por todos os momentos que me recebeu com toda atenção e carinho, repassando seu conhecimento toda paciência e humildade.

À minha amiga **Poliana**, pela confiança, oportunidade e por ser responsável pelo meu primeiro contato com minha orientadora Denise.

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, Marcela, Christiane, Ana Carolina, Jonatas, Lucila, Lorena, Maria, Paula, Thaís, Arun, Maria Luiza, Tamires, Wesley, Chamberttan, Lara, Rafael, Leandro, João Paulo, Cleyson, Guilherme, Cecília, Rodolfo, Siomar e César** por todos os momentos de alegrias, troca de informações e conhecimentos e por 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 este trabalho não 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), Centro de Educação Profissional (CEFORES) 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 (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

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

Queloides são considerados tumores fibroproliferativos benignos, caracterizados pelo ambiente inflamatório, crescimento além das bordas da cicatriz inicial e formação fibrótica importante. Sua fisiopatologia ainda não está totalmente elucidada, dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar *in situ* a presença de mastócitos e a imunomarcagem para triptase, fator indutor de hipóxia-1 α (HIF-1 α), metaloproteinase de membrana tipo 1 (MT1-MMP), inibidor de metaloproteinase tipo 3 (TIMP-3) e inibidor de metaloproteinase tipo 4 (TIMP-4) em queloides comparados aos controles. Dezesete biópsias de queleide foram analisadas e fragmentos de cicatrizes normais retiradas de pacientes secundíparas ou múltíparas durante cesariana foram usadas como controles. Foi realizada coloração de azul de toluidina para avaliar a presença de mastócitos e imuno-histoquímica com anticorpos anti-triptase, anti-HIF-1 α , anti-MT1-MMP, anti-TIMP-3 e anti-TIMP-4. Resultados demonstraram predominância do sexo feminino, etnia não branca, descendência não branca direta e localização da lesão em lóbulo da orelha. Os queloides demonstraram um aumento significativo do número de mastócitos, triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 e uma correlação positiva e significativa entre mastócitos e triptase. Nossos dados sugerem que a presença de mastócitos e expressão de triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 estão associadas ao desenvolvimento dos queloides.

Palavras-chave: Queleide, Imuno-Histoquímica, Mastócitos, Triptases, Subunidade alfa do Fator 1 Induzível por hipóxia, Metaloproteinases da Matriz, Inibidores de Metaloproteinases de Matriz

ABSTRACT

Keloids are considered benign fibroproliferative disorder characterized by an inflammatory environment, growth beyond the borders of the initial scar, and significant fibrotic formation. Its pathophysiology is not yet fully elucidated; therefore, the objective of this study was to evaluate *in situ* the presence of mast cells and immunostaining for tryptase, hypoxia-inducible factor (HIF-1 α), membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3), and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4) in keloids compared to controls. Seventeen keloid biopsies were analyzed, and normal scar fragments taken from secundiparous or multiparous patients during cesarean section were used as controls. Toluidine blue staining was performed to evaluate the presence of mast cells and immunohistochemistry with anti-tryptase, anti-HIF-1 α , anti-MT1-MMP, anti-TIMP-3, and anti-TIMP-4 antibodies. Results showed a predominance of females, non-white, direct black ancestry, and location of the lesion in the earlobe. Keloids showed a significant increase in mast cells, tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, and TIMP-4 and a positive and significant correlation between mast cells and tryptase. Our data suggest that the presence of mast cells and expression of tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, and TIMP-4 are associated with keloid development.

Keywords: keloids, immunohistochemistry, mast cells, tryptase, hypoxia-inducing factor, metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras tese:

Figura 1 - Cicatriz normal	18
Figura 2 - Cicatriz hipertrófica	19
Figura 3 - Queloides	20
Figura 4 - Perfil histológico dos queloides	21
Figura 5 - Processo de inativação cicatricial espontânea ou por tratamento intralesional.....	22
Figura 6 - Interações tipo Gap entre fibroblastos e mastócitos relacionado ao HIF.....	24
Figura 7 - Interações tipo Gap entre fibroblastos e mastócitos relacionado ao colágeno.....	25
Figura 8 - Interação tipo PAR2 entre triptase e mastócito relacionado à fibrose.....	26
Figura 9 - Vias de sinalização geradas por interação entre HIF e fibroblastos.....	27
Figura 10 - Interação entre MT1-MMP e TGF- β gerando fibrose.....	28
Figura 11 - Interação entre TGF- β e mastócitos gerando MT1-MMP... ..	29
Figura 12 - Interação de MT1-MMP, MMP-2 e TIMP-2 nas bordas cicatriciais de queloides....	65
Figura 13 - Ativação de adesivo RGD na formação de fibrose.....	66

Figuras artigo:

Figura 1 – Cortes histológicos de cicatrizes normais e queloides com coloração por H&E e azul de toluidina	48
Figura 2 – Cortes histológicos de cicatrizes normais e queloides com marcação positiva para triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 por imuno-histoquímica	49
Figura 3: Análise da comparação e correlação de mastócitos, triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 entre queloides e cicatrizes normais	51
Figure 4: Correlação entre o número de mastócitos e a densidade de tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características gerais e clínicas de pacientes com queiloide	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta

HIF: Fator indutor de hipóxia

VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

MEC: Matriz extracelular

NF- κ B: Fator nuclear Kappa B

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

IL-6: Interleucina-6

AP-1: Proteína ativadora-1

MMP-2: Metaloproteinase tipo 2

MMP-9: Metaloproteinase tipo 9

GAP: fenda

HIF-1 α : Fator indutor de hipóxia 1 alfa

ERK1/2: Quinase controlada pela sinalização extracelular 1/2

PI3K: Fosfatidilinositol 13-quinase

Akt: Proteína quinase específica de serina/treonina

PAR2: Receptor ativado por protease 2

P38: Proteínas quinases ativadas por mitógenos p38

JNK: Quinase c-Jun N-terminal

SMAD: Small Mothers Against Decapentaplegic/Pequenas mães contra decapentaplégicos

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

MMPs: Metaloproteinases de matriz

MMP-1: Metaloproteinase de matriz do tipo 1

MMP-3: Metaloproteinase de matriz do tipo 3

MMP-13: metaloproteinase de matriz do tipo 13

MT1/MMP = MMP-14: Metaloproteinases de membrana do tipo 1 = Metaloproteinase de matriz do tipo 14

PCK: Proteína quinase C

MEK: Proteína quinase ativada por mitógenos

ERK: Quinase controlada pela sinalização extracelular 1/2

TIMPs: Inibidores teciduais de metaloproteinases

TIMP-1: Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1

TIMP-2: Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 2

TIMP-3: Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 3

TIMP-4: Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 4

CEP: Comitê de ética e pesquisa

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

CAAE: Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

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

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

H&E: Hematoxilina e eosina

rS: Teste de Spearman

APTS: Aminopropiltriétoxisilano

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

BSA: Albumina sérica bovina

DAB: 3,3' Diaminobenzidina

IKB: Proteínas inibidoras de kappa B

RGD: Ácido arginil-glicil-aspartico

TAK1: Quinase 1 ativadora do fator transformador de crescimento β

MKK3,6: Isoformas da quinase das map quinases 3 e 6

Ras: Proteína ligadora de nucleotídeo guanosina

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	PELE E CICATRIZAÇÃO	16
1.2	Queloides	18
1.3	Fatores associados ao queuloide	24
2.	JUSTIFICATIVA	31
3.	HIPÓTESE	32
4.	OBJETIVOS	33
4.1	Objetivo Geral	33
4.2	Objetivos específicos	33
5.	MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1	Aspectos éticos	34
5.2	Casuística	34
5.3	Coleta do material	35
5.4	Histologia	35
5.4.1	<i>Preparo do material para análise histoquímica</i>	35
5.4.2	<i>Coloração de Azul de Toluidina</i>	35
5.4.3	<i>Imuno-histoquímica</i>	36
5.4.4	<i>Análise morfométrica</i>	37
5.5	Análise estatística	37
5.6	Normas para a confecção do manuscrito	37
6.	RESULTADOS	39
6.1	Artigo	39
7.	DISCUSSÃO	63
8.	CONCLUSÃO	68
9.	Referências Bibliográficas	69
10.	ANEXOS	81
10.1	Anexo A – Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – UFTM	81
10.2	Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	83

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 maior rigidez ou flexibilidade. Constitui uma interface dinâmica entre o meio interno e externo exercendo funções de proteção, barreira contra microorganismos e termorregulação (LOPEZ-OJEDA; PANDEY; ALHAJJ; OAKLEY, 2022).

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 e células de Langerhans (ABDAYEM; HAFTEK, 2018).

A pele é classificada como um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e é constituída por duas camadas, a epiderme e a derme, além de seus anexos como pelos, glândulas e unhas (KIM; DAO, 2022). A camada mais externa, chamada de epiderme, é subdividida em quatro camadas - basal, espinhosa, granulosa e córnea (SMITH; CHAN, 2017). A camada basal é um local de intensas mitoses e renovações celulares, sendo que à medida que as células epiteliais migram para as camadas mais externas, tornam-se mais cuboides e com perda de funções (FANIKU; WRIGHT; MARTIN, 2015). Outras células importantes encontradas na epiderme são os queratinócitos e os melanócitos (ARDA; GOKSUGUR; TUZUN, 2014).

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, rico em fibras colágenas (AGARWAL; KRISHNAMURTHY, 2022).

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 (OZGOK KANGAL; REGAN, 2022). É caracterizado pela

Introdução

1 hemorragia imediatamente após a lesão com rápida vasoconstricção através de liberação de
2 prostaglandinas e tromboxano A2 com o intuito de prevenir futuros sangramentos e proteção
3 cicatricial. Concomitantemente inicia-se a cascata de coagulação, agregação plaquetária e
4 formação do coágulo de fibrina gerando liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas
5 (PDGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), estimulando diapedese
6 (WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2022). As primeiras células a migrarem dos capilares para
7 o sítio da lesão são os neutrófilos e os monócitos/macrófagos, sendo responsáveis pela
8 descontaminação local e por quimiotaxia (SERRA; BARROSO; DA SILVA; SILVA *et al.*,
9 2017). Logo após, os mastócito liberam diversos mediadores químicos, principalmente a
10 histamina, gerando vasodilatação e formação dos sinais clássicos da inflamação, dor, calor,
11 rubor e edema e perda de função (BUNDGAARD; SORENSEN; NILSSON; SALLING *et al.*,
12 2018).

13 A fase proliferativa inicia-se no segundo ou terceiro dia e pode durar até duas semanas
14 e possui como principal objetivo a formação de tecido de granulação (ZHAO; SUI; LIU; LV *et*
15 *al.*, 2017). Há a predominância de macrófagos e a intensa destruição endotelial, gera um
16 ambiente hipóxico, que através da liberação de fator indutor de hipóxia (HIF), PDGF, fator de
17 crescimento vascular endotelial (VEGF) e TGF- β estimulam o reestabelecimento vascular
18 através da angiogênese e o recrutamento de fibroblastos. Estas células, iniciam o processo de
19 fibroplasia, produzindo um novo tecido avermelhado composto por novos capilares sanguíneos,
20 tecido conjuntivo frouxo, leucócitos, colágeno tipo III e proteoglicanos (REINKE; SORG,
21 2012).

22 A última fase, inicia-se na segunda semana e pode durar até um ano, sendo mais longa
23 em relação as etapas anteriores. Neste momento, principalmente por estímulo de TGF- β , o
24 tecido de granulação é substituído por uma matriz extracelular (MEC) madura (OZGOK
25 KANGAL; REGAN, 2022). O colágeno do tipo III é substituído por colágeno do tipo I e a
26 regulação fibrótica é mediada por enzimas degradadoras de colágeno, chamadas
27 metaloproteinases e seus inibidores. TGF- β também induz a diferenciação de fibroblastos em
28 miofibroblastos, no qual expressam α actina de músculo liso, gerando aumento muscular
29 tensional, contração cicatricial e conseqüentemente aproximação e fechamento das bordas da
30 lesão (BOWDEN; BYRNE; MAINI; MOULTON, 2016).

31 Do ponto de vista clínico é a etapa mais importante, pois um balanço adequado da
32 qualidade, quantidade na síntese de componentes da matriz extracelular e sua correta

1 degradação poderão determinar o sucesso (Figura 1) ou fracasso cicatricial como as cicatrizes
2 hipotróficas, hipertróficas (Figura 2) e os queloides (Figura 3).

3

4 Figura 1 - Cicatriz normal

5



6

7

Safonov, 2012

8

1.2 Queloides

9

10 Dados de 3.000 anos, através de transliterações hieroglíficas de documentos chamados
11 Papiros de Smith, a civilização egípcia descreveu os possíveis primeiros relatos sobre o
12 aparecimento dos queloides (ALLEN; ART, 2005). Em 1806, Alibert foi o primeiro a descrever
13 os queloides na literatura científica, classificando-os como lesões cancroides devido ao
14 crescimento tecidual exacerbado e sugerindo a nomenclatura queiloide pela derivação grega de
15 “khele” significando garra e “oeides” semelhante a, fazendo alusão as patas de caranguejos
16 (ADDISON, 1854). Além disso, esculturas resgatadas de povos antigos da Nigéria,
17 denominados tribos Iorubá, indicaram compreensão sobre o tema devido a observações como
18 predisposição familiar, tempo de aparecimento das lesões, crescimento excessivo e a não
19 possibilidade de cura (OMO-DARE, 1973).

20 O diagnóstico do queiloide é realizado através de anamnese e exame físico. A entrevista
21 inicial busca informações como histórico lesional, etnia, antecedentes familiares positivos e de
22 etnia não branca. Já o exame físico compreende a observação das principais características
23 queiloideanas, tais como crescimento exacerbado de tecido que se estende além das bordas da

Introdução

1 cicatriz inicial, não regressão da lesão, altas taxas de recidiva pós cirúrgica, sintomas como dor,
2 calor, rubor, prurido, tumefação, edema e em alguns casos restrição de mobilidade, além de
3 alterações psicológicas devido à desfiguração estética. Importante reconhecer as
4 particularidades das cicatrizes hipertróficas, pois apresentam semelhanças com os queloides
5 causando, muitas vezes, confusão de diagnóstico (KIM; MIRSKY; SPIELMAN; MATHEW *et*
6 *al.*, 2022; SHAN; LIU; HAO; MENG *et al.*, 2022; YEUNG; KAHN; LY; TANGPRICHA,
7 2019).

8

9 Figura 2 - Cicatriz hipertrófica

10



11

12

Ogawa et al., 2022

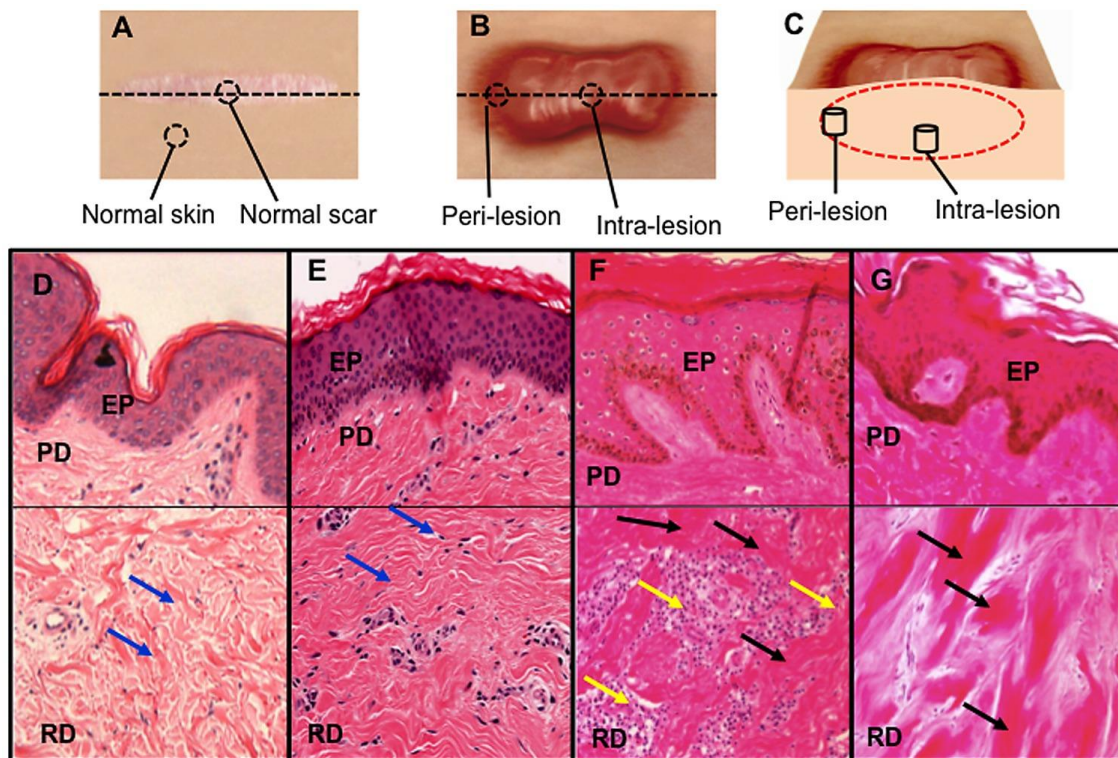
1 Figura 3 - Queloides

2
3 Acervo pessoal
4

5 Além do perfil clínico, a identificação do perfil histológico é de extrema importância no
6 processo de diagnóstico destas lesões. As cicatrizes normais tendem a se assemelhar à pele
7 íntegra anterior, evidenciando o epitélio estratificado pavimentoso queratinizado com
8 organização de fibras colágenas e presença de infiltrado inflamatório discreto (Figura 4D e 4E
9 – setas azuis). Já nos queloides, encontra-se um epitélio escamoso estratificado
10 hiperqueratinizado, derme superficial com aumento de fibroblastos paralelos à superfície
11 epidermal e presença de infiltrado inflamatório mais intenso. Na matriz extracelular observa-se
12 presença de feixes densos e desorganizados de colágeno (Figura 4F e 4G – setas pretas e
13 amarelas) constatando que, nos queloides, a falta de orientação apropriada das fibras,
14 enfraquece a contração cicatricial, impedindo a aproximação das bordas da lesão (DA SILVA;
15 TIVERON; DA SILVA; PEIXOTO *et al.*, 2017; HUNASGI; KONERU; VANISHREE;
16 SHAMALA, 2013; LEE; YANG; CHAO; WONG, 2004).

1 Figura 4 - Perfil histológico queloides

2



3

4

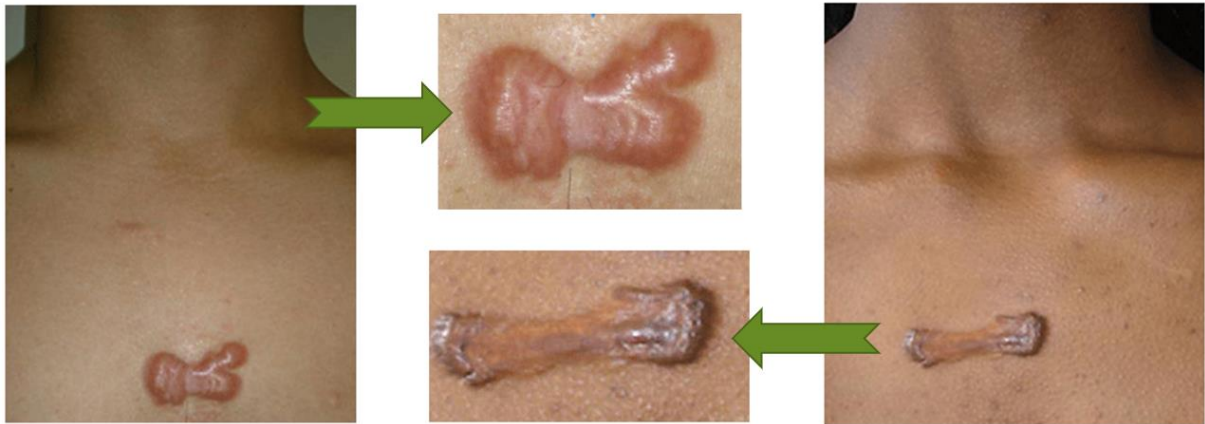
5

Aschcroft et al., 2003

6 O quelóide é encontrado apenas em humanos, sendo um tipo único de cicatrização
7 fibrótica. Mesmo não refletindo o ideal, estudos em modelos animais são adaptados para
8 aprimorar os conhecimentos nessa linha de pesquisa, bem como o conhecimento da patogênese
9 e da eficiência de drogas utilizadas no tratamento dos queloides. Implantes de quelóide em
10 camundongos induziram o aumento da lesão, da quantidade de fibroblastos e da deposição
11 excessiva de colágeno. Além disso, tratamentos com toxina botulínica e triancinolona
12 intralesional geraram diminuição dos sinais inflamatórios e proliferativos característicos dos
13 queloides, processo conhecido como inativação cicatricial (Figura 5) (FANOUS; BEZDJIAN;
14 CAGLAR; MLYNAREK *et al.*, 2019; LEE; HSU; CHIU; SARKOZY *et al.*, 2016;
15 MARTTALA; ANDREWS; ROSENBLOOM; UITTO, 2016; WANG; LUO, 2013)

1 Figura 5 - Processo de inativação cicatricial espontânea ou por tratamento intralesional

2



3

4

5

Edriss; Mestak, 2015; Acervo pessoal

6

7 A predisposição genética tem demonstrado relevância na formação dos queloides,
 8 devido à identificação de polimorfismos em locis de regiões cromossômicas como 1q41, 3q22.3-
 9 23, e 15q21.3, evidenciando predominância de histórico familiar positivo, além de maior
 10 incidência em mulheres e pacientes não brancos. (LANE; WALLER; DAVIS, 2005;
 11 TANAYDIN; BEUGELS; PIATKOWSKI; COLLA *et al.*, 2016; UD-DIN; THOMAS;
 12 MORRIS; BAYAT, 2013; VELEZ EDWARDS; TSOSIE; WILLIAMS; EDWARDS *et al.*,
 2014)

13

14 A média de idade dos pacientes que procuram tratamento varia entre 24,7 a 34,5 anos e
 15 o surgimento da lesão está entre 11 a 40 anos, revelando a questão hormonal como importante
 16 fator contribuinte na formação do queloide. Estudos indicam a influência principalmente de
 17 hormônios sexuais como a testosterona e o estrogênio, que induzem uma maior incidência de
 18 queloide na puberdade e na gravidez e em fases como a menopausa, onde há diminuição na
 19 regulação hormonal, relata-se uma regressão da lesão. Relata-se também o aparecimento de
 20 lesão em perfurações de piercings/brincos após os 11 anos de idade, sendo que 92% desses
 21 casos não apresentaram lesão durante perfurações nos primeiros anos de vida. (IBRAHIM;
 22 SHAHARAN; DHEANSA, 2020; SHAMSI MEYMANDI; REZAZADEH; EKHLASI, 2014;
 WILSON, 2013 2013 2013)

23

24 As localizações mais frequentes de aparecimento de queloide são lóbulo da orelha,
 25 região abdominal, tórax, costas, ombros e braços, sendo decorrente de lesões como perfuração
 26 de brincos e piercings, cirurgias, queimaduras, vacinas, catapora, acnes, traumas e também por
 causas desconhecidas pelos pacientes. (CAMACHO-MARTINEZ; REY; SERRANO;

Introdução

1 WAGNER, 2013; CAVALIE; SILLARD; MONTAUDIE; BAHADORAN *et al.*, 2015;
2 MEDHI; SEWAL; KAMAN; KADHE *et al.*, 2013)

3 Inúmeros são os tratamentos descritos para o quelóide, porém nenhum deles apresenta
4 100% de eficácia. A radioterapia, crioterapia e a terapia fotodinâmica mostraram-se opções
5 efetivas e relativamente seguras para o tratamento de quelóide, apresentando diminuição das
6 lesões e dos sintomas. A pressão no local tem sido considerada um fator relevante na regressão
7 da lesão e nas taxas de recorrência pós-cirúrgica. Estudos mostraram que a aplicação de géis de
8 silicone, diminuiu o tamanho da lesão em 19,2% e apresentou 30,7% de satisfação do paciente
9 após o uso. (BERMAN; GARIKAPARTHI; SMITH; NEWBURGER, 2013; MEDHI;
10 SEWAL; KAMAN; KADHE *et al.*, 2013; PARK; CHANG, 2015; UD-DIN; THOMAS;
11 MORRIS; BAYAT, 2013)

12 A injeção intralesional de um corticoide chamado triancinolona, apresentou diminuição
13 dos sintomas, regressão da lesão e baixas taxas de recidiva, entre 4,5 a 6%, em menos de um
14 ano. Apresentou diminuição nos níveis de expressão de TGF- β pelos fibroblastos e inibiram
15 fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF-kB (Fator nuclear Kappa B), modulador de
16 citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) e a IL-6
17 (Interleucina-6), e o AP-1 (Proteína ativadora-1), modulador da transcrição de genes das
18 metaloproteinases de matriz tipo 2 (MMP-2) e metaloproteinases de matriz tipo 9 (MMP-9),
19 induzindo a lise de proteínas da MEC e do colágeno. (ALJADA; GHANIM; MOHANTY;
20 HOFMEYER *et al.*, 2001; CARROLL; HANASONO; MIKULEC; KITA *et al.*, 2002;
21 CARVALHAES; PETROIANU; FERREIRA; DE BARROS *et al.*, 2015)

22 Em todos os tratamentos, a maior eficácia foi comprovada através da combinação com
23 a excisão cirúrgica. A aplicação da triancinolona juntamente com a excisão cirúrgica é um dos
24 tratamentos mais difundidos e que apresentaram menores taxas de recorrência, sendo que, a
25 taxa de pacientes que não apresentaram recidiva após a excisão e tratamento variou de 91,5 a
26 94%. (BASHIR; AHMAD; YOUSAF; KHAN, 2015; FANOUS; BEZDJIAN; CAGLAR;
27 MLYNAREK *et al.*, 2019; HIETANEN; JARVINEN; HUHTALA; TOLONEN *et al.*, 2019)

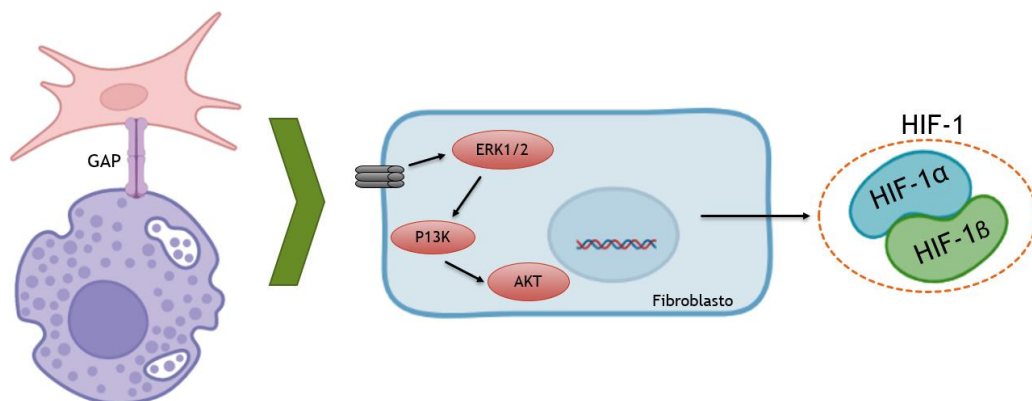
28 Até o momento, não foi encontrado uma terapia 100% eficaz ou formas de prevenir a
29 formação dos quelóides, este estudo visa identificar células e moléculas que podem contribuir
30 para a gênese e evolução do quelóide, podendo ser cruciais para o embasamento de tratamentos
31 novos e eficazes. Além disso, mais estudos sobre o tema são importantes para identificação dos
32 fatores hormonais, imunológicos e as interações celulares presentes nesse tipo cicatricial.

1.3 Fatores associados ao quelóide

Diversos fatores são descritos por sua relação à formação dos quelóides, um estudo realizado por nosso grupo demonstrou que em comparação a cicatrizes normais, os quelóides apresentaram aumento significativo na quantidade de fibras colágenas tipo I, evidenciando a presença de colágeno imaturo (tipo III), citocinas e fatores de crescimento, em especial o TGF- β , considerado um dos fatores profibróticos mais importantes no desenvolvimento dos quelóides (DA CUNHA COLOMBO TIVERON; DA SILVA; DA SILVA; PEIXOTO *et al.*, 2018; DA SILVA; TIVERON; DA SILVA; PEIXOTO *et al.*, 2017).

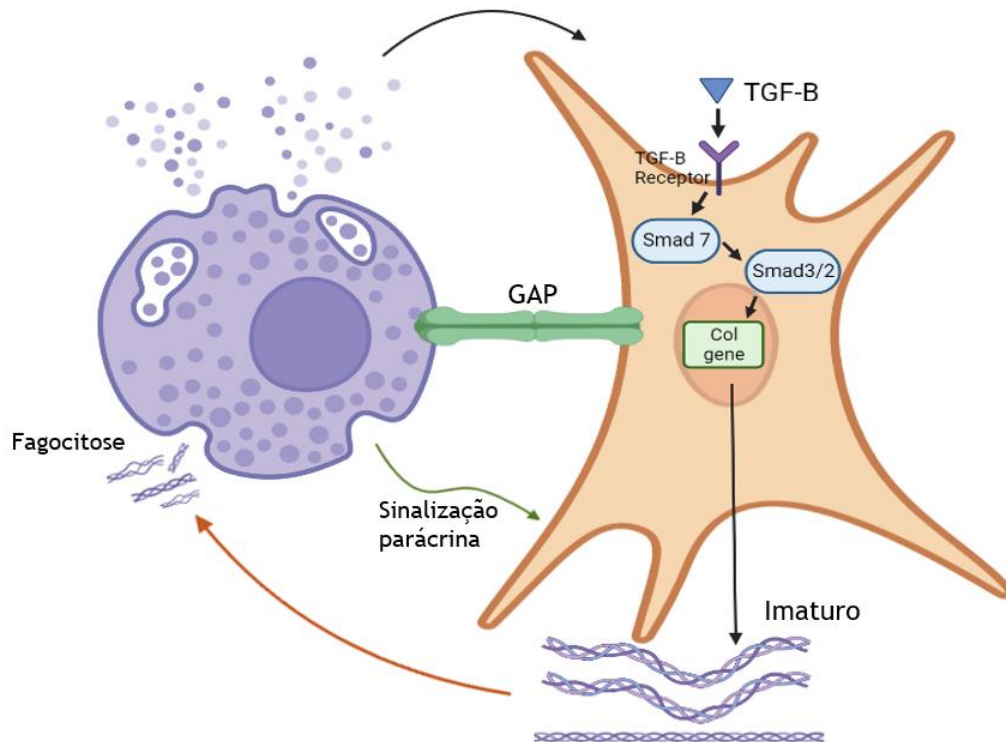
O processo cicatricial e o predomínio de fibroblastos induzem a uma rede de comunicações celulares e moleculares importantes para a formação dos quelóides (LIU; LI; LI; TENG *et al.*, 2016). Interações do tipo *gap* (fenda) entre fibroblastos e mastócitos induzem um aumento significativo de fator indutor de hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) através da via de sinalização ERK1/2 (quinase controlada pela sinalização extracelular 1/2) e PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinase/ proteína cinase específica de serina/treonina) (Figura 6) (ZHANG; OH; MESSADI; DUONG *et al.*, 2006). Além disso, induzem à formação de uma fibra colágena prematura e anormal (FOLEY; EHRLICH, 2013; FOLEY; SAGGERS; MOYER; EHRLICH, 2011), levando os mastócitos a assumirem um papel de autoreguladores, fagocitando o colágeno excedente e ativando os fibroblastos através de sinalização parácrina (ARBI; EKSTEEN; OBERHOLZER; TAUTE *et al.*, 2015). Estudos mostraram que altas concentrações de mastócitos facilitam a transdução via SMAD e ativação de TGF- β , elevando as concentrações de colágeno tipo I e em maior concentração o tipo III (Figura 7) (CHEN; XU; YANG; ZHANG *et al.*, 2017; CHEN; JIN; FU; QIAO *et al.*, 2019; DONG; ZHANG; MA; WEN, 2014).

Figura 6 – Interações tipo Gap entre fibroblastos e mastócitos relacionados ao HIF-1 α



Elaborado pelo autor

1 Figura 7 – Interações tipo Gap entre fibroblastos e mastócitos relacionados ao colágeno

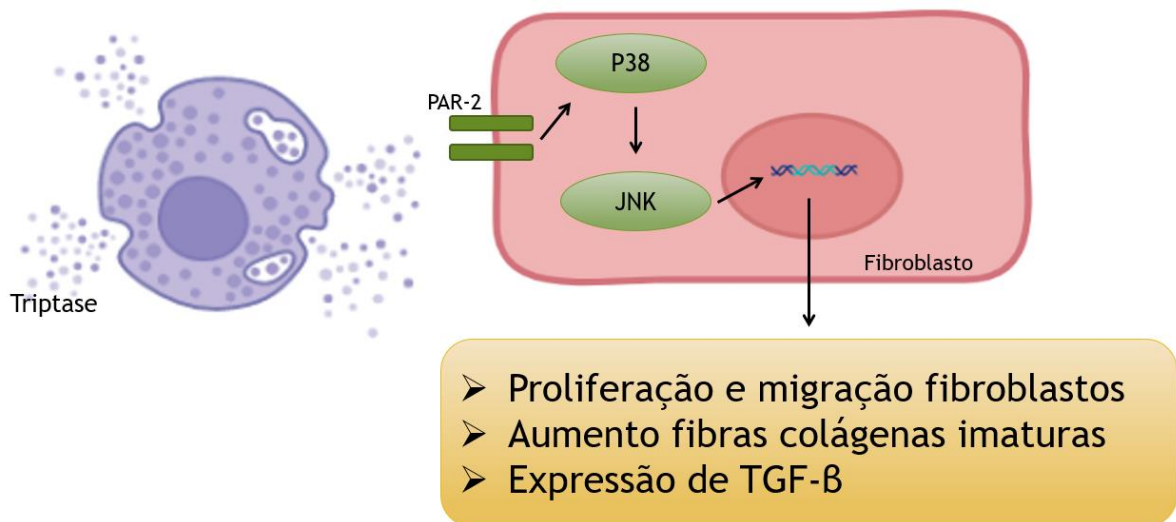


Elaborado pelo autor

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

De acordo com suas composições secretoras da protease granular e nos marcadores superficiais, os mastócitos são divididos em células triptase positivo/quimase negativo e triptase positivo/quimase positivo (MOON; ST LAURENT; MORRIS; MARCET *et al.*, 2010), dessa forma, os métodos de coloração para triptase são capazes de identificar todos mastócitos (ALANAZI; GRUJIC; LAMPINEN; ROLLMAN *et al.*, 2020). Através da ativação de PAR2/P38/JNK, a triptase é liberada durante a degranulação mastocística, induzindo a proliferação e migração dos fibroblastos (TAN; CHEN; CHEN; XU *et al.*, 2021), e consequente aumento na quantidade de fibras colágenas novas, frouxas e finas, características principais do colágeno imaturo (BANSAL; KAMBOJ; NARWAL; DEVI *et al.*, 2022). Essa via de sinalização também é responsável por induzir a expressão de TGF- β e VEGF (Figura 8) (AKERS; PARSONS; HILL; HOLLENBERG *et al.*, 2000; LIU; MUELLER, 2006).

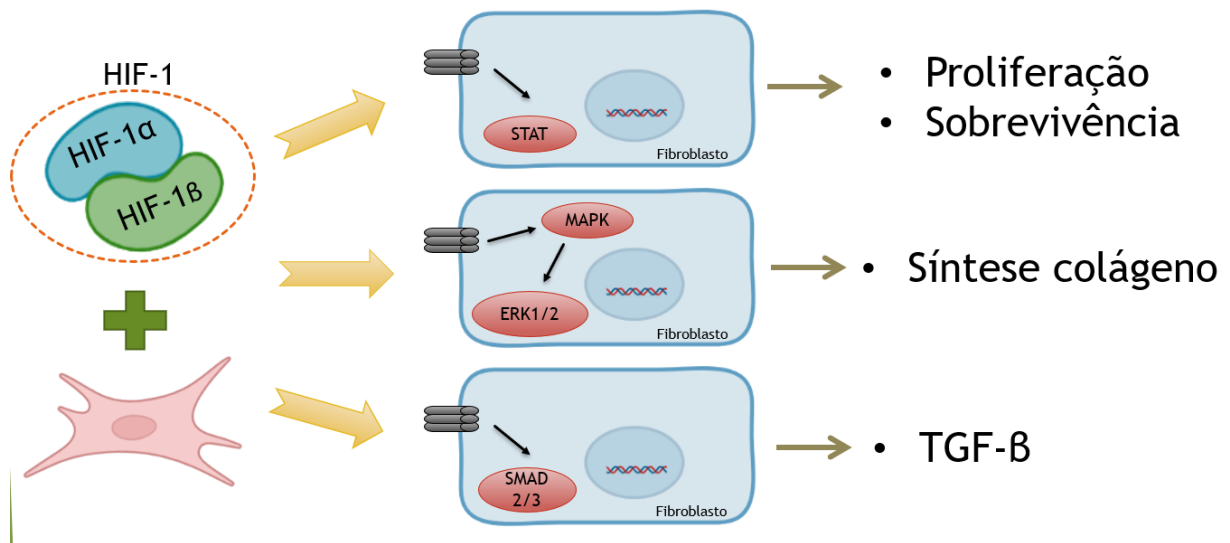
1 Figura 8 – Interações tipo PAR2 entre triptase e mastócito relacionado à fibrose



Elaborado pelo autor

2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18

O HIF-1 α , estimulado por hipóxia, é produzido em ambientes inflamatórios e com destruição da rede de vascularização, que aumentam o consumo e geram indisponibilidade de oxigênio (CELESTE; DESCHENE; RILEY; THEORET, 2011). Nas cicatrizes de queiloide esse fator permanece aumentado devido a formação excessiva da cadeia de fibras colágenas (YANG; BAO; FANG; YU *et al.*, 2021) e diversas vias de sinalização vêm sendo relatadas em diferentes alterações fisiológicas, como inflamação, câncer e progressão tumoral (BRUNING; FITZPATRICK; FRANK; BIRTWISTLE *et al.*, 2012; ZHANG; YANG; ZHANG; GUO *et al.*, 2014). Em queloides foi relatado que HIF-1 α , através da ativação da via de sinalização STAT (Transdutor de sinal e ativador de transcrição) promove proliferação e sobrevivência de fibroblastos em condições de baixa oxigenação tecidual (LEE; LEE; CHOI; LEE *et al.*, 2022; ZHANG; NIE; KANG; CHEN *et al.*, 2014), e ao estimular a via de sinalização MAPK/ERK, gera atividade anormal dos fibroblastos, na qual a fosforilação de ERK1/2 induz a produção excessiva de colágeno (Figura 9) (KIM; KIM; KIM; YANG *et al.*, 2019).

1 Figura 9 – Vias de sinalização geradas por interação entre HIF-1 α e fibroblastos

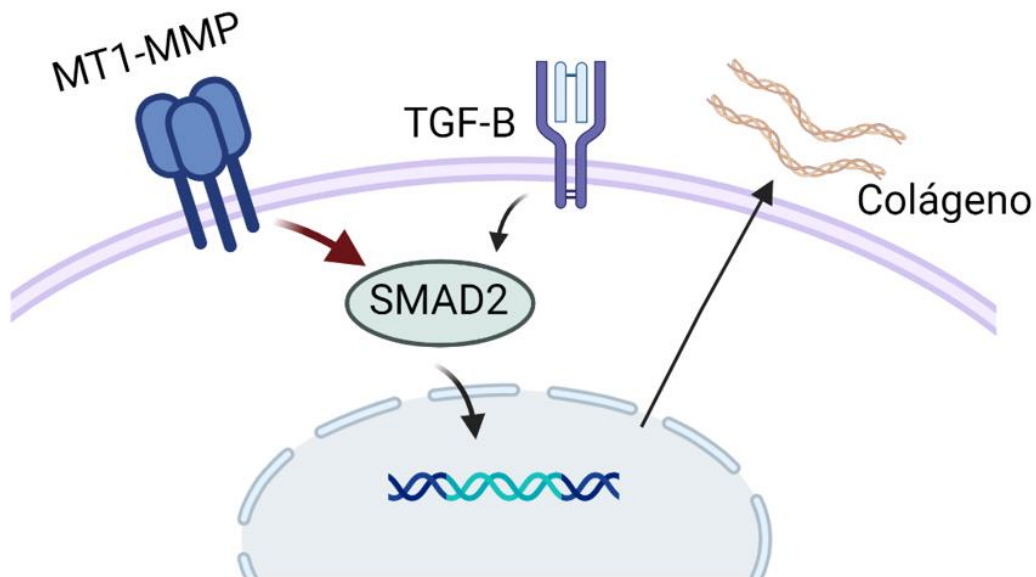
Elaborado pelo autor

As metaloproteinases de matriz (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases zinco dependentes que possuem como principal função a atividade colagenolítica (VUONG; RONNING; AHMED; BRATHAGEN *et al.*, 2018). Produzidas por diversas células, inclusive os fibroblastos, desempenham um importante papel na formação cicatricial, podendo ser relevantes na formação dos queloides (XIE; BIAN; QI; XU *et al.*, 2008). Algumas MMPs tem sido relatadas nos queloides, como a MMP-1 (metaloproteinase de matriz do tipo 1) (JEON; AHN; CHOI; YUN *et al.*, 2016), MMP-2 (IMAIZUMI; AKASAKA; INOMATA; OKADA *et al.*, 2009), MMP-3 (metaloproteinase de matriz do tipo 3) (LEE; AHN; ROH; NA *et al.*, 2015), MMP-9 (LEE; KIM; KIM; KIM *et al.*, 2020), MMP-13 (metaloproteinase de matriz do tipo 13) (UCHIDA; YOSHIMURA; KITANO; OKAZAKI *et al.*, 2003), porém, nesse contexto, o papel das metaloproteinases de membrana do tipo 1, conhecidas como MT1-MMP e MMP-14 (metaloproteinase de matriz do tipo 14) permanece desconhecido. Estudos recentes demonstram uma prevalência das MT1-MMP em meios inflamatórios e fibróticos (AKAMA; CHUN, 2018; FU; TAO, 2020), comumente encontrado nos queloides, no qual estimulam a rápida produção de colágeno do tipo III, que por ser uma molécula homotrímica, apresenta ligações mais fortes e consequentemente maior resistência à clivagem (ARBI; EKSTEEN; OBERHOLZER; TAUTE *et al.*, 2015; XIAO; ADDABBO; LAUER; FIELDS *et al.*, 2010). Estudos demonstraram que o aumento de MT1-MMP está relacionado à progressão e invasão de tumores ovarianos e ascites (ESCALONA; KANNOURAKIS; FINDLAY; AHMED, 2021; SAKATA; SHIGEMASA; NAGAI; OHAMA, 2000), e o mau prognóstico de carcinomas de

1 células escamosas está correlacionado à interação entre HIF-1 α e MT1-MMP (FU; TAO, 2020).
 2 Em carcinomas pancreáticos animais, a MT1-MMP induz a rápida fosforilação de SMAD2,
 3 responsável pela via de sinalização da produção de TGF- β , aumentando a produção de colágeno
 4 (Figura 10) (KRANTZ; SHIELDS; DANGI-GARIMELLA; CHEON *et al.*, 2011). Além disso,
 5 o TGF- β pode induzir mastócitos a produzirem MT1-MMP através da via de sinalização
 6 PCK/MEK/ERK (Proteína quinase C/ Proteína quinase ativada por mitógenos/ quinase
 7 controlada pela sinalização extracelular 1/2) (Figura 11) (KIMATA; ISHIZAKI; TANAKA;
 8 NAGAI *et al.*, 2006).

9

10 Figura 10 – Interação entre MT1-MMP e TGF- β gerando fibrose

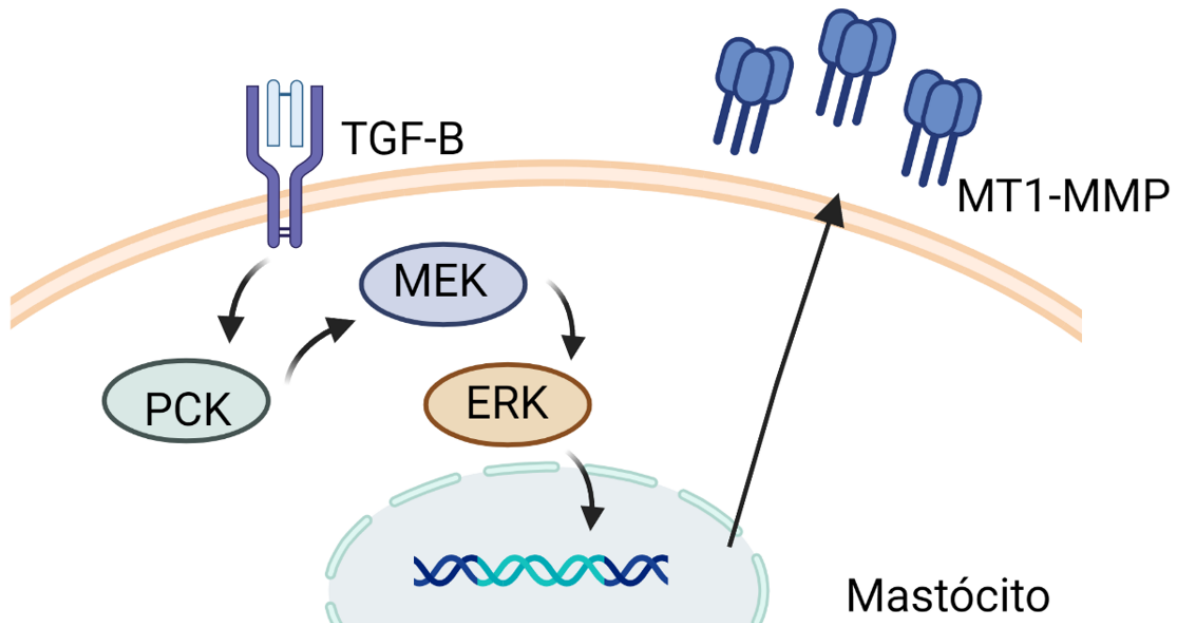


11

12

13

Elaborado pelo autor

1 Figura 11 – Interação entre TGF- β e mastócitos gerando MT1-MMP

Elaborado pelo autor

2
3
4

5 A atividade proteolítica das MMPs é inibida pelas TIMPs (inibidores teciduais de
6 metaloproteinases), que até o momento foram identificados 4 grupos TIMP-1, TIMP-2, TIMP-
7 3 e TIMP-4 (BREW; NAGASE, 2010). Uma correta interação entre MMPs e TIMPs são
8 cruciais a homeostase da MEC e o seu desbalanço gera diversas alterações como aterosclerose,
9 câncer, além de cicatrizes hipertróficas e queloides (DI GREGOLI; MOHAMAD ANUAR;
10 BIANCO; WHITE *et al.*, 2017; DOHI; MIYAKE; AOKI; OGAWA *et al.*, 2015; SALIMI
11 SARTAKHTI; MANSHAEI; SADEGHI, 2017; SIMON; BERGERON; LAROCHELLE;
12 LOPEZ-VALLE *et al.*, 2012). Poucos os estudos exploram a atuação dos TIMPs nos queloides
13 (AOKI; MIYAKE; OGAWA; DOHI *et al.*, 2014; DOHI; MIYAKE; AOKI; OGAWA *et al.*,
14 2015), dificultando discussões importantes no reconhecimento da sua fisiopatologia. Os
15 inibidores de metaloproteinases do tipo 3 e 4 foram relatados em casos de tumores malignos,
16 desordens cardiovasculares e lesões periapicais (ARBA; PICCARDI; PALUMBO; GIUSTI *et*
17 *al.*, 2019; CASSANTA; RODRIGUES; VIOLATTI-FILHO; TEIXEIRA NETO *et al.*, 2017;
18 SHRESTHA; ANDO; CHEA; SAKAMOTO *et al.*, 2019). Expressão de TIMP-3 pode estar
19 relacionada à inibição de MT1-MMP em formações ateroscleróticas (JOHNSON; JENKINS;
20 HUANG; DI GREGOLI *et al.*), porém em casos de carcinoma de células escamosas não foi
21 encontrado correlação significativa (BIRKEDAL-HANSEN; PAVELIC; GLUCKMAN;
22 STAMBROOK *et al.*, 2000). Novas descobertas vêm relatando o TIMP-4 como um fator anti-

Introdução

1 angiogênico, podendo ser um fator importante na formação dos queloides (GIVVIMANI;
2 TYAGI; SEN; MISHRA *et al.*, 2010; WANG; UMRATH; CEN; SALGADO *et al.*, 2022).
3 A fisiopatologia do queleide tem se mostrado como uma intensa interação de diversos fatores
4 mediados pelo ambiente inflamatório intenso, por isso não foi ainda totalmente elucidado.
5 Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar *in situ*, a expressão de Triptase, HIF-1 α , MMP-
6 14, TIMP-3 e TIMP-4, além da presença de mastócitos pela técnica de azul de toluidina em
7 queloides e compará-los com cicatrizes normais.

2. JUSTIFICATIVA

O queiloide causa prurido, dor, contraturas, excesso de cicatrização, o que pode impactar socialmente a vida do paciente, tanto fisiologicamente, quanto psicologicamente. Pode ser formado após pequenas lesões na pele como acne, tatuagens e piercing na orelha, ou após grandes lesões como queimaduras e incisões cirúrgicas (HAWASH; INGRASCI; NOURI; YOSIPOVITCH, 2021; MAMDOUH; OMAR; HAFIZ; ALI, 2022)

Apresenta altas taxas de recidiva após excisão cirúrgica e até o momento não existe um tratamento totalmente eficaz. Seu conceito, etiologia, prevalência, formas de tratamento e aspectos clínicos e histopatológicos ainda são muito discutidos, trazendo um desafio para os pesquisadores e profissionais da saúde (KHATTAB; BESSAR; KHATER, 2022).

Por se tratar de uma lesão relacionada a alterações nos aspectos cicatriciais, discute-se o importante papel de células do sistema imune, hormônios e citocinas que podem estar desregulados durante a formação do queiloide, bem como fatores que podem estar influenciando na deposição excessiva de colágeno e/ou na falta de ação de enzimas que possuem como função degradá-lo. (DA SILVA; TIVERON; DA SILVA; PEIXOTO *et al.*, 2017; NAKAJIMA; ARAMAKI; TAKEUCHI; YAMANISHI *et al.*, 2022)

Por isso, este estudo se propôs a melhorar o entendimento das vias de interações celulares e moleculares, buscando melhorias nas formas de prevenção e tratamento adequado aos pacientes com queiloide.

3. HIPÓTESE

1 **3. HIPÓTESE**
2
3 A excessiva produção de colágeno pelos fibroblastos anormais do quelóide induz a uma
4 cascata de desregulação local, podendo influenciar na inadequação de clivagem das cadeias de
5 colágeno alfa 1 e 2 pelas enzimas degradadoras de colágeno (MMPs) seja por disfunção
6 molecular ou diminuição de produção, além de alterações ou aumento na produção de inibidores
7 destas enzimas (TIMPs). Por apresentar um processo inflamatório exacerbado, células e
8 moléculas importantes no processo cicatricial como os mastócitos, triptase e o fator indutor de
9 hipóxia podem gerar interações celulares e moleculares contribuindo para o ambiente pró-
10 fibrótico dos queloides e influenciando na diferenciação fibroblástica. A interação entre todos
11 esses processos desregulados podem contribuir para o aumento tecidual comum dessas
12 cicatrizes.

1 **4. OBJETIVOS**

2

3 **4.1 Objetivo Geral**

4

5 Avaliar, *in situ*, a presença de mastócitos, triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e
6 TIMP-4 em lesões de queloides.

7

8 **4.2 Objetivos específicos**

9

10 Quantificar a presença de mastócitos em biópsias de pacientes com queloides.

11 Quantificar a expressão de triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4 em biópsias
12 de pacientes com queloides.

13 Correlacionar a presença mastócitos e expressões de triptase, HIF-1 α , MT1-MMP,
14 TIMP-3 e TIMP-4 em pacientes com queloides e cicatrizes normais.

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 (Certificado de Apresentação de Apreciação Ética) nº 45647315.4.0000.5154 e todos os participantes/responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.2 Casuística

Neste estudo, analisou-se 34 biópsias, sendo 17 obtidas de biópsias de pacientes com queiloide e 17 cicatrizes normais. Os pacientes com queiloides 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. Este ambulatório tem o intuito de conhecer os pacientes com queiloide e escolher a melhor conduta terapêutica e estética.

Como critério de inclusão foram selecionados para compor o grupo de queiloide 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.

Não fizeram parte deste estudo 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 queiloide, indicação e início de aplicação intralesional de corticoide, triancinolona 20mg/ml, uma vez ao mês até a melhora do quadro. Após inativação da lesão, pacientes foram encaminhados para excisão cirúrgica com consequente coleta de material para estudo. Após a excisão manteve-se a tratamento para evitar processo de recidiva.

1 Os fragmentos de pele dos controles foram retirados de pacientes secundíparas ou
2 múltíparas durante a realização da cesariana, retirando parte da cicatriz normal da cesárea
3 anterior.

5.3 Coleta do material

7 A coleta do material foi realizada nas salas de pequena cirurgia do ambulatório de
8 cirurgia plástica pelos médicos responsáveis pelo setor. Para cirurgia, inicialmente, realizou-se
9 a marcação da lesão com caneta cirúrgica, anestesia com lidocaína 2%, corte da lesão com
10 bisturi, excisão da pele com queleide e sutura. Os fragmentos foram armazenados em formol
11 tamponado para análise histológica.

5.4 Histologia

5.4.1 Preparo do material para análise histoquímica

17 Os fragmentos fixados em formaldeído 10% passaram pelo processo de desidratação em
18 álcoois com concentrações crescentes (70 a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em
19 parafina. Realizou-se cortes seriados com 4µm de espessura e os fragmentos foram capturados
20 em lâminas de vidro. Realizou-se a coloração de hematoxilina e eosina nas lâminas de número
21 1, azul de toluidina nas lâminas de número 2 e preparação com um adesivo
22 (aminopropiltriétoxissilano - APTS) para proporcionar melhor adesão entre lâmina e tecido
23 durante a técnica de imuno-histoquímica nas lâminas de número 3.

5.4.2 Coloração de Azul de Toluidina

27 Para coloração de Azul de toluidina foi realizada a desparafinização (xilol I, II e III,
28 ABS I, II e III e álcool 95%), hidratação em água corrente por 5 minutos e mergulho em água
29 destilada. Logo após, um banho de 2 minutos em solução de azul de toluidina 0.5%, lavagem
30 em água corrente de 3 a 4 minutos, banho em hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavagem
31 em água corrente de 10 a 15 minutos, desidratação e diafanização (álcool 95, álcoois I, II e III

1 e xilol II) e por fim prosseguiu-se com a montagem da lâmina com lamínula e meio de
2 montagem (Entellan®-Merck).

3

4 **5.4.3 Imuno-histoquímica**

5

6 Imuno-histoquímica indireta foi realizada para avaliar a expressão de triptase, HIF-1 α ,
7 MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4. Os fragmentos foram desparafinizados em quatro banhos de xilol
8 cada um por 10 minutos, logo em seguida passados em 2 banhos de álcool absoluto, 1 banho de
9 álcool 95% e 1 banho de álcool 70% durante 5 minutos cada lavagem, para a retirada do
10 excesso de xilol e hidratação, e depois mergulhadas uma vez em tampão PBS por 10 minutos
11 para remoção do excesso de álcool. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram banhadas
12 em ácido cítrico e colocadas em banho maria (90°) por 30 minutos e resfriadas em temperatura
13 ambiente por 10 minutos. Para fazer o bloqueio de ligações inespecíficas, foi adicionada em
14 cada corte uma quantidade de 100 a 200 μ l de solução PBS-BSA 2% e incubados por 30
15 minutos. Após, o anticorpo primário foi diluído em solução PBS-BSA 2%, sendo: **anti-triptase**
16 (1:1000; Dako, Denmark; cod-M705229-2), **anti-HIF-1 α** (1:2000; Merck, Denmark; cod-
17 SAB5600056), **anti-MMP-14** (1:20; R&D Systems, USA; cod-MAB918), **anti-TIMP-3**
18 (1:200; R&D Systems, USA; cod-MAB973), **anti-TIMP-4** (1:50; R&D Systems, USA; cod-
19 MAB974), e incubados por duas horas em câmara úmida e em geladeira. Após, as lâminas
20 foram lavadas novamente em solução durante 5 minutos cada lavada. Em seguida foi realizado
21 o bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol com água oxigenada a 3% por 10
22 minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas no tampão PBS (1X) + *Tween* 20 a
23 0,05% (5 minutos cada lavada). Foi colocado sobre cada corte o anticorpo secundário composto
24 pelo kit (Dako Cytomation®) de Biotinylated Link Universal e Streptavidin-HRP durante 30
25 minutos cada, logo após, as lâminas foram lavadas 4 vezes em PBS (1X) + *Tween* 20 a 0,05%.

26 Para fazer a revelação das reações, foi utilizado o DAB- 3.3' Diaminobenzidina diluído
27 em 5 ml de solução tampão TRIS-HCL (ph=7.2) e 25 μ l de água oxigenada (H₂O₂). Para
28 finalizar, as lâminas foram lavadas em seguida com água corrente, coradas com hematoxilina e
29 montadas com entellan®.

5.4.4 Análise morfolométrica

Para a quantificação da quantidade de mastócitos e expressão de triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3 e TIMP-4, dividiu-se as lâminas 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.

Avaliação morfolométrica foi realizada a partir da quantificação do número de células marcadas com positividade específica na imunohistoquímica. Esta análise foi realizada, a partir, das imagens dos cortes histológicos que foram capturados por um sistema digital e analisados através do software “Image J” (National Institutes of Health, USA). Dessa forma, cada campo a ser quantificado foi capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. A densidade de células positivas foi expressa pelo número de células por mm².

$$d = \frac{\text{Número células positivas}}{\text{Área total} \times \text{número de campos}} \text{ mm}^2$$

5.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.-USA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis apresentaram distribuição não normal e foram expressas em mediana com valores mínimo e máximo e percentis e foram analisadas pelos testes de Mann-Whitney. A correlação entre duas variáveis contínuas com distribuição não normal foi analisada pelo teste de Spearman. As variáveis qualitativas como etnia e gênero e as quantitativas como idade foram expressas através da média e desvio padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% (p<0,05).

5.6 Normas para a confecção do manuscrito

Para a elaboração escrita do trabalho, foi consultado o manual para apresentação de

Material e Métodos

- 1 trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da Associação Brasileira de
- 2 Normas Técnicas (ABNT) organizado pela biblioteca universitária da UFTM (ALVES;
- 3 SILVA; ALMEIDA, 2013).

6. RESULTADOS

6.1 Artigo

High presence of mast cells and high levels of metalloproteinase are associated with keloid formation

Isabela Rios da Silva^b, Luciana Rodrigues da Cunha Colombo Tiveron^b, PhD. Marcos Vinicius da Silva^b, Alberto Borges Peixoto^a, Carla Aparecida Xavier Carneiro^a, PhD. Marlene Antônia dos Reis^b, PhD. Sanivia Aparecida de Lima Pereira^{a,b}, PhD. Virmondes Rodrigues Jr^b, PhD. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues^{a,b}

^a Laboratory of Biopathology and Molecular Biology, University of Uberaba (UNIUBE), Uberaba, MG, Brazil

^b Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM)/, Uberaba, MG, Brazil

Corresponding author:

*Virmondes Rodrigues Junior

Federal University of Triângulo Mineiro,

100 Vigário Carlos Street, CEP 38025-350

Uberaba-MG, Brazil. Telephone: 55 34 33185299.

E-mail: virmondes.rodrigues@uftm.edu.br

Conflict of interest

We declare that we have no conflict of interest.

Financial support: This work was supported by Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), CEFORES, FAPEMIG, CAPES, CNPq and University of Uberaba (UNIUBE).

1 ABSTRACT

2

3 Keloids are considered benign fibroproliferative disorder characterized by an inflammatory
4 environment, growth beyond the borders of the initial scar, and significant fibrotic formation.
5 Its pathophysiology is not yet fully elucidated; therefore, the objective of this study was to
6 evaluate in situ the immunohistochemistry expression of HIF-1 α , MMP-14, TIMP-3, and
7 TIMP-4, in addition to the presence of mast cells assessed by toluidine blue staining and
8 tryptase immunostaining, in keloids and compare them with normal scars. Seventeen keloid
9 biopsies were analyzed, and normal scar fragments taken from secundiparous or multiparous
10 patients during cesarean section were used as controls. Toluidine blue staining was performed
11 to evaluate the presence of mast cells and immunohistochemistry with anti-tryptase, anti-HIF-
12 1 α , anti-MT1-MMP, anti-TIMP-3, and anti-TIMP-4 antibodies. Results showed a
13 predominance of females, non-white, direct black ancestry, and location of the lesion in the
14 earlobe. Keloids showed a significant increase in mast cells, tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP,
15 TIMP-3, and TIMP-4 and a positive and significant correlation between mast cells by two
16 different techniques. Our data suggest that the presence of mast cells and expression of tryptase,
17 HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, and TIMP-4 are associated with keloid development.

18 Keywords: keloids, mast cells, tryptase, hypoxia-inducing factor, metalloproteinases, tissue
19 inhibitors of metalloproteinases

20

21

22

23

24

25

26

27

1. Introduction

Keloids are considered proliferative fibrous tumors, defined by the invasion of normal tissue adjacent to the edges of the initial scar and not spontaneous regression of the lesion [1]. Its histopathological features include hyperkeratinized stratified squamous epithelium, enlargement of the epidermis, absence of papillary dermis healing, presence of inflammatory infiltrate, and dense, disorganized collagen bundles [2]. Despite years of studies, its pathophysiology and treatment are still a major challenge. Our group demonstrated that keloids have a significant increase in the amount of type I collagen fibers, evidencing the presence of immature collagen (type III), cytokines and growth factors, especially transforming growth factor β (TGF- β), considered one of the most important profibrotic factors in the development of keloids [3, 4].

The healing process and the predominance of fibroblasts induce a network of cellular and molecular communications necessary for keloid formation [5]. Through the ERK1/2-PI3K/Akt signaling pathway, gap junctions between fibroblasts and mast cells significantly increase hypoxia-inducing factor 1 alpha (HIF-1 α) [6]. In addition, they induce the formation of a premature and abnormal collagen fiber [7, 8], leading mast cells to assume an autoregulating role, phagocytosing excess collagen and activating fibroblasts through paracrine signaling [9]. Studies have shown that high concentrations of mast cells facilitate transduction via SMAD and activation of TGF- β , increasing concentrations of type I collagen and, to a greater extent, type III collagen [10-12].

According to their compositions of secretory granule proteases and surface markers, mast cells are divided into tryptase positive, chymase negative and tryptase positive, chymase positive cells [13], so tryptase staining methods can identify all mast cells [14]. Through the activation of PAR2/P38/JNK, tryptase is released during mastocyte degranulation, inducing the proliferation and migration of fibroblasts [15] and a consequent increase in the amount of new, loose, and thin collagen fibers, which are the main characteristics of immature collagen [16]. This signaling pathway is also responsible for inducing the expression of TGF- β and VEGF [17, 18].

HIF-1 α , stimulated by hypoxia, is produced in inflammatory environments and destroys the vascularization network, which increases consumption and results in oxygen unavailability [19]. In keloid scars, this factor remains increased due to excessive formation of the collagen fiber chain [20]. Several signaling pathways have been reported in different physiological

Resultados

1 changes, such as inflammation, cancer, and tumor progression [21, 22]. In keloids, it was
2 reported that HIF-1 α , through the activation of the STAT signaling pathway, promotes the
3 proliferation and survival of fibroblasts under conditions of low tissue oxygenation [23, 24].
4 Stimulating the MAPK/ERK signaling pathway generates abnormal fibroblast activity, in
5 which the ERK1/2 phosphorylation induces excessive collagen production [25].

6 Metalloproteinases (MMPs) are part of a family of zinc-dependent endopeptidases
7 whose primary function is collagenolytic activity [26]. Produced by several cells, including
8 fibroblasts, they play an important role in scar formation and may be relevant in the formation
9 of keloids [27]. Some MMPs have been reported in keloids, such as MMP-1 [28], MMP-2 [29],
10 MMP-3 [30], MMP-9 [31], and MMP-13 [32]. However, the role of membrane-type-1 matrix
11 metalloproteinases, known as MT1-MMP and MMP-14, remains unknown in this context.
12 Recent studies demonstrate a prevalence of MT1-MMP in inflammatory and fibrotic
13 environments [33, 34], commonly found in keloids, in which they stimulate the rapid production
14 of type III collagen, which, as a homotrimer molecule, has stronger bonds and, consequently,
15 greater resistance to cleavage [9, 35]. Studies have shown that the increase in MT1-MMP is
16 related to the progression and invasion of ovarian tumors and ascites [36, 37]. The poor
17 prognosis of squamous cell carcinomas correlates with the interaction between HIF-1 α and
18 MT1-MMP [34]. In animal pancreatic carcinomas, MT1-MMP induces rapid phosphorylation
19 of SMAD2, responsible for the signaling pathway of TGF- β production, increasing collagen
20 production [38]. Furthermore, TGF- β can induce mast cells to produce MT1-MMP through the
21 PCK/MEK/ERK signaling pathway [39].

22 The proteolytic activity of MMPs is inhibited by TIMPs (tissue inhibitors of
23 metalloproteinases), which so far have been identified in four groups: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-
24 3, and TIMP-4 [40]. Correct interaction between MMPs and TIMPs is crucial to extracellular
25 matrix (ECM) homeostasis, and its imbalance generates several changes, such as
26 atherosclerosis, cancer, as well as hypertrophic and keloid scars [41-44]. Few studies explore
27 the role of TIMPs in keloids [42, 45], hindering important discussions in the recognition of its
28 pathophysiology. Types 3 and 4 metalloproteinase inhibitors have been reported in cases of
29 malignant tumors, cardiovascular disorders, and periapical lesions [46-48]. TIMP-3 expression
30 may be related to the inhibition of MT1-MMP in atherosclerotic formations [49]. However, in
31 cases of squamous cell carcinoma, no significant correlation was found [50]. Discoveries have
32 reported TIMP-4 as an anti-angiogenic factor, which may be an important factor in the
33 formation of keloids [51, 52].

1 The pathophysiology of keloids has been shown to be an intense interaction of several
2 factors mediated by the intense inflammatory environment, so it has not yet been completely
3 elucidated. Thus, the present study aimed to evaluate *in situ* the immunohistochemistry
4 expression of HIF-1 α , MMP-14, TIMP-3, and TIMP-4, in addition to the presence of mast cells
5 assessed by toluidine blue staining and tryptase immunostaining, in keloids and compare them
6 with normal scars.

7 8 **Material and Methods**

9 10 **2.1. Casuistry**

11 We analyzed 34 biopsies from 17 patients with keloid and 17 normal scars. The biopsies
12 were performed by a team of plastic surgeons at the Outpatient Clinic Maria da Glória of
13 UFTM. The study included patients diagnosed with keloid with abnormal scarring, growth of
14 the lesion edges beyond the margins of the original scar, and signs and symptoms such as pain,
15 itching, redness, and induration. Patients received corticosteroids (triamcinolone at 20 mg/mL)
16 once a month and, after improvement, underwent reconstructive surgery, and a fragment of
17 tissue to be discarded was collected for this study. After surgery, the patient continued with
18 corticoid applications to prevent further recurrences. As controls, fragments of normal scar
19 taken from secundiparous or multiparous patients during cesarean section were used.

20 We excluded patients with hypertrophic scars, second-intention scars, in the use of
21 systemic immunosuppressants, patients with autoimmune diseases, and immunodeficiencies of
22 any etiology or malnutrition. This project was approved by the Research Ethics Committee
23 (CEP) of the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM) under protocol number
24 45647315.4.0000.5154.

25 26 **2.2. Collection of material**

27 The doctors responsible for the sector collected the material at the outpatient clinic for
28 keloid treatment in rooms for minor surgeries. The lesion was marked with a surgical pen, and
29 after anesthesia with 2% lidocaine, a cut was made in the lesion with a scalpel, followed by
30 excision of the skin with keloid and posterior sutures. Some of the fragments were fixed in
31 buffered formalin for histopathological analysis.

2.3. Preparation of materials for histochemical analysis

The fragments fixed in 10% formaldehyde were dehydrated in increasing concentrations of alcohol (70 to 100%), diaphanized in xylene, and embedded in paraffin. Slides were prepared in 4 μm -thick serial sections. Serial sections were performed; slide number 1 was stained with hematoxylin and eosin, slide number 2 was stained with toluidine blue staining, and other slides were stored for immunohistochemistry.

2.4 Toluidine Blue Staining

Toluidine Blue Staining Sections to be stained with toluidine blue were rinsed for 2 minutes in 0.5 N HCl and then covered with a solution of 0.5% (wt/vol) toluidine blue in 0.5 N HCl for 30 minutes. The sections were then rinsed in deionized water, dehydrated in absolute ethanol, cleaned in xylene, and mounted with a cover slip and Entellan.

2.5. Immunohistochemistry

Indirect immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of Tryptase, MMP-14, TIMP-3, TIMP-4, and HIF-1 α . Deparaffinized sections were treated with 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 min for endogenous peroxidase inhibition, incubated for 30 min at 90°C for antigen retrieval, and then incubated with PBS 2% BSA to reduce non-specific binding. Next, the sections were incubated with a monoclonal antibody specific for human anti-human mast cell tryptase (1:1000; Dako, Denmark; cod-M705229-2), anti-HIF-1 α (1:2000; Merck, Denmark; cod-SAB5600056), anti-MMP-14 (1:20; R&D Systems, USA; cod-MAB918), anti-TIMP-3 (1:200; R&D Systems, USA; cod-MAB973), and anti-TIMP-4 (1:50; R&D Systems, USA; cod-MAB974). In the second step, a biotinylated Link System (LSAB-K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA) was used according to manufacturer instructions. The reaction was visualized by incubating the sections with diaminobenzidine (Sigma) and counterstaining with hematoxylin.

2.6. Morphometric analysis

Morphometric analysis was performed through quantification of the number of mast cells and tryptase, MMP-14, TIMP-3, TIMP-4, and HIF-1 β immunopositive cells. Analysis was performed on the histologic images captured with a digital system and analyzed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). For this purpose, each field to be quantified was captured with a camera coupled to the microscope and a computer for image

1 scanning. For analysis of mast cells, the cells were counted under the microscope. The number
2 of cells in each field was determined, as well as the area of each field. The density of positive
3 cells was expressed as the number of cells per square millimeter. The density of positive cells
4 was expressed by the number of positive cells divided by the area of each field multiplied by
5 the number of fields.

6 7 **2.7. Statistical analysis**

8 Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.-
9 USA). The assumption of normality of quantitative variables was checked by the Kolmogorov-
10 Smirnov test. The variables showed non-homogeneous distribution or variance and were
11 expressed as medians with minimum and maximum values and percentiles and analyzed by a
12 non-parametric Mann-Whitney test. The correlation between two continuous variables with a
13 non-normal distribution was analyzed by the Spearman test (rS). Results were considered
14 statistically significant when the probability was less than 5% ($p < 0.05$).

15 16 **2. Results**

17
18 This study evaluated 34 biopsies, 17 from patients with keloids and 17 from normal
19 scars. Hematoxylin and Eosin stained biopsies was used to confirm the diagnostic of keloid
20 (Figure 1A, 1B).

21 The mean age of patients with keloid was 29.04 ± 14.98 , and in the control group, 28.79
22 ± 5.42 (Table 1). There was a predominance of females (52.94%), non-white (52.94%), with
23 patients of direct black ancestry (70.58%). The most common location of the keloid was in the
24 earlobe due to piercing/earring (76.47%) (Table 1).

25 A significant increase in mast cells assessed by toluidine blue staining was found in
26 keloids compared to normal scars (Figure 1C, 1D) (Figure 3A). Positive immunostaining for
27 tryptase was significantly higher in keloid samples when compared with controls (Figure 2A,
28 2B) (Figure 3B).

29 HIF-1 β expression in keloid scar biopsies was significantly higher when compared with
30 normal scars (Figure 2C, 2D) (Figure 3C).

31 When comparing the expression of MT1-MMP between the studied groups, a significant
32 increase was observed in patients with keloid in relation to the control groups (Figure 2E, 2F)
33 (Figure 3D).

Resultados

1 Regarding the analysis of positive immunostaining for metalloproteinase inhibitors,
2 patients with keloids had a higher expression of TIMP-3 when compared with control groups
3 (Mann-Whitney; $p < 0.0001$) (Figure 2G, 2H) (Figure 3E). Likewise, TIMP-4 quantification was
4 significantly higher in keloid samples compared with the control group (Figure 2I, 2J) (Figure
5 3F).

6 As well known, mast cells can be assessed by Toluidine Blue and Tryptase and our
7 results confirm a significant positive correlation detected between the number of mast cells in
8 these two different techniques in keloids (Figure 4). In normal scars, there was a significant
9 positive correlation between the number of mast cells and MMP-14 and TIMP-3, in addition to
10 MMP-14 and TIMP-3 (data not shown).

11

1 Table 1 - General and clinical characteristics of patients with keloid scars.

2

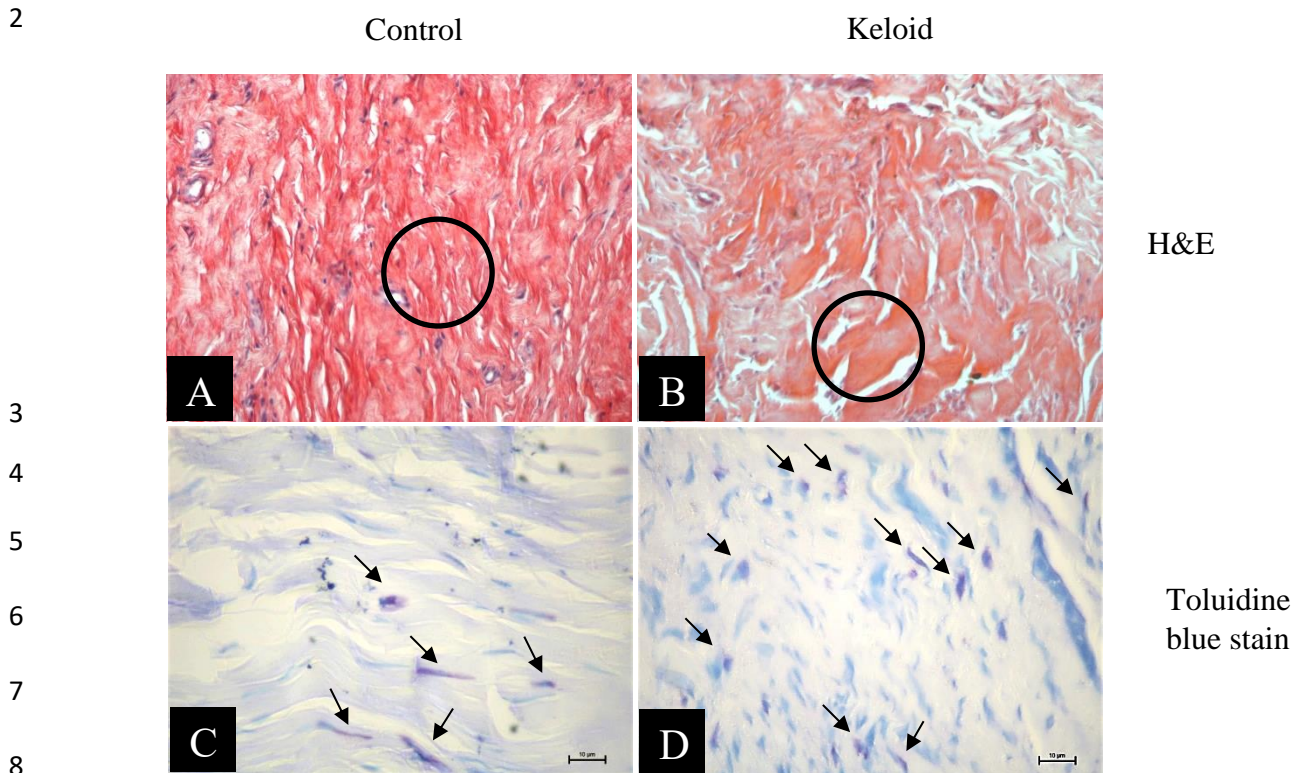
Table 1 – Demographic and clinical characteristics of patients with keloid scars

Total biopsies	17
Mean age	29,04±14,98
Gender (Female)	9 (52,94%)
Non-white	9 (52,94%)
Black ancestry	12 (70,58%)
Positive family history	4 (23,53%)
Anatomical location of the biopsies	
Earlobe	15 (88,23%)
Chest	2 (11,76%)
Cause of keloid	
Ear piercing	15 (88,23%)
Surgery/trauma	2 (11,76%)

3

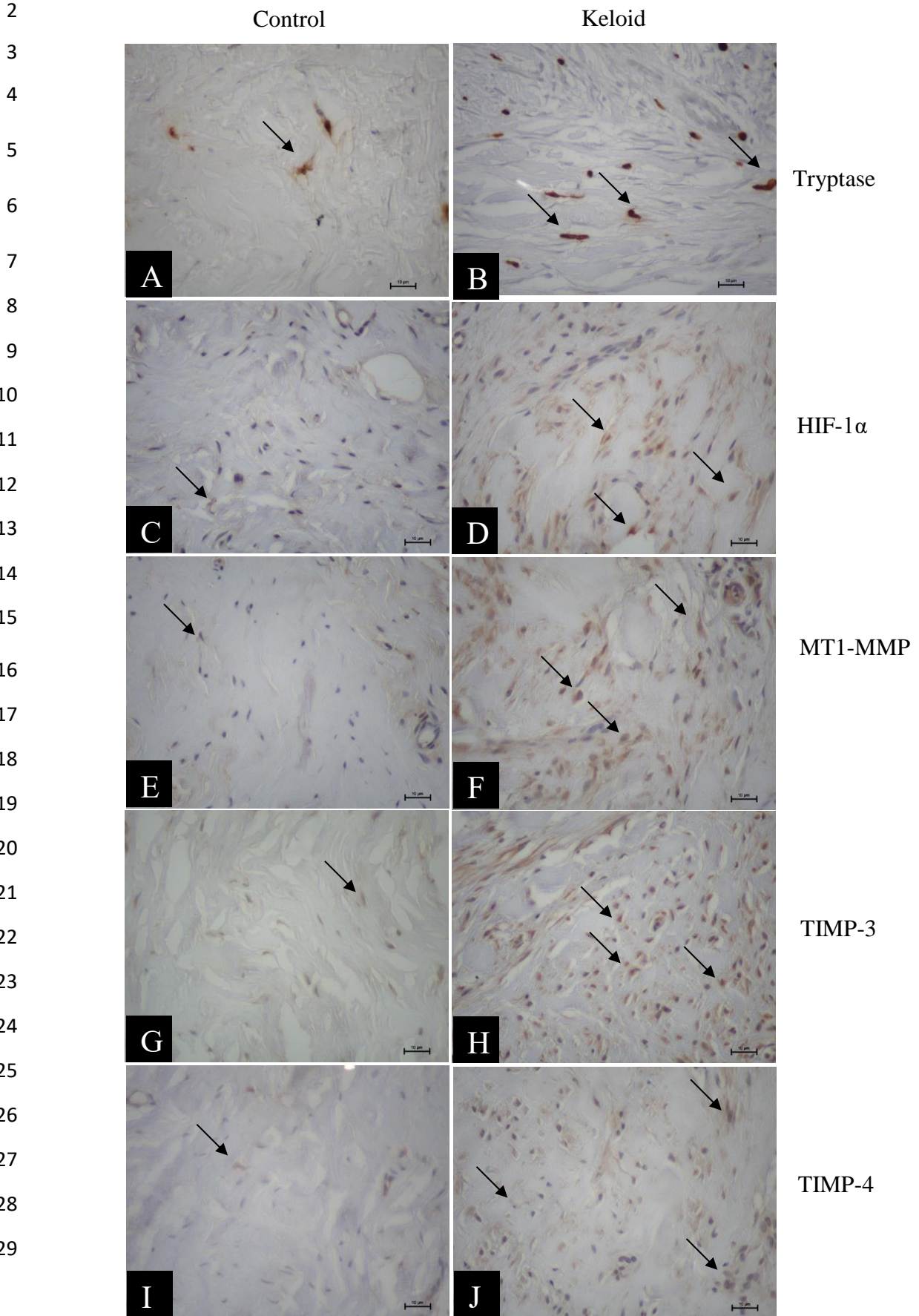
4

1 Figure 1



9 Figure 1: A) Histological section of control biopsies stained with Hematoxylin and Eosin seen
 10 in ordinary light (40x). B) Histological section of keloid stained with Hematoxylin and Eosin
 11 seen in ordinary light (40x). C) Histological section of control biopsies stained with toluidine
 12 blue seen in ordinary light (40x). D) Histological section of keloid stained with toluidine blue
 13 seen in ordinary light (40x). Black circles show collagen fibers pattern. Black arrows show mast
 14 cells. Results are expressed as the number of positive cells/mm².
 15

1 Figure 2



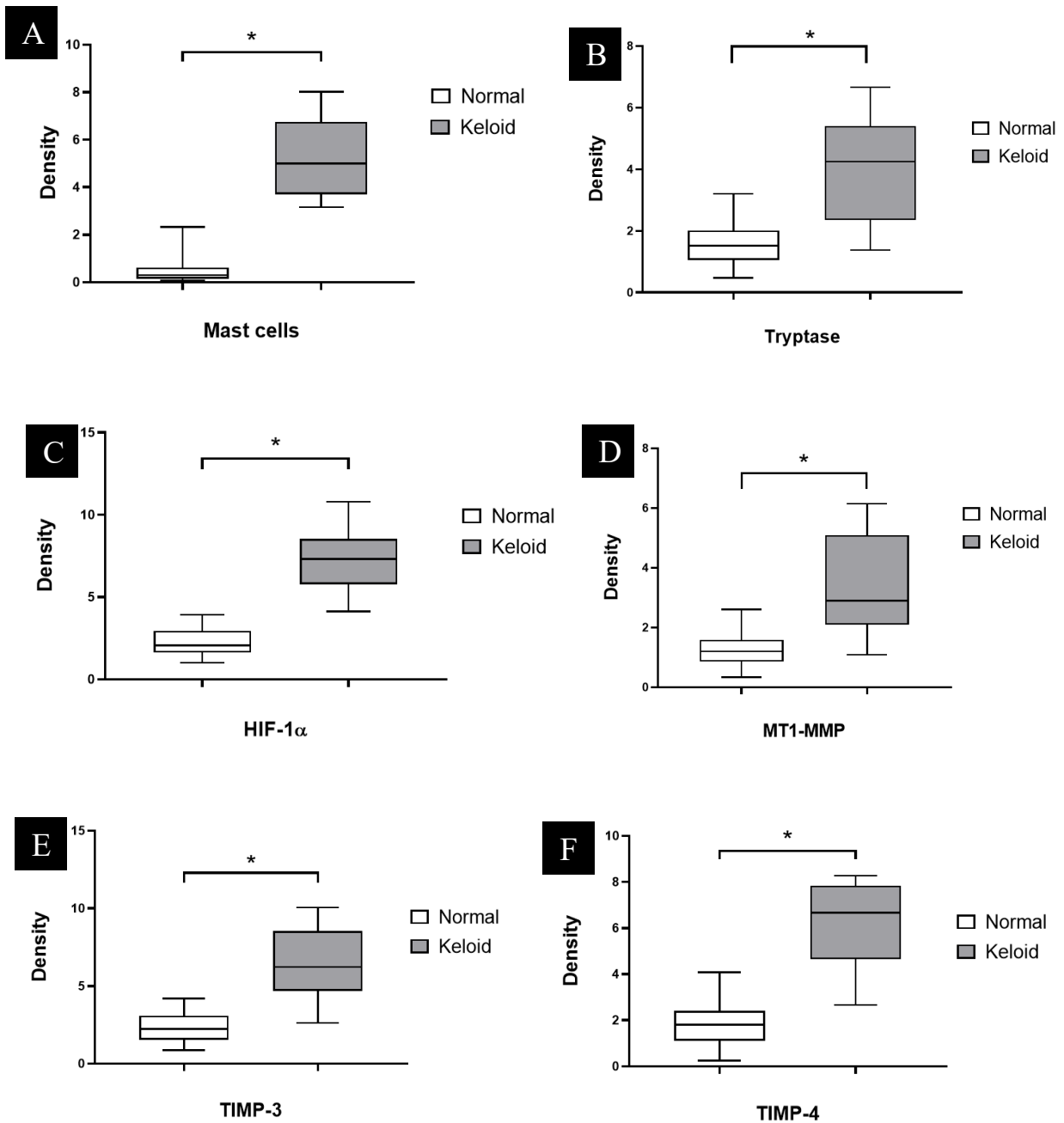
Resultados

1 Figure 2: A) Expression of tryptase in the control group by immunohistochemical staining
2 (40x). B) Expression of tryptase in the keloid group by immunohistochemical staining (40x).
3 C) Expression of HIF-1 α in the control group by immunohistochemical staining (40x). D)
4 Expression of HIF-1 α in keloid by immunohistochemical staining (40x). E) Expression of
5 MT1-MMP in control group by immunohistochemical staining (40x). F) Expression of MT1-
6 MMP in keloid by immunohistochemical staining (40x). G) Expression of TIMP-3 in the
7 control group by immunohistochemical staining (40x). H) Expression of TIMP-3 in keloid by
8 immunohistochemical staining (40x). I) Expression of TIMP-4 in control group by
9 immunohistochemical staining (40x). J) Expression of TIMP-4 in keloid by
10 immunohistochemical staining (40x).
11

Resultados

1 Figure 3

2



3

4

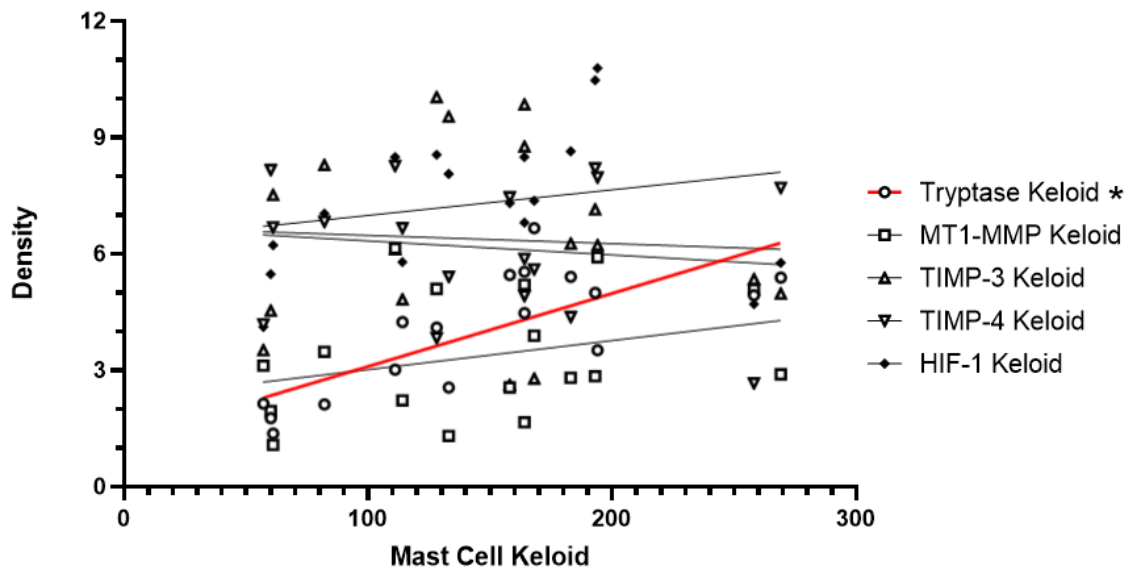
5

6

7

8 Figure 3: A) Presence of mast cells in biopsies of patients with keloid compared with the control
 9 group (Mann-Whitney; $p < 0.001$). B) Density of tryptase in patients with keloid compared with
 10 the control group (Mann-Whitney; $p < 0.001$). C) Density of HIF-1 α in patients with keloid
 11 compared with the control group (Mann-Whitney; $p < 0.001$). D) Density of MT1-MMP in
 12 patients with keloid compared with the control group (Mann-Whitney; $p < 0.001$). E) Density
 13 of TIMP-3 in patients with keloid compared with the control group (Mann-Whitney; $p < 0.001$).
 14 F) Density of TIMP-4 in patients with keloid compared with the control group (Mann-Whitney;
 15 $p < 0.001$). The horizontal line represents the median, the bar percentile of 25% to 75%, and the
 16 vertical line of 10 to 90%. White bars represent the control group, and gray bars represent
 17 keloids. *Indicates a significant difference.

1 Figure 4
2



3
4
5
6
7
8

Figure 4: Correlation between the number of mast cells and the density of tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, and TIMP-4 (Spearman; $p = 0.0004$, $r = 0,756$). *Indicates a significant difference.

3. Discussion

In the present study, immunostaining for tryptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, TIMP-4 and toluidine blue staining for mast cells were evaluated in keloid scars *in situ*.

The mean age of patients with keloids was 29.04 ± 14.98 years, with the lowest age being 15 years and the highest, 56 years, with a predominance of females (52.94%). Similar studies show groups with a mean age of 31.72 and 32.1 years, in the range of 19–50 and 18–53 years [53, 54]. Keloids are more common in adolescents, young adults, and women, suggesting that sex hormones, such as androgens and estrogens, which have vasodilating effects, intensify inflammation, worsening keloids [55]. Therefore, therapies with hormone receptors have been used as a treatment to modulate the healing process of keloids [56], and transgender populations have been the target of studies due to hormonal and aesthetic treatments that predispose them to keloid formation [57].

Also, in relation to socioeconomic characteristics, a prevalence of patients of non-white ethnicity (52.94%) and black descent (70.58%) was observed. Strong genetic evidence demonstrates that African ancestry increases the risk of keloid and fibrotic diseases [58, 59]. The most common location of the keloid was on the earlobe due to piercing or earring perforation. Over the years, there has been an increase in the popularity of piercings in several places, especially in the ears and in adolescents, grouping hormonal issues with the recurrence of perforations [60].

There was a significant increase in mast cells in keloids when compared with normal scars. Mast cells have been considered important inflammatory mononuclear cells in the process of keloid formation, aiding in the symptoms of redness and especially the common pruritus in these lesions [61]. Studies agree with our results, reiterating that they are found in high numbers in areas of high collagen and fibroblast proliferation [62] and that treatments with mast cell inhibitors induce a decrease in scar contraction and a reduction in fibrosis [63]. This information indicates the critical role of these cells in the maintenance of inflammation and fibrosis formation in keloids, which may be closely related to the inflammatory, fibrotic, and immature environment present in keloids.

Positive immunostaining for tryptase was significantly higher in keloid samples compared with controls. Other studies agree with this result [61], and authors are considering tryptase as an important fibrosis-inducing growth factor [64] due to the activation of signaling pathways for the potentiation of fibroblasts [65], in addition to fibroblast-mast cell

Resultados

1 communications that are potential stimulators of excessive collagen formation [8]. Therefore,
2 studies on anti-inflammatory drugs, such as dexamethasone [66], and tryptase inhibitors, such
3 as gabexate mesylate and nafamostat mesylate, have been considered as treatments against
4 keloid formation [67]. Mast cells seem to be of utmost importance in the pathophysiology of
5 keloids. Further studies on their biological interactions are necessary due to the range of events
6 that can be triggered by these cells. Our study found a significant positive correlation between
7 the number of mast cells and the immunoexpression of tryptase. Thus, mast cells and their
8 degranulation products may contribute to the non-maturation of collagen fibers in keloids and,
9 consequently, the formation of fibrosis.

10 Our results demonstrated increased HIF-1 α in keloid biopsies compared with normal
11 scars. In agreement with our findings, the authors describe that the hypoxia environment found
12 in keloids induces an increase in the secretion of HIF-1 α [54, 68], leading fibroblasts to increase
13 the expression of the COL1A1 gene and, consequently, the formation of fibrosis [69]. It was
14 also described that HIF-1 α induces TGF- β via SMAD2/3, increasing collagen production and
15 consequently increasing local hypoxia. In this way, the authors suggest treatments with HIF-1 α
16 inhibitors to prevent keloid progression [70]. The mechanisms of action of HIF-1 α in keloids
17 have not yet been elucidated and may provide a greater understanding of the topic. Therefore,
18 HIF-1 α has been the subject of studies with the aim of helping to understand the
19 pathophysiology of keloids.

20 When comparing the expression of MT1-MMP between the studied groups, a significant
21 increase was observed in patients with keloids compared with controls. This is the preferential
22 enzyme in the degradation of type I collagen [71], and in keloids, the MT1-MMP/MMP-
23 2/TIMP-2 complex is present at the edges of the scar, which may be contributing to the invasion
24 of the surrounding normal skin, degrading the MEC of adjacent non-keloid regions [29]. Data
25 on the action of MT1-MMP on keloids are scarce, being important in the migration and invasion
26 of fibroblasts [72], in addition to presenting a significant increase in inflammatory
27 environments [73] and cases of angiofibroma [74], corroborating our results. Recent research
28 on cardiac fibrosis has demonstrated a concomitant increase in MT1-MMP, type I and III
29 collagen, and TGF- β [75], also relevant in the induction of angiogenesis [76] and tumor growth
30 [77]. Moreover, MT1-MMPs, when cleaving collagen, release an intramolecular cell adhesion
31 called the RGD motif that activates integrins and the P13K/AKT/IKB signaling pathway,
32 inducing the maintenance and survival of liver stellate cells, analogous to fibroblasts, and
33 consequently increasing collagen production [78]. Thus, our study may be relevant in the

1 investigation of MT1-MMP for its profibrotic activity, and more research should be carried out
2 to understand the importance of these molecules in the formation and aggravation of keloids.

3 Regarding the analysis of positive immunostaining for metalloproteinase inhibitors,
4 patients with keloids had a higher expression of TIMP-3 and TIMP-4 when compared with
5 controls, which may be an attempt to control the increase and activity of MMPs and aim at the
6 integrity of the MEC [79]. Similarly, a significant increase in TIMP-1, -2, and -3 was
7 demonstrated in the keloid's central and border regions, demonstrating that inhibition of
8 collagen degradation can be found throughout the scar and not only at specific points [29, 80].
9 Cardiovascular studies have shown that the TGF- β /TIMP-3 correlation predisposes to fibrosis
10 [81], and in keloids, TGF- β is responsible for activating TIMP-3 through three signaling
11 pathways: TAK1/MKK3/6/p38, Ras/Mek1/ERK1/2 and Smad3/4, further inhibiting collagen
12 degradation and consequently the formation of fibrosis [82]. No studies were found relating
13 TIMP-4 with keloids but with diseases similar to the keloid environment, such as pulmonary
14 fibrosis [83] and joint inflammation [84]. An increase in TIMP-4 was found in endometrial
15 samples from women with gestational hypertension [85] and progesterone supplementation for
16 fertility [86]. Moreover, studies reveal an important correlation between hypertension [87],
17 pregnancy [88], and hormones [57] in the formation of keloids, and that with this, they may be
18 modulating the expression of TIMP-4 and consequently increasing the performance of these
19 inhibitors against metalloproteinases.

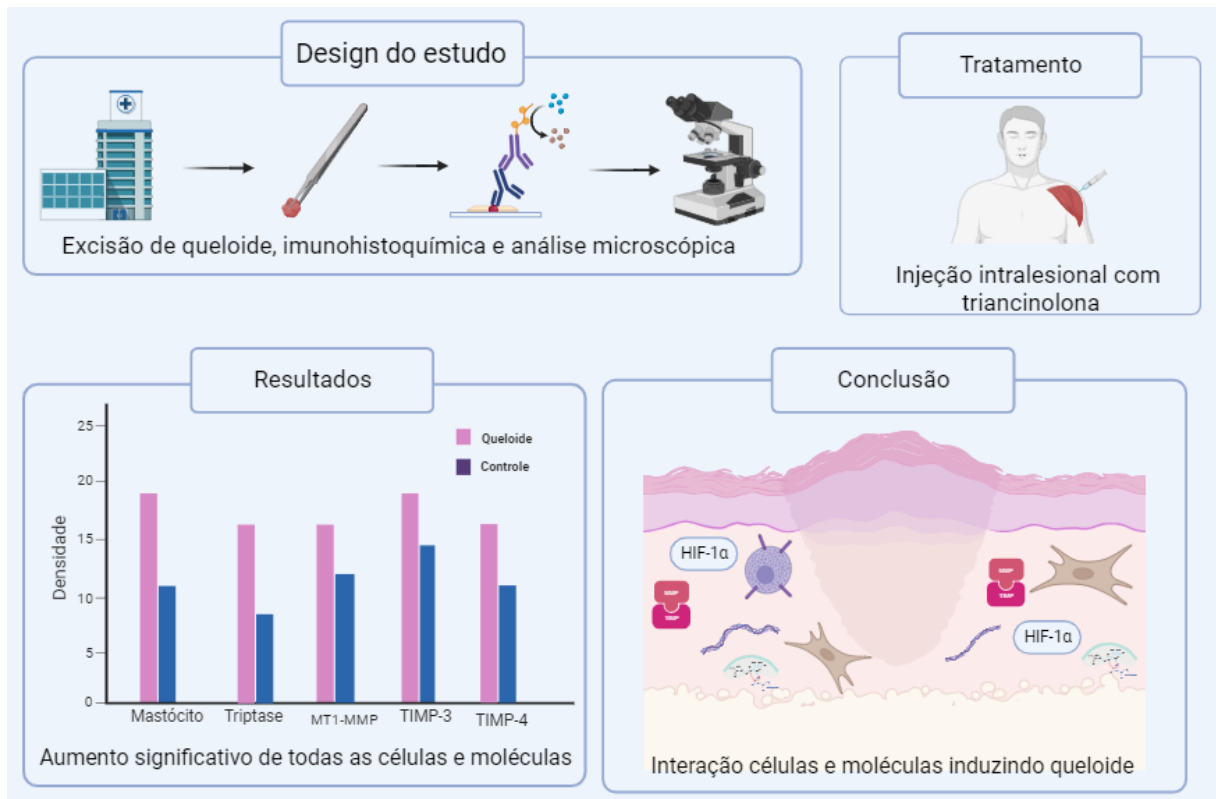
20 Despite all the studies in the area of keloid formation, its pathogenesis is still not
21 completely elucidated. Therefore, specific findings are gradually explaining the factors
22 involving the signs, symptoms, and progressions of this type of scar.

23 24 **4. Conclusion**

25
26 In conclusion, in the present study, patients with keloid have a significant increase in
27 mast cells, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, and TIMP-4 compared with patients with normal
28 scars, suggesting a close relationship between these factors with keloid progression, the
29 presence of signs and symptoms, such as redness and itching, and intense fibrosis.

5. Graphical abstract

1
2



3

References

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

1. Jones, M.E., C. Hardy, and J. Ridgway, *Keloid Management: A Retrospective Case Review on a New Approach Using Surgical Excision, Platelet-Rich Plasma, and In-office Superficial Photon X-ray Radiation Therapy*. *Adv Skin Wound Care*, 2016. **29**(7): p. 303-7.
2. Lee, J.Y., et al., *Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar*. *Am J Dermatopathol*, 2004. **26**(5): p. 379-84.
3. da Cunha Colombo Tiveron, L.R., et al., *High in situ mRNA levels of IL-22, TGF-beta, and ARG-1 in keloid scars*. *Immunobiology*, 2018. **223**(12): p. 812-817.
4. da Silva, I.R., et al., *In Situ Cytokine Expression and Morphometric Evaluation of Total Collagen and Collagens Type I and Type III in Keloid Scars*. *Mediators Inflamm*, 2017. **2017**: p. 6573802.
5. Liu, Y., et al., *TGF-beta1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via up-regulating MicroRNA-21*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 32231.
6. Zhang, Q., et al., *Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and PI-3K/Akt*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(2): p. 145-55.
7. Foley, T.T. and H.P. Ehrlich, *Through gap junction communications, co-cultured mast cells and fibroblasts generate fibroblast activities allied with hypertrophic scarring*. *Plast Reconstr Surg*, 2013. **131**(5): p. 1036-1044.
8. Foley, T.T., et al., *Rat mast cells enhance fibroblast proliferation and fibroblast-populated collagen lattice contraction through gap junctional intercellular communications*. *Plast Reconstr Surg*, 2011. **127**(4): p. 1478-1486.
9. Arbi, S., et al., *Premature collagen fibril formation, fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids*. *Ultrastruct Pathol*, 2015. **39**(2): p. 95-103.
10. Chen, H., et al., *Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF-beta1/Smads signaling pathway*. *Exp Ther Med*, 2017. **14**(5): p. 4438-4442.
11. Chen, Y., et al., *Connection between T regulatory cell enrichment and collagen deposition in keloid*. *Exp Cell Res*, 2019. **383**(2): p. 111549.
12. Dong, X., et al., *Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via transforming growth factor-beta1/Smad activation in keloid fibroblasts*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(7): p. 3596-607.
13. Moon, T.C., et al., *Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function*. *Mucosal Immunol*, 2010. **3**(2): p. 111-28.
14. Alanazi, S., et al., *Mast Cell beta-Tryptase Is Enzymatically Stabilized by DNA*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(14).
15. Tan, H., et al., *CKAP4 participates in tryptase-induced phenotypic conversion in atrial fibroblasts through PAR2/p38/JNK pathway*. *Am J Transl Res*, 2021. **13**(4): p. 2270-2282.
16. Bansal, D., et al., *Interplay of collagen and mast cells in periapical granulomas and periapical cysts: a comparative polarizing microscopic and immunohistochemical study*. *Restor Dent Endod*, 2022. **47**(1): p. e12.

- 1 17. Akers, I.A., et al., *Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via*
2 *protease-activated receptor-2*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(1): p.
3 L193-201.
- 4 18. Liu, Y. and B.M. Mueller, *Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial*
5 *growth factor expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways*. Biochem Biophys
6 Res Commun, 2006. **344**(4): p. 1263-70.
- 7 19. Celeste, C.J., et al., *Regional differences in wound oxygenation during normal healing*
8 *in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder*. Wound Repair Regen,
9 2011. **19**(1): p. 89-97.
- 10 20. Yang, X., et al., *STAT3/HIF-1alpha signaling activation mediates peritoneal fibrosis*
11 *induced by high glucose*. J Transl Med, 2021. **19**(1): p. 283.
- 12 21. Bruning, U., et al., *NFkappaB and HIF display synergistic behaviour during hypoxic*
13 *inflammation*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(8): p. 1319-29.
- 14 22. Zhang, C., et al., *STAT3 inhibitor NSC74859 radiosensitizes esophageal cancer via the*
15 *downregulation of HIF-1alpha*. Tumour Biol, 2014. **35**(10): p. 9793-9.
- 16 23. Lee, S.Y., et al., *IL-17 Induces Autophagy Dysfunction to Promote Inflammatory Cell*
17 *Death and Fibrosis in Keloid Fibroblasts via the STAT3 and HIF-1alpha Dependent*
18 *Signaling Pathways*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 888719.
- 19 24. Zhang, Z., et al., *Increased periostin expression affects the proliferation, collagen*
20 *synthesis, migration and invasion of keloid fibroblasts under hypoxic conditions*. Int J
21 Mol Med, 2014. **34**(1): p. 253-61.
- 22 25. Kim, J., et al., *Hypoxia-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition Mediates*
23 *Fibroblast Abnormalities via ERK Activation in Cutaneous Wound Healing*. Int J Mol
24 Sci, 2019. **20**(10).
- 25 26. Vuong, T.T., et al., *Processed eggshell membrane powder regulates cellular functions*
26 *and increase MMP-activity important in early wound healing processes*. PLoS One,
27 2018. **13**(8): p. e0201975.
- 28 27. Xie, J., et al., *Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of extracellular*
29 *matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing*. Clin Exp Dermatol, 2008.
30 **33**(2): p. 176-82.
- 31 28. Jeon, Y.R., et al., *Hepatocyte growth factor-expressing adenovirus upregulates matrix*
32 *metalloproteinase-1 expression in keloid fibroblasts*. Int J Dermatol, 2016. **55**(3): p.
33 356-61.
- 34 29. Imaizumi, R., et al., *Promoted activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in*
35 *keloid fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen bundle regions:*
36 *implications for mechanisms of keloid progression*. Histopathology, 2009. **54**(6): p.
37 722-30.
- 38 30. Lee, W.J., et al., *Decorin-expressing adenovirus decreases collagen synthesis and*
39 *upregulates MMP expression in keloid fibroblasts and keloid spheroids*. Exp Dermatol,
40 2015. **24**(8): p. 591-7.
- 41 31. Lee, Y.I., et al., *Tissue-remodelling M2 Macrophages Recruits Matrix Metallo-*
42 *proteinase-9 for Cryotherapy-induced Fibrotic Resolution during Keloid Treatment*.
43 Acta Derm Venereol, 2020. **100**(17): p. adv00306.
- 44 32. Uchida, G., et al., *Tretinoin reverses upregulation of matrix metalloproteinase-13 in*
45 *human keloid-derived fibroblasts*. Exp Dermatol, 2003. **12 Suppl 2**: p. 35-42.
- 46 33. Akama, T. and T.H. Chun, *Transcription factor 21 (TCF21) promotes proinflammatory*
47 *interleukin 6 expression and extracellular matrix remodeling in visceral adipose stem*
48 *cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(17): p. 6603-6610.

- 1 34. Fu, Z.Y. and F. Tao, [Expression levels of MMP-14, ING4 and HIF-1alpha in 60
2 patients with oral squamous cell carcinoma and their clinical significance]. Shanghai
3 Kou Qiang Yi Xue, 2020. **29**(6): p. 642-646.
- 4 35. Xiao, J., et al., Local conformation and dynamics of isoleucine in the collagenase
5 cleavage site provide a recognition signal for matrix metalloproteinases. J Biol Chem,
6 2010. **285**(44): p. 34181-90.
- 7 36. Escalona, R.M., et al., Expression of TIMPs and MMPs in Ovarian Tumors, Ascites,
8 Ascites-Derived Cells, and Cancer Cell Lines: Characteristic Modulatory Response
9 Before and After Chemotherapy Treatment. Front Oncol, 2021. **11**: p. 796588.
- 10 37. Sakata, K., et al., Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-
11 MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary.
12 Int J Oncol, 2000. **17**(4): p. 673-81.
- 13 38. Krantz, S.B., et al., MT1-MMP cooperates with Kras(G12D) to promote pancreatic
14 fibrosis through increased TGF-beta signaling. Mol Cancer Res, 2011. **9**(10): p. 1294-
15 304.
- 16 39. Kimata, M., et al., Production of matrix metalloproteinases in human cultured mast
17 cells: involvement of protein kinase C-mitogen activated protein kinase kinase-
18 extracellular signal-regulated kinase pathway. Allergol Int, 2006. **55**(1): p. 67-76.
- 19 40. Brew, K. and H. Nagase, The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an
20 ancient family with structural and functional diversity. Biochim Biophys Acta, 2010.
21 **1803**(1): p. 55-71.
- 22 41. Di Gregoli, K., et al., MicroRNA-181b Controls Atherosclerosis and Aneurysms
23 Through Regulation of TIMP-3 and Elastin. Circ Res, 2017. **120**(1): p. 49-65.
- 24 42. Dohi, T., et al., Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Suppresses Collagen Synthesis
25 in Cultured Keloid Fibroblasts. Plast Reconstr Surg Glob Open, 2015. **3**(9): p. e520.
- 26 43. Salimi Sartakhti, J., M.H. Manshaei, and M. Sadeghi, MMP-TIMP interactions in
27 cancer invasion: An evolutionary game-theoretical framework. J Theor Biol, 2017. **412**:
28 p. 17-26.
- 29 44. Simon, F., et al., Enhanced secretion of TIMP-1 by human hypertrophic scar
30 keratinocytes could contribute to fibrosis. Burns, 2012. **38**(3): p. 421-7.
- 31 45. Aoki, M., et al., siRNA knockdown of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in keloid
32 fibroblasts leads to degradation of collagen type I. J Invest Dermatol, 2014. **134**(3): p.
33 818-826.
- 34 46. Arba, F., et al., Small Vessel Disease Is Associated with Tissue Inhibitor of Matrix
35 Metalloproteinase-4 After Ischaemic Stroke. Transl Stroke Res, 2019. **10**(1): p. 44-51.
- 36 47. Cassanta, L.T.C., et al., Modulation of Matrix Metalloproteinase 14, Tissue Inhibitor of
37 Metalloproteinase 3, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4, and Inducible Nitric
38 Oxide Synthase in the Development of Periapical Lesions. J Endod, 2017. **43**(7): p.
39 1122-1129.
- 40 48. Shrestha, M., et al., The transition of tissue inhibitor of metalloproteinases from -4 to -
41 1 induces aggressive behavior and poor patient survival in dedifferentiated liposarcoma
42 via YAP/TAZ activation. Carcinogenesis, 2019. **40**(10): p. 1288-1297.
- 43 49. Johnson, J.L., et al., Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage
44 activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. Mediators Inflamm, 2014.
45 **2014**: p. 276457.
- 46 50. Birkedal-Hansen, B., et al., MMP and TIMP gene expression in head and neck
47 squamous cell carcinomas and adjacent tissues. Oral Dis, 2000. **6**(6): p. 376-82.

- 1 51. Givvimani, S., et al., *MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3 in transition*
2 *from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure.*
3 *Arch Physiol Biochem*, 2010. **116**(2): p. 63-72.
- 4 52. Wang, S., et al., *Pre-Conditioning with IFN-gamma and Hypoxia Enhances the*
5 *Angiogenic Potential of iPSC-Derived MSC Secretome.* *Cells*, 2022. **11**(6).
- 6 53. Danielsen, P.L., et al., *Verapamil is Less Effective than Triamcinolone for Prevention*
7 *of Keloid Scar Recurrence After Excision in a Randomized Controlled Trial.* *Acta Derm*
8 *Venerol*, 2016. **96**(6): p. 774-8.
- 9 54. Zhang, M., et al., *Hyperbaric oxygen therapy can ameliorate the EMT phenomenon in*
10 *keloid tissue.* *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(29): p. e11529.
- 11 55. Jurzak, M. and K. Adamczyk, *Influence of genistein on c-Jun, c-Fos and Fos-B of AP-*
12 *1 subunits expression in skin keratinocytes, fibroblasts and keloid fibroblasts cultured*
13 *in vitro.* *Acta Pol Pharm*, 2013. **70**(2): p. 205-13.
- 14 56. Jurzak, M., et al., *Evaluation of genistein ability to modulate CTGF mRNA/protein*
15 *expression, genes expression of TGFbeta isoforms and expression of selected genes*
16 *regulating cell cycle in keloid fibroblasts in vitro.* *Acta Pol Pharm*, 2014. **71**(6): p. 972-
17 86.
- 18 57. Yeung, H., et al., *Dermatologic Conditions in Transgender Populations.* *Endocrinol*
19 *Metab Clin North Am*, 2019. **48**(2): p. 429-440.
- 20 58. Flores, C., et al., *African ancestry is associated with asthma risk in African Americans.*
21 *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e26807.
- 22 59. Velez Edwards, D.R., et al., *Admixture mapping identifies a locus at 15q21.2-22.3*
23 *associated with keloid formation in African Americans.* *Hum Genet*, 2014. **133**(12): p.
24 1513-23.
- 25 60. Jones, M.E., et al., *Advancing Keloid Treatment: A Novel Multimodal Approach to Ear*
26 *Keloids.* *Dermatol Surg*, 2017. **43**(9): p. 1164-1169.
- 27 61. Shaker, S.A., N.N. Ayuob, and N.H. Hajrah, *Cell talk: a phenomenon observed in the*
28 *keloid scar by immunohistochemical study.* *Appl Immunohistochem Mol Morphol*,
29 2011. **19**(2): p. 153-9.
- 30 62. Chong, Y., et al., *Histomorphometric analysis of collagen architecture of auricular*
31 *keloids in an Asian population.* *Dermatol Surg*, 2015. **41**(3): p. 415-22.
- 32 63. Gallant-Behm, C.L., K.A. Hildebrand, and D.A. Hart, *The mast cell stabilizer ketotifen*
33 *prevents development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc*
34 *pigs.* *Wound Repair Regen*, 2008. **16**(2): p. 226-33.
- 35 64. Garbuzenko, E., et al., *Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen*
36 *synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis.* *Clin Exp*
37 *Allergy*, 2002. **32**(2): p. 237-46.
- 38 65. Frungieri, M.B., et al., *Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR2,*
39 *COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human fibrotic*
40 *disorders.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(23): p. 15072-7.
- 41 66. Foley, T.T. and H.P. Ehrlich, *Mast cells prevent dexamethasone-induced cell death of*
42 *cultured fibroblasts: relationship to gap junctional intercellular communications.* *Plast*
43 *Reconstr Surg*, 2014. **133**(5): p. 638e-644e.
- 44 67. Ammendola, M., et al., *Tryptase-positive mast cells and angiogenesis in keloids: a new*
45 *possible post-surgical target for prevention.* *Updates Surg*, 2013. **65**(1): p. 53-7.
- 46 68. Ma, X., et al., *Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like appearance and*
47 *an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment in vitro.* *Int J Mol Med*,
48 2015. **35**(5): p. 1246-56.

Resultados

- 1 69. Kang, Y., et al., *Hypoxia and HIF-1alpha Regulate Collagen Production in Keloids*. J Invest Dermatol, 2020. **140**(11): p. 2157-2165.
- 2
- 3 70. Lei, R., et al., *HIF-1alpha promotes the keloid development through the activation of TGF-beta/Smad and TLR4/MyD88/NF-kappaB pathways*. Cell Cycle, 2019. **18**(23): p. 3239-3250.
- 4
- 5
- 6 71. Ohuchi, E., et al., *Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules*. J Biol Chem, 1997. **272**(4): p. 2446-51.
- 7
- 8
- 9 72. Allen, D.L., D.H. Teitelbaum, and K. Kurachi, *Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(4): p. C805-15.
- 10
- 11
- 12 73. Duerr, S., et al., *Metalloproteinases in juvenile angiofibroma--a collagen rich tumor*. Hum Pathol, 2008. **39**(2): p. 259-68.
- 13
- 14 74. Spiekman, M., et al., *Adipose tissue-derived stromal cells inhibit TGF-beta1-induced differentiation of human dermal fibroblasts and keloid scar-derived fibroblasts in a paracrine fashion*. Plast Reconstr Surg, 2014. **134**(4): p. 699-712.
- 15
- 16
- 17 75. Gu, Y., et al., *LongShengZhi alleviated cardiac remodeling via upregulation microRNA-150-5p with matrix metalloproteinase 14 as the target*. J Ethnopharmacol, 2022. **291**: p. 115156.
- 18
- 19
- 20 76. Alfranca, A., et al., *PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1120-8.
- 21
- 22 77. Sounni, N.E., et al., *Stromal regulation of vessel stability by MMP14 and TGFbeta*. Dis Model Mech, 2010. **3**(5-6): p. 317-32.
- 23
- 24 78. Birukawa, N.K., et al., *Activated hepatic stellate cells are dependent on self-collagen, cleaved by membrane type 1 matrix metalloproteinase for their growth*. J Biol Chem, 2014. **289**(29): p. 20209-21.
- 25
- 26
- 27 79. Airola, K., et al., *Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas*. Br J Cancer, 1999. **80**(5-6): p. 733-43.
- 28
- 29
- 30 80. Bran, G.M., et al., *Effect of transforming growth factor-beta1 antisense oligonucleotides on matrix metalloproteinases and their inhibitors in keloid fibroblasts*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. **143**(1): p. 66-71.
- 31
- 32
- 33 81. Zhang, J., et al., *MicroRNA-323a-3p Promotes Pressure Overload-Induced Cardiac Fibrosis by Targeting TIMP3*. Cell Physiol Biochem, 2018. **50**(6): p. 2176-2187.
- 34
- 35 82. Niwa, H., et al., *Decrease in matrix metalloproteinase3 activity in systemic sclerosis fibroblasts causes alpha2antiplasmin and extracellular matrix deposition, and contributes to fibrosis development*. Mol Med Rep, 2020. **22**(4): p. 3001-3007.
- 36
- 37
- 38 83. Selman, M., et al., *TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L562-74.
- 39
- 40
- 41 84. Capsoni, F., et al., *alpha-Melanocyte-stimulating-hormone (alpha-MSH) modulates human chondrocyte activation induced by proinflammatory cytokines*. BMC Musculoskelet Disord, 2015. **16**: p. 154.
- 42
- 43
- 44 85. Zhang, Y., et al., *Maternal plasma TIMP-4 levels combined with clinical risk factors for the early prediction of pregnancy-induced hypertension*. Arch Gynecol Obstet, 2015. **292**(5): p. 1043-50.
- 45
- 46
- 47 86. Pilka, R., et al., *Endometrial expression of the estrogen-sensitive genes MMP-26 and TIMP-4 is altered by a substitution protocol without down-regulation in IVF patients*. Hum Reprod, 2006. **21**(12): p. 3146-56.
- 48
- 49

Resultados

- 1 87. Arima, J., et al., *Hypertension: a systemic key to understanding local keloid severity*.
2 Wound Repair Regen, 2015. **23**(2): p. 213-21.
- 3 88. Ibrahim, N.E., S. Shaharan, and B. Dheansa, *Adverse Effects of Pregnancy on Keloids*
4 *and Hypertrophic Scars*. Cureus, 2020. **12**(12): p. e12
- 5
- 6

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas, *in situ*, as imunomarcações de triptase, HIF-1 α , MT1-MMP, TIMP-3, TIMP-4, além da presença de mastócitos pela técnica de azul de toluidina em cicatrizes de queiloide.

A média de idade dos pacientes com queiloide foi de 29,04 \pm 14,98 anos, sendo a menor idade 15 anos e a maior 56 anos, tendo predominância o sexo feminino (52,94%). Estudos semelhantes mostram grupos de estudo com médias de idade de 31,72 e 32,1 anos, na faixa de 19-50 e 18-53 anos (DANIELSEN; REA; WOOD; FEAR *et al.*, 2016; ZHANG; LIU; GUAN; LIU *et al.*, 2018). Queloides são mais comuns em adolescentes, adultos jovens e mulheres, sugere-se que hormônios sexuais como andrógenos e estrógenos, que possuem efeitos vasodilatadores, e intensificam a inflamação, piorando os quadros de queiloide (JURZAK; ADAMCZYK, 2013). Por isso, terapias com receptores hormonais estão sendo utilizadas como tratamento visando modular o processo cicatricial dos queloides (JURZAK; ADAMCZYK; ANTONCZAK; GARNCARCZYK *et al.*, 2014), e populações transgênero têm sido alvo de estudos devido aos tratamentos hormonais e estéticos que predispõe a formação do queloides (YEUNG; KAHN; LY; TANGPRICHA, 2019).

Também em relação às características socioeconômicas, foi observado uma prevalência de pacientes de etnia não branca (52,94%) e descendência negra (70,58%). Fortes evidências genéticas demonstram que a ancestralidade africana aumentam o risco de queiloide e de doenças fibróticas (FLORES; MA; PINO-YANES; WADE *et al.*, 2012; VELEZ EDWARDS; TSOSIE; WILLIAMS; EDWARDS *et al.*, 2014). A localização mais comum do queiloide foi no lóbulo da orelha devido a perfuração de piercing/brinco. Com o passar dos anos, vêm ocorrendo um aumento na popularidade da aplicação de piercings em diversos locais, principalmente nas orelhas e em adolescentes, agrupando os quesitos hormonais com a recorrência de perfurações. (JONES; MCLANE; ADENEGAN; LEE *et al.*, 2017).

Foi encontrado um aumento significativo de mastócitos nos queloides quando comparados às cicatrizes normais. Os mastócitos têm sido considerados células mononucleares inflamatórias importantes no processo da formação de queiloide, auxiliando nos sintomas de rubor e principalmente do prurido comum nessas lesões (SHAKER; AYUOB; HAJRAH, 2011). Estudos demonstram concordância com nossos resultados (CHONG; PARK; SEO; CHANG, 2015), reiterando o fato de serem encontrados em maior abundância em áreas de alta proliferação de colágeno e fibroblastos (CHONG; PARK; SEO; CHANG, 2015), e que

1 tratamentos com inibidores de mastócitos induziram a uma diminuição da contração cicatricial
2 e redução da fibrose (GALLANT-BEHM; HILDEBRAND; HART, 2008). Estas informações
3 sugerem o importante papel dessas células na manutenção da inflamação e formação de fibrose
4 dos queloides, podendo estar estreitamente relacionados ao ambiente inflamatório, fibrótico e
5 imaturo presente nos queloides.

6 A imunomarcagem positiva para triptase foi significativamente maior nas amostras de
7 queleide quando comparado aos controles. Estudos demonstram concordância com esse
8 resultado (SHAKER; AYUOB; HAJRAH, 2011), sendo que autores estão considerando a
9 triptase como um importante fator de crescimento indutor de fibrose (GARBUZENKO;
10 NAGLER; PICKHOLTZ; GILLERY *et al.*, 2002), devido à ativação de vias de sinalização para
11 a potencialização de fibroblastos (FRUNGIERI; WEIDINGER; MEINEKE; KOHN *et al.*,
12 2002), além das comunicações fibroblastos-mastócitos que são potenciais estimuladores da
13 formação excessiva de colágeno (FOLEY; SAGGERS; MOYER; EHRLICH, 2011). Por isso,
14 estudos de tratamentos com anti-inflamatórios como a dexametasona (FOLEY; EHRLICH,
15 2014) e inibidores de triptase como o mesilato de gabaxato e o mesilato de nefamostate vêm
16 sendo considerados como tratamentos contra a formação de queloides (AMMENDOLA;
17 ZUCCALA; PATRUNO; RUSSO *et al.*, 2013). Os mastócitos parecem ser de extrema
18 importância na fisiopatologia do queleide, dessa forma, mais estudos sobre suas interações
19 biológicas são necessários devido a gama de eventos que podem ser desencadeados por essas
20 células. Em nosso estudo, foi encontrado uma correlação positiva e significativa entre a
21 quantidade de mastócitos e a imunexpressão de triptase, dessa forma, os mastócitos e seus
22 produtos de degranulação podem estar contribuindo para a não maturação das fibras colágenas
23 nos queloides e consequentemente a formação de fibrose.

24 Nossos resultados demonstraram um aumento de HIF-1 α em biópsias de queleide em
25 relação a cicatrizes normais. Concordando com nossos achados, autores descrevem que o
26 ambiente de hipóxia encontrado nos queloides induz aumento na secreção de HIF-1 α (MA;
27 CHEN; XU; LONG *et al.*, 2015; ZHANG; LIU; GUAN; LIU *et al.*, 2018), fazendo com que os
28 fibroblastos elevem a expressão do gene COL1A1 e consequentemente a formação de fibrose
29 (KANG; ROH; RAJADURAI; RAJADURAI *et al.*, 2020). Foi descrito também que HIF-1 α
30 induz TGF- β via SMAD2/3 elevando a produção de colágeno e consequentemente aumentando
31 a hipóxia local, dessa forma, autores sugerem tratamentos com inibidores de HIF-1 α para
32 prevenir a progressão queloidal (LEI; LI; LIU; LI *et al.*, 2019). Os mecanismos da atuação do
33 HIF-1 α nos queloides ainda não foram elucidados e podem trazer uma maior compreensão

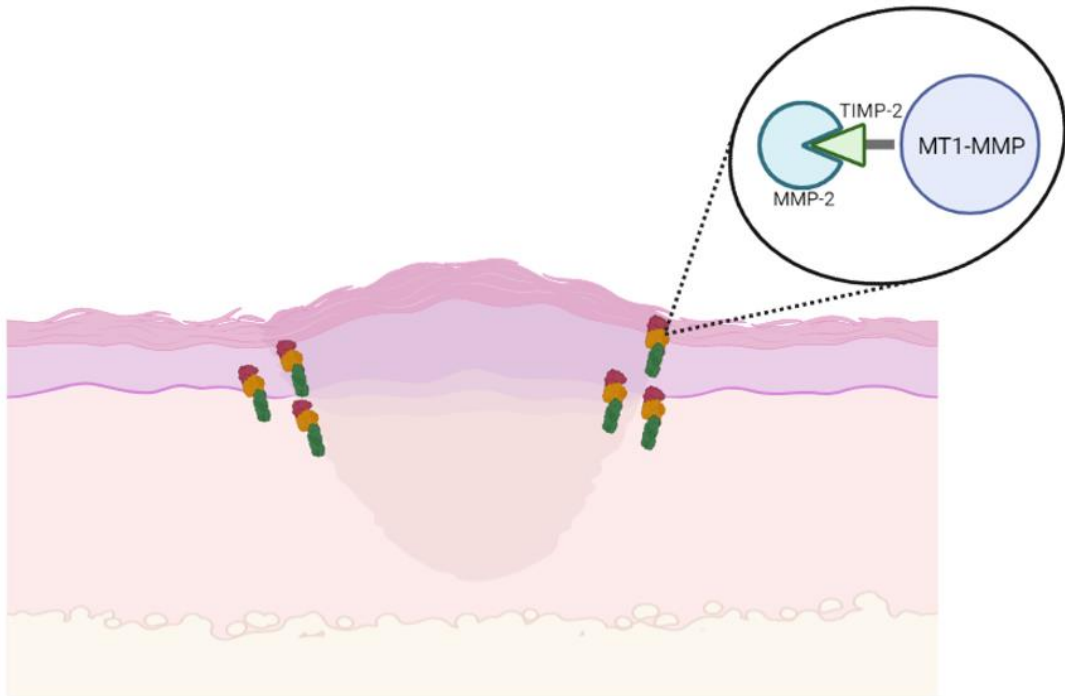
1 sobre o tema. Por isso, o HIF-1 α tem sido alvo de estudos com o intuito auxiliar no
2 entendimento da fisiopatologia dos queloides.

3 Ao comparar a expressão de MT1-MMP entre os grupos estudados, observou-se um
4 aumento significativo nos pacientes com queiloide quando comparados aos controles. Esta
5 enzima tem preferência na degradação de colágeno do tipo I (OHUCHI; IMAI; FUJII; SATO
6 *et al.*, 1997), e nos queloides, o complexo MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 está presente nas bordas
7 da cicatriz, podendo estar contribuindo para a invasão da pele normal circundante, degradando
8 a MEC das regiões não queloidais adjacentes (Figura 12) (IMAIZUMI; AKASAKA;
9 INOMATA; OKADA *et al.*, 2009). São escassos os dados sobre a ação das MT1-MMP nos
10 queloides, sendo importantes na migração e invasão de fibroblastos (ALLEN; TEITELBAUM;
11 KURACHI, 2003), além apresentar aumento significativo em meios inflamatórios (DUERR;
12 WENDLER; AIGNER; KAROSI *et al.*, 2008) e em casos de angiofibroma (SPIEKMAN;
13 PRZYBYT; PLANTINGA; GIBBS *et al.*, 2014), corroborando com nossos resultados.
14 Pesquisas recentes em fibrose cardíaca demonstraram aumento concomitante entre MT1-MMP,
15 colágenos tipo I e III e TGF- β (GU; ZHANG; CHEN; LI *et al.*, 2022), relevantes também na
16 indução da angiogênese (ALFRANCA; LOPEZ-OLIVA; GENIS; LOPEZ-MADERUELO *et al.*,
17 2008) e crescimento tumoral (SOUNNI; DEHNE; VAN KEMPEN; EGEBLAD *et al.*,
18 2010). Além disso, as MT1-MMP ao clivar colágeno libera um adesivo celular intramolecular
19 chamado RGD motif (ácido arginil-glicil-aspartico) que ativa integrinas e via de sinalização
20 P13K/AKT/IKB, induzindo a manutenção e sobrevivência das células estreladas do fígado,
21 análogas aos fibroblastos, e aumentando conseqüentemente a produção de colágeno (Figura 13)
22 (BIRUKAWA; MURASE; SATO; KOSAKA *et al.*, 2014). Com isso, nosso estudo pode ser
23 relevante na pesquisa da ação das MT1-MMP em relação sua tendência pró-fibrótica e mais
24 pesquisas devem ser realizadas com o intuito de compreender a importância dessas moléculas
25 na formação e agravamento do queiloide.

26

27

1 Figura 12 – Interação entre MT1-MMP, MMP-2 e TIMP-2 nas bordas cicatriciais do queloide



2

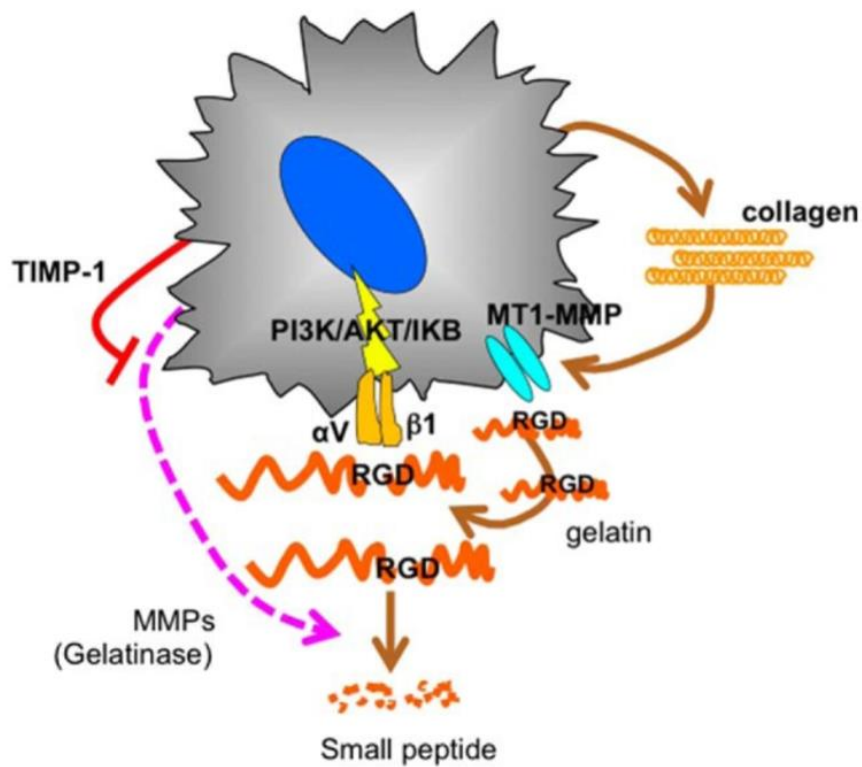
3

4

Elaborado pelo autor

5 Figura 13 – Ativação de adesivo RGD na formação de fibrose

6



7

8

Adaptado de BIRUKAWA et al., 2014

Conclusão

1 Em relação à análise da imunomarcção positiva para os inibidores de
2 metaloproteinases, observou-se que os pacientes com queloides apresentaram uma maior
3 expresso de TIMP-3 e TIMP-4 quando comparados aos controles, podendo ser uma tentativa
4 de controlar o aumento e atividade de MMPs e visando a integridade da MEC (AIROLA;
5 KARONEN; VAALAMO; LEHTI *et al.*, 1999). Concordando com nossos resultados, foi
6 demonstrado aumento significativo de TIMP-1, -2 (IMAZUMI; AKASAKA; INOMATA;
7 OKADA *et al.*, 2009) e -3 nas regies tanto centrais como nas bordas do queloides, demonstrando
8 que a inibio da degradao de colgeno pode ser encontrada em toda a cicatriz, e no apenas
9 em pontos especficos (BRAN; GOESSLER; BAFTIRI; HORMANN *et al.*, 2010). Estudos
10 cardiovasculares demonstraram que a correlao TGF- β /TIMP-3 predispoe a fibrose (ZHANG;
11 LANG; GUO; PEI *et al.*, 2018), e nos queloides, o TGF- β e responsvel pela ativao de TIMP-
12 3 atravs de trs vias de sinalizao TAK1/MKK3/6/p38, Ras/Mek1/ERK1/2 e Smad3/4,
13 aumentando ainda mais a inibio na degradao de colgeno e conseqentemente a formao
14 de fibrose (NIWA; KANNO; SHU; SEISHIMA, 2020). No foram encontrados estudos
15 relacionando TIMP-4 com queloides, mas em doenas semelhantes ao ambiente de queloides,
16 como de fibrose pulmonar (SELMAN; RUIZ; CABRERA; SEGURA *et al.*, 2000) e inflamao
17 articular (CAPSONI; ONGARI; LONATI; ACCETTA *et al.*, 2015). Foi encontrado um
18 aumento de TIMP-4 em amostras endometriais de mulheres com hipertenso gestacional
19 (ZHANG; MA; YANG; LONG *et al.*, 2015) e com suplementao de progesterona para
20 fertilidade (PILKA; OBORNA; LICHNOVSKY; HAVELKA *et al.*, 2006) e estudos revelam
21 uma correlao importante entre hipertenso (ARIMA; HUANG; ROSNER; AKAISHI *et al.*,
22 2015), gravidez (IBRAHIM; SHAHARAN; DHEANSA, 2020) e hormnios (YEUNG;
23 KAHN; LY; TANGPRICHA, 2019) na formao dos queloides e com isso podem estar
24 modulando a expresso de TIMP-4 e conseqentemente aumentando a atuao desses
25 inibidores frente as metaloproteinases.

26 Apesar de todos os estudos na rea da formao de queloides, sua patogeneese ainda no
27 est totalmente elucidada, por isso, descobertas pontuais esto aos poucos explicando os fatores
28 envolvendo os sinais, sintomas e progresses desse tipo cicatricial.

29

1 8. CONCLUSÃO

2

3 Podemos concluir, no presente estudo, que pacientes com quelóide apresentam um
4 aumento significativo de mastócito e de imunomarcção para triptase, HIF-1 α , MT1-MMP,
5 TIMP-3 e TIMP-4 comparados a cicatrizes normais, sugerindo a estreita relação desses fatores
6 com a progressão do quelóide, presença de sinais e sintomas como rubor e prurido e a formação
7 intensa de fibrose.

9. Referências Bibliográficas

Uncategorized References

ABDAYEM, R.; HAFTEK, M. [The epidermal barrier]. **Ann Dermatol Venereol**, 145, n. 4, p. 293-301, Apr 2018.

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

AGARWAL, S.; KRISHNAMURTHY, K. Histology, Skin. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2022.

AIROLA, K.; KARONEN, T.; VAALAMO, M.; LEHTI, K. *et al.* Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. **Br J Cancer**, 80, n. 5-6, p. 733-743, May 1999.

AKAMA, T.; CHUN, T. H. Transcription factor 21 (TCF21) promotes proinflammatory interleukin 6 expression and extracellular matrix remodeling in visceral adipose stem cells. **J Biol Chem**, 293, n. 17, p. 6603-6610, Apr 27 2018.

AKERS, I. A.; PARSONS, M.; HILL, M. R.; HOLLENBERG, M. D. *et al.* Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 278, n. 1, p. L193-201, Jan 2000.

ALANAZI, S.; GRUJIC, M.; LAMPINEN, M.; ROLLMAN, O. *et al.* Mast Cell beta-Tryptase Is Enzymatically Stabilized by DNA. **Int J Mol Sci**, 21, n. 14, Jul 17 2020.

ALFRANCA, A.; LOPEZ-OLIVA, J. M.; GENIS, L.; LOPEZ-MADERUELO, D. *et al.* PGE2 induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. **Blood**, 112, n. 4, p. 1120-1128, Aug 15 2008.

ALJADA, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P.; HOFMEYER, D. *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**, 86, n. 12, p. 5988-5991, Dec 2001.

ALLEN, D. L.; TEITELBAUM, D. H.; KURACHI, K. Growth factor stimulation of matrix metalloproteinase expression and myoblast migration and invasion in vitro. **Am J Physiol Cell Physiol**, 284, n. 4, p. C805-815, Apr 2003.

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

Referências Bibliográficas

- 1 AMMENDOLA, M.; ZUCCALA, V.; PATRUNO, R.; RUSSO, E. *et al.* Tryptase-positive mast cells and
2 angiogenesis in keloids: a new possible post-surgical target for prevention. **Updates Surg**, 65, n. 1, p.
3 53-57, Mar 2013.
- 4
- 5 AOKI, M.; MIYAKE, K.; OGAWA, R.; DOHI, T. *et al.* siRNA knockdown of tissue inhibitor of
6 metalloproteinase-1 in keloid fibroblasts leads to degradation of collagen type I. **J Invest Dermatol**,
7 134, n. 3, p. 818-826, Mar 2014.
- 8
- 9 ARBA, F.; PICCARDI, B.; PALUMBO, V.; GIUSTI, B. *et al.* Small Vessel Disease Is Associated with Tissue
10 Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-4 After Ischaemic Stroke. **Transl Stroke Res**, 10, n. 1, p. 44-51,
11 Feb 2019.
- 12
- 13 ARBI, S.; EKSTEEN, E. C.; OBERHOLZER, H. M.; TAUTE, H. *et al.* Premature collagen fibril formation,
14 fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids.
15 **Ultrastruct Pathol**, 39, n. 2, p. 95-103, Apr 2015.
- 16
- 17 ARDA, O.; GOKSUGUR, N.; TUZUN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clin**
18 **Dermatol**, 32, n. 1, p. 3-13, Jan-Feb 2014.
- 19
- 20 ARIMA, J.; HUANG, C.; ROSNER, B.; AKAISHI, S. *et al.* Hypertension: a systemic key to understanding
21 local keloid severity. **Wound Repair Regen**, 23, n. 2, p. 213-221, Mar-Apr 2015.
- 22
- 23 BANSAL, D.; KAMBOJ, M.; NARWAL, A.; DEVI, A. *et al.* Interplay of collagen and mast cells in periapical
24 granulomas and periapical cysts: a comparative polarizing microscopic and immunohistochemical
25 study. **Restor Dent Endod**, 47, n. 1, p. e12, Feb 2022.
- 26
- 27 BASHIR, M. M.; AHMAD, H.; YOUSAF, N.; KHAN, F. A. Comparison of single intra operative versus an
28 intra operative and two post operative injections of the triamcinolone after wedge excision of keloids
29 of helix. **J Pak Med Assoc**, 65, n. 7, p. 737-741, Jul 2015.
- 30
- 31 BERMAN, B.; GARIKAPARTHI, S.; SMITH, E.; NEWBURGER, J. A novel hydrogel scaffold for the
32 prevention or reduction of the recurrence of keloid scars postsurgical excision. **J Am Acad Dermatol**,
33 69, n. 5, p. 828-830, Nov 2013.
- 34
- 35 BIRKEDAL-HANSEN, B.; PAVELIC, Z. P.; GLUCKMAN, J. L.; STAMBROOK, P. *et al.* MMP and TIMP gene
36 expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues. **Oral Dis**, 6, n. 6, p. 376-
37 382, Nov 2000.
- 38
- 39 BIRUKAWA, N. K.; MURASE, K.; SATO, Y.; KOSAKA, A. *et al.* Activated hepatic stellate cells are
40 dependent on self-collagen, cleaved by membrane type 1 matrix metalloproteinase for their growth. **J**
41 **Biol Chem**, 289, n. 29, p. 20209-20221, Jul 18 2014.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 BOWDEN, L. G.; BYRNE, H. M.; MAINI, P. K.; MOULTON, D. E. A morphoelastic model for dermal wound
2 closure. **Biomech Model Mechanobiol**, 15, n. 3, p. 663-681, Jun 2016.
- 3
4 BRAN, G. M.; GOESSLER, U. R.; BAFTIRI, A.; HORMANN, K. *et al.* Effect of transforming growth factor-
5 beta1 antisense oligonucleotides on matrix metalloproteinases and their inhibitors in keloid
6 fibroblasts. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 143, n. 1, p. 66-71, Jul 2010.
- 7
8 BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with
9 structural and functional diversity. **Biochim Biophys Acta**, 1803, n. 1, p. 55-71, Jan 2010.
- 10
11 BRUNING, U.; FITZPATRICK, S. F.; FRANK, T.; BIRTWISTLE, M. *et al.* NFkappaB and HIF display synergistic
12 behaviour during hypoxic inflammation. **Cell Mol Life Sci**, 69, n. 8, p. 1319-1329, Apr 2012.
- 13
14 BUNDGAARD, L.; SORENSEN, M. A.; NILSSON, T.; SALLING, E. *et al.* Evaluation of Systemic and Local
15 Inflammatory Parameters and Manifestations of Pain in an Equine Experimental Wound Model. **J**
16 **Equine Vet Sci**, 68, p. 81-87, Sep 2018.
- 17
18 CAMACHO-MARTINEZ, F. M.; REY, E. R.; SERRANO, F. C.; WAGNER, A. Results of a combination of
19 bleomycin and triamcinolone acetonide in the treatment of keloids and hypertrophic scars. **An Bras**
20 **Dermatol**, 88, n. 3, p. 387-394, May-Jun 2013.
- 21
22 CAPSONI, F.; ONGARI, A. M.; LONATI, C.; ACCETTA, R. *et al.* alpha-Melanocyte-stimulating-hormone
23 (alpha-MSH) modulates human chondrocyte activation induced by proinflammatory cytokines. **BMC**
24 **Musculoskelet Disord**, 16, p. 154, Jun 21 2015.
- 25
26 CARROLL, L. A.; HANASONO, M. M.; MIKULEC, A. A.; KITA, M. *et al.* Triamcinolone stimulates bFGF
27 production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. **Dermatol Surg**, 28, n. 8,
28 p. 704-709, Aug 2002.
- 29
30 CARVALHAES, S. M.; PETROIANU, A.; FERREIRA, M. A.; DE BARROS, V. M. *et al.* Assesment of the
31 treatment of earlobe keloids with triamcinolone injections, surgical resection, and local pressure. **Rev**
32 **Col Bras Cir**, 42, n. 1, p. 9-13, Jan-Feb 2015.
- 33
34 CASSANTA, L. T. C.; RODRIGUES, V.; VIOLATTI-FILHO, J. R.; TEIXEIRA NETO, B. A. *et al.* Modulation of
35 Matrix Metalloproteinase 14, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3, Tissue Inhibitor of
36 Metalloproteinase 4, and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Development of Periapical Lesions. **J**
37 **Endod**, 43, n. 7, p. 1122-1129, Jul 2017.
- 38
39 CAVALIE, M.; SILLARD, L.; MONTAUDIE, H.; BAHADORAN, P. *et al.* Treatment of keloids with laser-
40 assisted topical steroid delivery: a retrospective study of 23 cases. **Dermatol Ther**, 28, n. 2, p. 74-78,
41 Mar-Apr 2015.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 CELESTE, C. J.; DESCHENE, K.; RILEY, C. B.; THEORET, C. L. Regional differences in wound oxygenation
2 during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. **Wound Repair**
3 **Regen**, 19, n. 1, p. 89-97, Jan-Feb 2011.
- 4
- 5 CHEN, H.; XU, Y.; YANG, G.; ZHANG, Q. *et al.* Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast
6 proliferation and collagen synthesis by activating TGF-beta1/Smads signaling pathway. **Exp Ther Med**,
7 14, n. 5, p. 4438-4442, Nov 2017.
- 8
- 9 CHEN, Y.; JIN, Q.; FU, X.; QIAO, J. *et al.* Connection between T regulatory cell enrichment and collagen
10 deposition in keloid. **Exp Cell Res**, 383, n. 2, p. 111549, Oct 15 2019.
- 11
- 12 CHONG, Y.; PARK, T. H.; SEO, S.; CHANG, C. H. Histomorphometric analysis of collagen architecture of
13 auricular keloids in an Asian population. **Dermatol Surg**, 41, n. 3, p. 415-422, Mar 2015.
- 14
- 15 DA CUNHA COLOMBO TIVERON, L. R.; DA SILVA, I. R.; DA SILVA, M. V.; PEIXOTO, A. B. *et al.* High in situ
16 mRNA levels of IL-22, TGF-beta, and ARG-1 in keloid scars. **Immunobiology**, 223, n. 12, p. 812-817, Dec
17 2018.
- 18
- 19 DA SILVA, I. R.; TIVERON, L.; DA SILVA, M. V.; PEIXOTO, A. B. *et al.* In Situ Cytokine Expression and
20 Morphometric Evaluation of Total Collagen and Collagens Type I and Type III in Keloid Scars. **Mediators**
21 **Inflamm**, 2017, p. 6573802, 2017.
- 22
- 23 DANIELSEN, P. L.; REA, S. M.; WOOD, F. M.; FEAR, M. W. *et al.* Verapamil is Less Effective than
24 Triamcinolone for Prevention of Keloid Scar Recurrence After Excision in a Randomized Controlled
25 Trial. **Acta Derm Venereol**, 96, n. 6, p. 774-778, Aug 23 2016.
- 26
- 27 DI GREGOLI, K.; MOHAMAD ANUAR, N. N.; BIANCO, R.; WHITE, S. J. *et al.* MicroRNA-181b Controls
28 Atherosclerosis and Aneurysms Through Regulation of TIMP-3 and Elastin. **Circ Res**, 120, n. 1, p. 49-65,
29 Jan 6 2017.
- 30
- 31 DOHI, T.; MIYAKE, K.; AOKI, M.; OGAWA, R. *et al.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 Suppresses
32 Collagen Synthesis in Cultured Keloid Fibroblasts. **Plast Reconstr Surg Glob Open**, 3, n. 9, p. e520, Sep
33 2015.
- 34
- 35 DONG, X.; ZHANG, C.; MA, S.; WEN, H. Mast cell chymase in keloid induces profibrotic response via
36 transforming growth factor-beta1/Smad activation in keloid fibroblasts. **Int J Clin Exp Pathol**, 7, n. 7,
37 p. 3596-3607, 2014.
- 38
- 39 DRYDEN, S. V.; SHOEMAKER, W. G.; KIM, J. H. Wound management and nutrition for optimal wound
40 healing. **Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, 21, n. 1, p. 37-47, Mar 2013.
- 41
- 42 DUERR, S.; WENDLER, O.; AIGNER, T.; KAROSI, S. *et al.* Metalloproteinases in juvenile angiofibroma--a
43 collagen rich tumor. **Hum Pathol**, 39, n. 2, p. 259-268, Feb 2008.

Referências Bibliográficas

- 1
2 ESCALONA, R. M.; KANNOURAKIS, G.; FINDLAY, J. K.; AHMED, N. Expression of TIMPs and MMPs in
3 Ovarian Tumors, Ascites, Ascites-Derived Cells, and Cancer Cell Lines: Characteristic Modulatory
4 Response Before and After Chemotherapy Treatment. **Front Oncol**, 11, p. 796588, 2021.
- 5
6 FANIKU, C.; WRIGHT, C. S.; MARTIN, P. E. Connexins and pannexins in the integumentary system: the
7 skin and appendages. **Cell Mol Life Sci**, 72, n. 15, p. 2937-2947, Aug 2015.
- 8
9 FANOUS, A.; BEZDJIAN, A.; CAGLAR, D.; MLYNAREK, A. *et al.* Treatment of Keloid Scars with Botulinum
10 Toxin Type A versus Triamcinolone in an Athymic Nude Mouse Model. **Plast Reconstr Surg**, 143, n. 3,
11 p. 760-767, Mar 2019.
- 12
13 FLORES, C.; MA, S. F.; PINO-YANES, M.; WADE, M. S. *et al.* African ancestry is associated with asthma
14 risk in African Americans. **PLoS One**, 7, n. 1, p. e26807, 2012.
- 15
16 FOLEY, T. T.; EHRLICH, H. P. Through gap junction communications, co-cultured mast cells and
17 fibroblasts generate fibroblast activities allied with hypertrophic scarring. **Plast Reconstr Surg**, 131, n.
18 5, p. 1036-1044, May 2013.
- 19
20 FOLEY, T. T.; EHRLICH, H. P. Mast cells prevent dexamethasone-induced cell death of cultured
21 fibroblasts: relationship to gap junctional intercellular communications. **Plast Reconstr Surg**, 133, n. 5,
22 p. 638e-644e, May 2014.
- 23
24 FOLEY, T. T.; SAGGERS, G. C.; MOYER, K. E.; EHRLICH, H. P. Rat mast cells enhance fibroblast
25 proliferation and fibroblast-populated collagen lattice contraction through gap junctional intercellular
26 communications. **Plast Reconstr Surg**, 127, n. 4, p. 1478-1486, Apr 2011.
- 27
28 FRUNGIERI, M. B.; WEIDINGER, S.; MEINEKE, V.; KOHN, F. M. *et al.* Proliferative action of mast-cell
29 tryptase is mediated by PAR2, COX2, prostaglandins, and PPARgamma : Possible relevance to human
30 fibrotic disorders. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 23, p. 15072-15077, Nov 12 2002.
- 31
32 FU, Z. Y.; TAO, F. [Expression levels of MMP-14, ING4 and HIF-1alpha in 60 patients with oral squamous
33 cell carcinoma and their clinical significance]. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, 29, n. 6, p. 642-646, Dec
34 2020.
- 35
36 GALLANT-BEHM, C. L.; HILDEBRAND, K. A.; HART, D. A. The mast cell stabilizer ketotifen prevents
37 development of excessive skin wound contraction and fibrosis in red Duroc pigs. **Wound Repair Regen**,
38 16, n. 2, p. 226-233, Mar-Apr 2008.
- 39
40 GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKHOLTZ, D.; GILLERY, P. *et al.* Human mast cells stimulate fibroblast
41 proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clin**
42 **Exp Allergy**, 32, n. 2, p. 237-246, Feb 2002.
- 43

Referências Bibliográficas

- 1 GIVVIMANI, S.; TYAGI, N.; SEN, U.; MISHRA, P. K. *et al.* MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3
2 in transition from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure. **Arch**
3 **Physiol Biochem**, 116, n. 2, p. 63-72, May 2010.
- 4
- 5 GU, Y.; ZHANG, S.; CHEN, X.; LI, Y. *et al.* LongShengZhi alleviated cardiac remodeling via upregulation
6 microRNA-150-5p with matrix metalloproteinase 14 as the target. **J Ethnopharmacol**, 291, p. 115156,
7 Jun 12 2022.
- 8
- 9 HAWASH, A. A.; INGRASCI, G.; NOURI, K.; YOSIPOVITCH, G. Pruritus in Keloid Scars: Mechanisms and
10 Treatments. **Acta Derm Venereol**, 101, n. 10, p. adv00582, Oct 28 2021.
- 11
- 12 HIETANEN, K. E.; JARVINEN, T. A.; HUHTALA, H.; TOLONEN, T. T. *et al.* Treatment of keloid scars with
13 intralesional triamcinolone and 5-fluorouracil injections - a randomized controlled trial. **J Plast**
14 **Reconstr Aesthet Surg**, 72, n. 1, p. 4-11, Jan 2019.
- 15
- 16 HUNASGI, S.; KONERU, A.; VANISHREE, M.; SHAMALA, R. Keloid: A case report and review of
17 pathophysiology and differences between keloid and hypertrophic scars. **J Oral Maxillofac Pathol**, 17,
18 n. 1, p. 116-120, Jan 2013.
- 19
- 20 IBRAHIM, N. E.; SHAHARAN, S.; DHEANSA, B. Adverse Effects of Pregnancy on Keloids and Hypertrophic
21 Scars. **Cureus**, 12, n. 12, p. e12154, Dec 18 2020.
- 22
- 23 IMAIZUMI, R.; AKASAKA, Y.; INOMATA, N.; OKADA, E. *et al.* Promoted activation of matrix
24 metalloproteinase (MMP)-2 in keloid fibroblasts and increased expression of MMP-2 in collagen
25 bundle regions: implications for mechanisms of keloid progression. **Histopathology**, 54, n. 6, p. 722-
26 730, May 2009.
- 27
- 28 JEON, Y. R.; AHN, H. M.; CHOI, I. K.; YUN, C. O. *et al.* Hepatocyte growth factor-expressing adenovirus
29 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression in keloid fibroblasts. **Int J Dermatol**, 55, n. 3, p.
30 356-361, Mar 2016.
- 31
- 32 JOHNSON, J. L.; JENKINS, N. P.; HUANG, W. C.; DI GREGOLI, K. *et al.* Relationship of MMP-14 and TIMP-
33 3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. **Mediators**
34 **Inflamm**, 2014, p. 276457, 2014.
- 35
- 36 JONES, M. E.; MCLANE, J.; ADENEGAN, R.; LEE, J. *et al.* Advancing Keloid Treatment: A Novel
37 Multimodal Approach to Ear Keloids. **Dermatol Surg**, 43, n. 9, p. 1164-1169, Sep 2017.
- 38
- 39 JURZAK, M.; ADAMCZYK, K. Influence of genistein on c-Jun, c-Fos and Fos-B of AP-1 subunits expression
40 in skin keratinocytes, fibroblasts and keloid fibroblasts cultured in vitro. **Acta Pol Pharm**, 70, n. 2, p.
41 205-213, Mar-Apr 2013.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 JURZAK, M.; ADAMCZYK, K.; ANTONCZAK, P.; GARNCARCZYK, A. *et al.* Evaluation of genistein ability to
2 modulate CTGF mRNA/protein expression, genes expression of TGFbeta isoforms and expression of
3 selected genes regulating cell cycle in keloid fibroblasts in vitro. **Acta Pol Pharm**, 71, n. 6, p. 972-986,
4 Nov-Dec 2014.
- 5
- 6 KANG, Y.; ROH, M. R.; RAJADURAI, S.; RAJADURAI, A. *et al.* Hypoxia and HIF-1alpha Regulate Collagen
7 Production in Keloids. **J Invest Dermatol**, 140, n. 11, p. 2157-2165, Nov 2020.
- 8
- 9 KHATTAB, F. M.; BESSAR, H.; KHATER, E. M. Keloid therapy: A neoteric comparative study. **J Cosmet**
10 **Dermatol**, 21, n. 9, p. 3962-3969, Sep 2022.
- 11
- 12 KIM, J.; KIM, B.; KIM, S. M.; YANG, C. E. *et al.* Hypoxia-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition
13 Mediates Fibroblast Abnormalities via ERK Activation in Cutaneous Wound Healing. **Int J Mol Sci**, 20,
14 n. 10, May 24 2019.
- 15
- 16 KIM, J. Y.; DAO, H. Physiology, Integument. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2022.
- 17
- 18 KIM, M.; MIRSKY, N.; SPIELMAN, A.; MATHEW, P. *et al.* Evaluating Symptomatic and Psychosocial Well-
19 being After Keloid Treatment With SCAR-Q. **Aesthet Surg J**, 42, n. 6, p. NP416-NP422, May 18 2022.
- 20
- 21 KIMATA, M.; ISHIZAKI, M.; TANAKA, H.; NAGAI, H. *et al.* Production of matrix metalloproteinases in
22 human cultured mast cells: involvement of protein kinase C-mitogen activated protein kinase kinase-
23 extracellular signal-regulated kinase pathway. **Allergol Int**, 55, n. 1, p. 67-76, Mar 2006.
- 24
- 25 KRANTZ, S. B.; SHIELDS, M. A.; DANGI-GARIMELLA, S.; CHEON, E. C. *et al.* MT1-MMP cooperates with
26 Kras(G12D) to promote pancreatic fibrosis through increased TGF-beta signaling. **Mol Cancer Res**, 9,
27 n. 10, p. 1294-1304, Oct 2011.
- 28
- 29 LANE, J. E.; WALLER, J. L.; DAVIS, L. S. Relationship between age of ear piercing and keloid formation.
30 **Pediatrics**, 115, n. 5, p. 1312-1314, May 2005.
- 31
- 32 LEE, J. Y.; YANG, C. C.; CHAO, S. C.; WONG, T. W. Histopathological differential diagnosis of keloid and
33 hypertrophic scar. **Am J Dermatopathol**, 26, n. 5, p. 379-384, Oct 2004.
- 34
- 35 LEE, S. Y.; LEE, A. R.; CHOI, J. W.; LEE, C. R. *et al.* IL-17 Induces Autophagy Dysfunction to Promote
36 Inflammatory Cell Death and Fibrosis in Keloid Fibroblasts via the STAT3 and HIF-1alpha Dependent
37 Signaling Pathways. **Front Immunol**, 13, p. 888719, 2022.
- 38
- 39 LEE, W. J.; AHN, H. M.; ROH, H.; NA, Y. *et al.* Decorin-expressing adenovirus decreases collagen
40 synthesis and upregulates MMP expression in keloid fibroblasts and keloid spheroids. **Exp Dermatol**,
41 24, n. 8, p. 591-597, Aug 2015.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 LEE, Y. I.; KIM, S. M.; KIM, J.; KIM, J. *et al.* Tissue-remodelling M2 Macrophages Recruits Matrix Metallo-
 2 proteinase-9 for Cryotherapy-induced Fibrotic Resolution during Keloid Treatment. **Acta Derm**
 3 **Venereol**, 100, n. 17, p. adv00306, Oct 28 2020.
- 4
- 5 LEE, Y. S.; HSU, T.; CHIU, W. C.; SARKOZY, H. *et al.* Keloid-derived, plasma/fibrin-based skin equivalents
 6 generate de novo dermal and epidermal pathology of keloid fibrosis in a mouse model. **Wound Repair**
 7 **Regen**, 24, n. 2, p. 302-316, Mar 2016.
- 8
- 9 LEI, R.; LI, J.; LIU, F.; LI, W. *et al.* HIF-1alpha promotes the keloid development through the activation
 10 of TGF-beta/Smad and TLR4/MyD88/NF-kappaB pathways. **Cell Cycle**, 18, n. 23, p. 3239-3250, Dec
 11 2019.
- 12
- 13 LIU, Y.; LI, Y.; LI, N.; TENG, W. *et al.* TGF-beta1 promotes scar fibroblasts proliferation and
 14 transdifferentiation via up-regulating MicroRNA-21. **Sci Rep**, 6, p. 32231, 2016.
- 15
- 16 LIU, Y.; MUELLER, B. M. Protease-activated receptor-2 regulates vascular endothelial growth factor
 17 expression in MDA-MB-231 cells via MAPK pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, 344, n. 4, p.
 18 1263-1270, Jun 16 2006.
- 19
- 20 LOPEZ-OJEDA, W.; PANDEY, A.; ALHAJJ, M.; OAKLEY, A. M. Anatomy, Skin (Integument). *In*: **StatPearls**.
 21 Treasure Island (FL), 2022.
- 22
- 23 MA, X.; CHEN, J.; XU, B.; LONG, X. *et al.* Keloid-derived keratinocytes acquire a fibroblast-like
 24 appearance and an enhanced invasive capacity in a hypoxic microenvironment in vitro. **Int J Mol Med**,
 25 35, n. 5, p. 1246-1256, May 2015.
- 26
- 27 MAMDOUH, M.; OMAR, G. A.; HAFIZ, H. S. A.; ALI, S. M. Role of vitamin D in treatment of keloid. **J**
 28 **Cosmet Dermatol**, 21, n. 1, p. 331-336, Jan 2022.
- 29
- 30 MARTTALA, J.; ANDREWS, J. P.; ROSENBLOOM, J.; UITTO, J. Keloids: Animal models and pathologic
 31 equivalents to study tissue fibrosis. **Matrix Biol**, 51, p. 47-54, Apr 2016.
- 32
- 33 MEDHI, B.; SEWAL, R. K.; KAMAN, L.; KADHE, G. *et al.* Efficacy and safety of an advanced formula
 34 silicone gel for prevention of post-operative scars. **Dermatol Ther (Heidelb)**, 3, n. 2, p. 157-167, Dec
 35 2013.
- 36
- 37 MOON, T. C.; ST LAURENT, C. D.; MORRIS, K. E.; MARCET, C. *et al.* Advances in mast cell biology: new
 38 understanding of heterogeneity and function. **Mucosal Immunol**, 3, n. 2, p. 111-128, Mar 2010.
- 39
- 40 NAKAJIMA, Y.; ARAMAKI, N.; TAKEUCHI, N.; YAMANISHI, A. *et al.* Mast Cells Are Activated in the Giant
 41 Earlobe Keloids: A Case Series. **Int J Mol Sci**, 23, n. 18, Sep 8 2022.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 NIWA, H.; KANNO, Y.; SHU, E.; SEISHIMA, M. Decrease in matrix metalloproteinase3 activity in systemic
2 sclerosis fibroblasts causes alpha2antiplasmin and extracellular matrix deposition, and contributes to
3 fibrosis development. **Mol Med Rep**, 22, n. 4, p. 3001-3007, Oct 2020.
- 4
- 5 OHUCHI, E.; IMAI, K.; FUJII, Y.; SATO, H. *et al.* Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests
6 interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. **J Biol Chem**, 272, n. 4, p. 2446-
7 2451, Jan 24 1997.
- 8
- 9 OGAWA, R. The Most Current Algorithms for the Treatment and Prevention of Hypertrophic Scars and
10 Keloids: A 2020 Update of the Algorithms Published 10 Years Ago. **Plast Reconstr Surg**, 149, n. 1, p.
11 79e-94e, Jan 1 2022.
- 12
- 13 OMO-DARE, P. Yoruban contributions to the literature on keloids. **J Natl Med Assoc**, 65, n. 5, p. 367-
14 372 passim, Sep 1973.
- 15
- 16 OZGOK KANGAL, M. K.; REGAN, J. P. Wound Healing. *In*: **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2022.
- 17
- 18 PARK, T. H.; CHANG, C. H. Location of Keloids and Its Treatment Modality May Influence the Keloid
19 Recurrence in Children. **J Craniofac Surg**, 26, n. 4, p. 1355-1357, Jun 2015.
- 20
- 21 PILKA, R.; OBORNA, I.; LICHNOVSKY, V.; HAVELKA, P. *et al.* Endometrial expression of the estrogen-
22 sensitive genes MMP-26 and TIMP-4 is altered by a substitution protocol without down-regulation in
23 IVF patients. **Hum Reprod**, 21, n. 12, p. 3146-3156, Dec 2006.
- 24
- 25 REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur Surg Res**, 49, n. 1, p. 35-43, 2012.
- 26
- 27 SAFONOV, I. Normotrophic Scars. *In*: **Atlas of Scar Treatment and Correction**. Berlin, Heidelberg:
28 Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 161-188.
- 29
- 30 SAKATA, K.; SHIGEMASA, K.; NAGAI, N.; OHAMA, K. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2,
31 MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary.
32 **Int J Oncol**, 17, n. 4, p. 673-681, Oct 2000.
- 33
- 34 SALIMI SARTAKHTI, J.; MANSHAEI, M. H.; SADEGHI, M. MMP-TIMP interactions in cancer invasion: An
35 evolutionary game-theoretical framework. **J Theor Biol**, 412, p. 17-26, Jan 7 2017.
- 36
- 37 SELMAN, M.; RUIZ, V.; CABRERA, S.; SEGURA, L. *et al.* TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary
38 fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, 279,
39 n. 3, p. L562-574, Sep 2000.
- 40
- 41 SERRA, M. B.; BARROSO, W. A.; DA SILVA, N. N.; SILVA, S. D. N. *et al.* From Inflammation to Current and
42 Alternative Therapies Involved in Wound Healing. **Int J Inflam**, 2017, p. 3406215, 2017.
- 43

Referências Bibliográficas

- 1 SHAKER, S. A.; AYUOB, N. N.; HAJRAH, N. H. Cell talk: a phenomenon observed in the keloid scar by
2 immunohistochemical study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 19, n. 2, p. 153-159, Mar 2011.
- 3
4 SHAMSI MEYMANDI, S.; REZAZADEH, A.; EKHLASI, A. Studying intense pulsed light method along with
5 corticosteroid injection in treating keloid scars. **Iran Red Crescent Med J**, 16, n. 2, p. e12464, Feb 2014.
- 6
7 SHAN, M.; LIU, H.; HAO, Y.; MENG, T. *et al.* IL-4 and CCR7 play an important role in the development of
8 keloids in patients with a family history. **Am J Transl Res**, 14, n. 5, p. 3381-3394, 2022.
- 9
10 SHRESTHA, M.; ANDO, T.; CHEA, C.; SAKAMOTO, S. *et al.* The transition of tissue inhibitor of
11 metalloproteinases from -4 to -1 induces aggressive behavior and poor patient survival in
12 dedifferentiated liposarcoma via YAP/TAZ activation. **Carcinogenesis**, 40, n. 10, p. 1288-1297, Oct 16
13 2019.
- 14
15 SIMON, F.; BERGERON, D.; LAROCHELLE, S.; LOPEZ-VALLE, C. A. *et al.* Enhanced secretion of TIMP-1 by
16 human hypertrophic scar keratinocytes could contribute to fibrosis. **Burns**, 38, n. 3, p. 421-427, May
17 2012.
- 18
19 SMITH, E. H.; CHAN, M. P. Inflammatory Dermatopathology for General Surgical Pathologists. **Clin Lab**
20 **Med**, 37, n. 3, p. 673-696, Sep 2017.
- 21
22 SOUNNI, N. E.; DEHNE, K.; VAN KEMPEN, L.; EGEBLAD, M. *et al.* Stromal regulation of vessel stability
23 by MMP14 and TGFbeta. **Dis Model Mech**, 3, n. 5-6, p. 317-332, May-Jun 2010.
- 24
25 SPIEKMAN, M.; PRZYBYT, E.; PLANTINGA, J. A.; GIBBS, S. *et al.* Adipose tissue-derived stromal cells
26 inhibit TGF-beta1-induced differentiation of human dermal fibroblasts and keloid scar-derived
27 fibroblasts in a paracrine fashion. **Plast Reconstr Surg**, 134, n. 4, p. 699-712, Oct 2014.
- 28
29 TAN, H.; CHEN, Z.; CHEN, F.; XU, W. *et al.* CKAP4 participates in tryptase-induced phenotypic conversion
30 in atrial fibroblasts through PAR2/p38/JNK pathway. **Am J Transl Res**, 13, n. 4, p. 2270-2282, 2021.
- 31
32 TANAYDIN, V.; BEUGELS, J.; PIATKOWSKI, A.; COLLA, C. *et al.* Efficacy of custom-made pressure clips
33 for ear keloid treatment after surgical excision. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, 69, n. 1, p. 115-121, Jan
34 2016.
- 35
36 UCHIDA, G.; YOSHIMURA, K.; KITANO, Y.; OKAZAKI, M. *et al.* Tretinoin reverses upregulation of matrix
37 metalloproteinase-13 in human keloid-derived fibroblasts. **Exp Dermatol**, 12 Suppl 2, p. 35-42, 2003.
- 38
39 UD-DIN, S.; THOMAS, G.; MORRIS, J.; BAYAT, A. Photodynamic therapy: an innovative approach to the
40 treatment of keloid disease evaluated using subjective and objective non-invasive tools. **Arch**
41 **Dermatol Res**, 305, n. 3, p. 205-214, Apr 2013.
- 42

Referências Bibliográficas

- 1 VELEZ EDWARDS, D. R.; TSOSIE, K. S.; WILLIAMS, S. M.; EDWARDS, T. L. *et al.* Admixture mapping
 2 identifies a locus at 15q21.2-22.3 associated with keloid formation in African Americans. **Hum Genet**,
 3 133, n. 12, p. 1513-1523, Dec 2014.
- 4
- 5 VUONG, T. T.; RONNING, S. B.; AHMED, T. A. E.; BRATHAGEN, K. *et al.* Processed eggshell membrane
 6 powder regulates cellular functions and increase MMP-activity important in early wound healing
 7 processes. **PLoS One**, 13, n. 8, p. e0201975, 2018.
- 8
- 9 WALLACE, H. A.; BASEHORE, B. M.; ZITO, P. M. Wound Healing Phases. *In: StatPearls*. Treasure Island
 10 (FL), 2022.
- 11
- 12 WANG, H.; LUO, S. Establishment of an animal model for human keloid scars using tissue engineering
 13 method. **J Burn Care Res**, 34, n. 4, p. 439-446, Jul-Aug 2013.
- 14
- 15 WANG, S.; UMRATH, F.; CEN, W.; SALGADO, A. J. *et al.* Pre-Conditioning with IFN-gamma and Hypoxia
 16 Enhances the Angiogenic Potential of iPSC-Derived MSC Secretome. **Cells**, 11, n. 6, Mar 14 2022.
- 17
- 18 WILLIAMS, M. A. **Autoradiography and immunocytochemistry. Quantitative methods in biology.**
 19 North-Holland, 1977. v. pt. 2).
- 20
- 21 WILSON, A. M. Eradication of keloids: Surgical excision followed by a single injection of intralesional 5-
 22 fluorouracil and botulinum toxin. **Can J Plast Surg**, 21, n. 2, p. 87-91, Summer 2013.
- 23
- 24 XIAO, J.; ADDABBO, R. M.; LAUER, J. L.; FIELDS, G. B. *et al.* Local conformation and dynamics of
 25 isoleucine in the collagenase cleavage site provide a recognition signal for matrix metalloproteinases.
 26 **J Biol Chem**, 285, n. 44, p. 34181-34190, Oct 29 2010.
- 27
- 28 XIE, J.; BIAN, H.; QI, S.; XU, Y. *et al.* Effects of basic fibroblast growth factor on the expression of
 29 extracellular matrix and matrix metalloproteinase-1 in wound healing. **Clin Exp Dermatol**, 33, n. 2, p.
 30 176-182, Mar 2008.
- 31
- 32 YANG, X.; BAO, M.; FANG, Y.; YU, X. *et al.* STAT3/HIF-1alpha signaling activation mediates peritoneal
 33 fibrosis induced by high glucose. **J Transl Med**, 19, n. 1, p. 283, Jun 30 2021.
- 34
- 35 YEUNG, H.; KAHN, B.; LY, B. C.; TANGPRICHA, V. Dermatologic Conditions in Transgender Populations.
 36 **Endocrinol Metab Clin North Am**, 48, n. 2, p. 429-440, Jun 2019.
- 37
- 38 ZHANG, C.; YANG, X.; ZHANG, Q.; GUO, Q. *et al.* STAT3 inhibitor NSC74859 radiosensitizes esophageal
 39 cancer via the downregulation of HIF-1alpha. **Tumour Biol**, 35, n. 10, p. 9793-9799, Oct 2014.
- 40
- 41 ZHANG, J.; LANG, Y.; GUO, L.; PEI, Y. *et al.* MicroRNA-323a-3p Promotes Pressure Overload-Induced
 42 Cardiac Fibrosis by Targeting TIMP3. **Cell Physiol Biochem**, 50, n. 6, p. 2176-2187, 2018.

Referências Bibliográficas

- 1
2 ZHANG, M.; LIU, S.; GUAN, E.; LIU, H. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy can ameliorate the EMT
3 phenomenon in keloid tissue. **Medicine (Baltimore)**, 97, n. 29, p. e11529, Jul 2018.
- 4
5 ZHANG, Q.; OH, C. K.; MESSADI, D. V.; DUONG, H. S. *et al.* Hypoxia-induced HIF-1 alpha accumulation
6 is augmented in a co-culture of keloid fibroblasts and human mast cells: involvement of ERK1/2 and
7 PI-3K/Akt. **Exp Cell Res**, 312, n. 2, p. 145-155, Jan 15 2006.
- 8
9 ZHANG, Y.; MA, Q.; YANG, H.; LONG, Y. *et al.* Maternal plasma TIMP-4 levels combined with clinical risk
10 factors for the early prediction of pregnancy-induced hypertension. **Arch Gynecol Obstet**, 292, n. 5, p.
11 1043-1050, Nov 2015.
- 12
13 ZHANG, Z.; NIE, F.; KANG, C.; CHEN, B. *et al.* Increased periostin expression affects the proliferation,
14 collagen synthesis, migration and invasion of keloid fibroblasts under hypoxic conditions. **Int J Mol**
15 **Med**, 34, n. 1, p. 253-261, Jul 2014.
- 16
17 ZHAO, P.; SUI, B. D.; LIU, N.; LV, Y. J. *et al.* Anti-aging pharmacology in cutaneous wound healing: effects
18 of metformin, resveratrol, and rapamycin by local application. **Aging Cell**, 16, n. 5, p. 1083-1093, Oct
19 2017.
- 20
21

10. ANEXOS**10.1 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 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:
Marty 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

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

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



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE 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. Virmondes 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.