JÚLIA TEIXEIRA NICOLOSI

**Efeito *in vitro* da celulose oxidada regenerada, colágeno e prata
na função dos fibroblastos oriundos de úlcera venosa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

JÚLIA TEIXEIRA NICOLOSI

**Efeito *in vitro* da celulose oxidada regenerada, colágeno e prata
na função dos fibroblastos oriundos de úlcera venosa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nicolosi, Júlia Teixeira
Efeito in vitro da celulose oxidada regenerada,
colágeno e prata na função dos fibroblastos oriundos
de úlcera venosa / Júlia Teixeira Nicolosi. -- São
Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Cesar Isaac.

Descritores: 1.Cicatrização de feridas 2.Úlcera
varicosa 3.Celulose oxidada 4.Metaloproteinases
5.Prata

USP/FM/DBD-321/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedico essa tese,

Ao meu esposo Daniel,

pelo amor, companheirismo, paciência, confiança e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incertezas.

Aos meus pais Walter e Vera,

que me apresentaram o valor da família, honestidade, dignidade, persistência e amor ao próximo, meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por estar ao meu lado me acolhendo, dando forças, saúde e iluminação nessa caminhada. Sempre roguei para colocasse pessoas de bom coração e sábias ao meu encontro e sempre fui atendida.

À minha família, em especial minhas irmãs Glória e Manuella, prima Fernanda Curado, tia Maripe e cunhada Eliete por me proporcionar momentos de entretenimento necessários durante essa jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr.^o Cesar Isaac, pela importante oportunidade de realizar esse trabalho ao lado de alguém que transmite sabedoria, respeito, serenidade e paciência, incentivando e apoiando a busca pelo conhecimento mesmo nas dificuldades. Exemplo de conduta e postura ao longo dessa trajetória.

À Prof.^a Dr.^a Viviane Fernandes de Carvalho, minha sempre professora e orientadora, muito obrigada pela confiança, generosidade e incentivo necessários para essa caminhada. Retidão de postura profissional e sabedoria.

À Dr.^a Breda Cullen e Fernanda Sotelo por apoiar e estimular a realização desse trabalho.

À amiga da pós-graduação e agora da vida, Silvana C. Altran, pelo companheirismo, amizade, auxílio e prazeroso convívio, sem a sua ajuda e ensinamentos na difícil tarefa de cultivo celular e técnicas laboratoriais esse trabalho não existiria.

Ao LIM 04, em especial para Edna Maria Rodrigues dos Santos, Roqueline Alves Lago, Silvana Aparecida Biagioni e Renata Oliveira da Conceição, pelo apoio precioso.

Ao LIM 17, em especial Maria Aurora Gomes da Silva e Maria de Fátima Almeida, que tanto me ajudou na realização dos ensaios, sem vocês tudo seria mais difícil.

Ao LIM 31, em especial a Dr.^a Débora Levy, Dr.^a Thatiana Melo e Beatriz Oliveira, sem a ajuda preciosa de vocês esse trabalho não seria possível.

Aos funcionários do LIM 50 pelo auxílio dispensado para realização desse estudo.

Aos meus colegas docentes, pelo apoio, atenção, conforto e conselhos em muitos momentos da minha caminhada, especialmente Sandra Rivaldo, Alessandra Bongiovani Lima Rocha, Gilmara de Farias Souza Klein, Luciane Vasconcelos Barreto de Carvalho, Carolina Nóvoa Fernandes, Neiva Alencar Salmeron, Zaide Frazão, Marcelo Marreira, Fernanda Pitanga e Marcelo Persequino.

Aos pacientes que gentilmente doaram material biológico contribuindo para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Eliane Falconi Monico Gazetto, por sempre esclarecer e ajudar nas questões burocráticas da pós-graduação.

À FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento dessa tese.

À Universidade de São Paulo, instituição me possibilitou a conclusão deste trabalho e à Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras em especial Prof. Dr.^o Rolf Gemperli por viabilizar a realização desse estudo.

Enfim, agradeço a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir...”

São Tomás de Aquino

Este trabalho foi realizado com
auxílio FAPESP processo
2014/21443-0

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos fibroblastos normais nas diferentes concentrações de ORC/colágeno nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas	38
Tabela 2 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos fibroblastos de úlcera venosa nas diferentes concentrações de ORC/colágeno nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas	40
Tabela 3 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos fibroblastos normais nas diferentes concentrações de ORC/colágeno com prata nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas	42
Tabela 4 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos fibroblastos de úlcera venosa nas diferentes concentrações de ORC/colágeno com prata nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas	44
Tabela 5- Comparação da síntese de MMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	47
Tabela 6 - Comparação da síntese de MMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	48
Tabela 7 - Comparação da síntese de MMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	48
Tabela 8 - Comparação da síntese de MMP10 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	49
Tabela 9 - Comparação da síntese de MMP13 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	49

Tabela 10 - Comparação da síntese de MMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	50
Tabela 11 - Comparação da síntese de MMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	51
Tabela 12 - Comparação da síntese de MMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	51
Tabela 13. Comparação da síntese de MMP10 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	52
Tabela 14 - Comparação da síntese de MMP13 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	52
Tabela 15 - Comparação da síntese de TIMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	53
Tabela 16 - Comparação da síntese de TIMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	54
Tabela 17 - Comparação da síntese de TIMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	54
Tabela 18 - Comparação da síntese de TIMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	55
Tabela 19 - Comparação da síntese de TIMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína).....	55
Tabela 20. Comparação da síntese de TIMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)	56

Tabela 21 - Comparação da síntese de TGFβ1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	57
Tabela 22 - Comparação da síntese de TGFβ2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	57
Tabela 23 - Comparação da síntese de TGFβ3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	58
Tabela 24 - Comparação da síntese de TGFβ1 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	58
Tabela 25 - Comparação da síntese de TGFβ2 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	59
Tabela 26 - Comparação da síntese de TGFβ3 dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10 ⁻⁷ pg/mL por pg/mL de proteína).....	59
Tabela 27 - Comparação da síntese de colágeno tipo I dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência	60
Tabela 28 - Comparação da síntese de colágeno tipo I dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência	61
Tabela 29 - Comparação da síntese de colágeno tipo III dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência	63
Tabela 30 - Comparação da síntese de colágeno tipo III dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência	64
Tabela 31 - Síntese de vimentina dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência	66

Tabela 32 - Síntese de vimentina dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência	67
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de procedimentos e ensaios realizados no estudo para obtenção de NHF e VUF	25
Figura 2 - Fluxograma de ensaios realizados no estudo	26
Figura 3 – Imagem representativa de (a) NHF (normal human fibroblasts); (b) VUF (venous ulcer fibroblasts). MOC 100x.	35
Figura 4 – Imagem representativa da fluorescência da sinalização de vimentina (a), colágeno tipo I (b) e colágeno tipo III (c) nos VUFs após 72 horas de cultivo em meio padrão (D10), 100 µm.	36
Figura 5 – Medidas de dispersão das absorbâncias dos VUFs no momento 72 horas expostos ao meio controle (D10), ORC2 e ORC3+Ag, ($p < 0,05$)	46
Figura 6 – Imagem representativa da fluorescência do colágeno tipo I dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 µm	62
Figura 7 – Imagem representativa da fluorescência de colágeno tipo III dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 µm.	65
Figura 8 – Imagem representativa da fluorescência de vimentina dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 µm.	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Prata
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , albumina bovina
Ca	Cálcio
CAAE	Certificado de apresentação para apreciação ética
CEAP	Classificação internacional descritiva da patologia venosa
CEP	Comissão de ética e pesquisa
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
D10	Solução controle constituída por: 90% de DMEM, acrescido de 10% de SBF com 1% de antibióticos e antifúngico (estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) e 1% de glutamina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ou Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DPBS	Dulbecco's tampão salina fosfato
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
g.	Giros
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas
IL	Interleucina
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of</i>

	<i>radiation</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
MEC	Matriz extracelular
mM	Milimolar
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MOC	Microscópio óptico comum
MRSA	Staphylococcus aureus resistente à metilicina
MT-MMP	Metaloproteinases tipo membrana
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NaOH	Hidróxido de sódio
NHF	<i>normal human fibroblasts</i>
NO	Óxido nítrico
ORC	<i>Oxidized regenerated cellulose</i>
PBS	Tampão fosfato-salino ou <i>phosphate buffered saline</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF	Fator plaquetário
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
ROS	Espécie reativa de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro bovino fetal
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UK	<i>United Kingdom</i> , Reino Unido
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VRE	<i>Enterococos</i> resistentes à vancomicina
VUF	<i>Venous ulcer fibroblasts</i>
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
Ag	Prata
Cm ²	Centímetro quadrado
g	Giros
M	Mol
mg/mL	Miligramma por mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
pg/mL	Picograma por mililitro
UI/mL	Unidades internacional por mililitro
v/v	Volume por volume
λ	Lambda
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	5
3 CONCEITOS GERAIS	7
4 MÉTODO.....	21
4.1 Tipo de estudo	22
4.2 Procedimentos éticos	22
4.3 Local do estudo	22
4.4 População e coleta da amostra	23
4.5 Cultivo Celular	24
4.6 Ensaios preliminares	26
4.6.1 Caracterização dos VUFs quanto à síntese de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III.....	27
4.6.2 Ensaio de tempo de duplicação celular (<i>doubling time</i>) de fibroblastos oriundo de NHF e VUF.....	28
4.6.3 Determinação da concentração de ORC/colágeno associado ou não a prata por espectrofotometria com MTT.....	28
4.7 Ensaios de interação VUFs – ORC/colágeno/Ag	30
4.7.1 Proliferação dos VUFs expostos a ORC/colágeno com e sem adição de prata.	30
4.7.2 Síntese de metaloproteinases, inibidores tissulares de metaloproteinases e fatores de crescimento nos VUFs.	31

4.7.3. Síntese de colágeno tipo I e colágeno tipo III nos VUFs.....	32
4.7.4. Síntese de vimentina dos VUFs após estímulo com ORC2 e ORC3+Ag.	32
4.8 Análises estatísticas	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Morfologia celular	35
5.2 Ensaio Preliminares	35
5.2.1 Caracterização dos VUFs quanto à síntese de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III.....	35
5.2.2 Ensaio de tempo de duplicação celular (<i>doubling time</i>) de fibroblastos oriundo de pele normal e úlcera venosa.	37
5.2.3 Determinação da concentração de ORC/colágeno associado ou não a prata por espectrofotometria com MTT.....	37
5.3 Ensaio de interação VUFs – ORC/colágeno/Ag	46
5.3.1 Proliferação dos VUF expostos à ORC/colágeno com e sem adição de prata.	46
5.3.2 Síntese de metaloproteinases, inibidores tissulares de metaloproteinases e fatores de crescimento.....	47
5.3.2.1 Metaloproteinases	47
5.3.2.2 Inibidores de metaloproteinases	53
5.3.2.3 Fator de crescimento transformador beta β 1, 2 e 3	56
5.3.3 Síntese de colágeno tipo I e colágeno tipo III	60
5.3.4 Síntese de vimentina dos VUFs após estímulo com ORC2 e ORC3+Ag	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	77
8 ANEXOS	79
ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP	80

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para paciente submetidos à mastoplastia	82
ANEXO C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para paciente submetidos ao curativo de úlcera venosa	85
9 REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

Nicolosi JT. Efeito *in vitro* da celulose oxidada regenerada, colágeno e prata na função dos fibroblastos oriundos de úlcera venosa [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Os fatores bioquímicos de cronicidade de úlceras venosas ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, sabe-se que há desequilíbrio entre produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e fatores de inibição tissular de metaloproteinases (TIMPs), metabolismo anormal de colágeno, senescência de fibroblastos e alterações na ação de fatores de crescimentos, tais como fator transformador de crescimento beta (TGF- β). Diante das falhas no processo de reparo tecidual, várias terapias têm sido desenvolvidas com destaque para celulose oxidada regenerada (oxidized regenerated cellulose - ORC)/colágeno e ORC/colágeno/prata cuja função é alterar o microambiente diminuindo MMPs/TIMPs presente no leito da ferida. Nesse estudo, objetivamos avaliar o comportamento *in vitro* de fibroblastos oriundos de leito de úlcera venosa (VUF) na presença de ORC/colágeno, associada ou não à prata, quanto aspectos morfofuncionais celulares e síntese de MMPs, TIMPs, TGF β , colágeno tipo I e colágeno tipo III. Após padronização do tempo de exposição e concentração de ORC/colágeno e ORC/colágeno/prata, foi realizada avaliação dos sinalizadores de interação celular utilizando-se imunoensaio *Multiplex bead-based* nos sobrenadantes da cultura de VUFs e imunofluorescência indireta nas células cultivadas. Como resultado, os estímulos ORC2 (correspondente à 2.8 mg/mL) e 4.2 mg/mL (ORC3+Ag) foram os que apresentaram maior homogeneidade proliferativa. A ORC/colágeno interferiu positivamente na síntese de MMP1, já a presença de prata interferiu negativamente na síntese de MMP2, MMP10, MMP13, TIMP1, TIMP 2 e TIMP3 e positivamente no colágeno tipo III, as sínteses de TGF β e colágeno tipo I não sofreram interferência dos estímulos. Tais achados sugerem que a presença de celulose oxidada regenerada pode modular a formação de fibrose no leito da ferida. Quando há presença de prata, nota-se tendência anti-inflamatória sobre a célula com maior síntese de colágeno tipo III.

Descritores: cicatrização de feridas; úlcera venosa; celulose oxidada; metaloproteinases; prata.

ABSTRACT

Nicolosi JT. In vitro effect of oxidized regenerated cellulose, collagen and silver on the function of venous ulcer fibroblasts [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

The biochemical factors of chronicity of venous ulcers are not yet fully understood, however, it is known that there is imbalance between producing matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibition factors of metalloproteinases (TIMPs), abnormal collagen metabolism, fibroblastic senescence and changes in growth factors action, such as transforming growth factor beta (TGF- β). In the face of failures in the tissue repair process, many therapies have been developed. The use of oxidized regenerated cellulose (ORC)/collagen and ORC/collagen/silver, to modify the microenvironment by decreasing MMPs/TIMPs present in the wound bed, has been emphasized. In the present study, we aimed to evaluate the *in vitro* behavior of fibroblasts derived from venous ulcer (venous ulcer fibroblasts - VUF) in the presence of ORC/collagen associated or not to silver with regard to cellular morph functional aspects and synthesis of MMPs, TIMPs, TGF β , type I and type III collagen. After standardization of the exposure time and concentration of ORC/collagen and ORC/collagen/silver stimulation, an evaluation of cell interaction signaling was performed by using a bead-based multiplex immunoassay in cells supernatants and indirect immunofluorescence in cultured cells. We demonstrated that the ORC2 (corresponding to 2.8 mg/mL) and 4.2 mg/mL (ORC3+Ag) stimuli had the highest proliferative homogeneity. The ORC/collagen interfered positively in the synthesis of MMP1, since the presence of silver interfered negatively in the synthesis of MMP2, MMP10, MMP13, TIMP1, TIMP2 and TIMP3 and positively in type III collagen, the synthesis of TGF β and type I collagen did not suffer interference. Such findings suggest that the presence of regenerated oxidized cellulose may modulate the formation of fibrosis in the wound bed. When silver is associated anti-inflammatory tendency is observed on fibroblasts with increased type III collagen synthesis.

Descriptors: wound healing; venous ulcer; oxidized cellulose; metalloproteinases; silver.

1 INTRODUÇÃO

Úlceras crônicas de membros inferiores decorrem de diversas etiologias destacando-se: venosa, arterial, traumática, infecciosa e diabética^{1,2}. Dentre essas, a úlcera de origem venosa acomete 1% da população mundial e corresponde a 75% de todas as úlceras crônicas³. A patologia venosa surge quando a pressão venosa é aumentada em decorrência do prejuízo do retorno do sangue. Isso pode ser resultado da incompetência valvular, obstrução venosa, disfunção dos músculos da perna ou combinações desses fatores^{4,5}.

Várias teorias tentam explicar como hipertensão venosa acarreta ulceração, porém, todas são unânimes em considerar que ocorre fibrinólise defeituosa, deposição excessiva de fibrina, dano capilar e hipertensão venosa⁶⁻⁹.

Os fatores bioquímicos da cronicidade da úlcera venosa ainda não são totalmente esclarecidos, entretanto, sabe-se que apresentam desequilíbrio entre produção de metaloproteinases de matriz (*Matrix Metalloproteinases* - MMPs) e fatores de inibição tissular de metaloproteinases (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* - TIMPs)^{10,11}, além de metabolismo anormal de colágeno^{12,13}, fibroblastos senescentes¹⁴ e alterações na ação de fatores de crescimento, tais como o fator transformador de crescimento beta (TGF- β)¹⁵.

Na pele, as metaloproteinases são capazes de decompor elementos da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos e outras glicoproteínas estruturais) e participam na ativação de fatores de crescimento¹⁶. A degradação proteolítica da matriz extracelular (MEC) é essencial para o processo de remodelação e reparação, sendo que queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos são fontes de MMPs. Durante o processo de reparo tecidual, as MMPs são, também, responsáveis por realizar a interação epidermo-mesenquimal durante migração dos queratinócitos, viabilizar angiogênese e remodelar os tecidos conectivos recém-formados¹⁷.

Há evidência de que, *in vitro*, exsudato de úlceras crônicas possuem maior concentração de MMP-1 e MMP-3 secretados pelos fibroblastos dérmicos e menor produção de TIMP-1 se comparado ao exsudato de feridas agudas, sugerindo que na úlcera venosa esses mediadores podem propiciar um micro ambiente de ação proteolítica¹⁰. Outro estudo que comparou a

concentração de MMP-2 e TIMP-2 entre exsudato de úlceras venosas crônicas e úlceras venosas em regressão evidenciou maior concentração de metaloproteinase (MMP-2) e menor de inibidor de metaloproteinase (TMP-2) na amostra de úlcera venosa crônica sugerindo níveis maiores de proteinases nessas lesões¹¹.

Graças aos estudos que evidenciaram falhas no processo de reparo tecidual levando à cronicidade dessas lesões, novas terapêuticas foram desenvolvidas. Curativos que interagem com o meio da ferida conseguindo alterar seu microambiente ganharam destaque, dentre esses curativos, a literatura tem dado ênfase à celulose oxidada regenerada (*oxidized regenerated cellulose*, ORC)/colágeno associada ou não à prata¹⁸.

Wollina *et al.*¹⁹ evidenciaram a melhor evolução clínica de um grupo de portadores de úlcera venosa tratado com ORC/colágeno em relação à um grupo tratado com hidropolímero/hidrocolóide. Semelhante resultado foi obtido por Vin *et al.*²⁰ em estudo clínico comparando a ORC/colágeno e gaze não aderente em portadores de úlceras venosas. Tais autores atribuem esse fato à capacidade da ORC/colágeno de reduzir a ação proteolítica e reequilibrar o microambiente da ferida.

Com o foco na resposta celular, Hart *et al.*²¹ realizaram estudo *in vitro* em que testaram fibroblastos humanos proveniente de derme íntegra quanto à quimioatração na presença de três diferentes diluições de ORC/colágeno (1:100; 1:1000; 1:10.000). Os testes demonstraram haver maior quimioatração dos fibroblastos no meio de cultura contendo ORC/colágeno menos diluída. Também foi testada a capacidade de proliferação desses fibroblastos nas três diferentes concentrações de ORC/colágeno (1.4, 2.8 e 4.2 mg/mL) e observada maior proliferação nas concentrações 2.8 e 4.2 mg/mL.

A prata é um dos agentes antissépticos mais utilizados associados na composição de curativos. Em concentrações baixas pode trazer benefícios para o reparo tecidual devido ao seu efeito antimicrobiano e baixa toxicidade, porém, a eficácia da sua utilização nos curativos ainda é controversa²². Quando associada à ORC/colágeno demonstra melhora do microambiente da ferida, controlando infecção e promovendo o reparo tecidual^{23,24}.

Apesar dos estudos anteriormente citados e segundo a meta-análise de 2016, disponível na Cochrane²⁵, ainda há lacunas quanto o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvendo ORC/colágeno e ORC/colágeno com prata no microambiente da úlcera venosa. Assim, esse estudo pretendeu avaliar o comportamento *in vitro* de fibroblastos oriundos de leito de úlcera venosa na presença de ORC/colágeno, associada ou não à prata, quanto aos aspectos morfofuncionais celulares, síntese de metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs), além de fator transformação de crescimento beta (TGF β), colágeno tipo I e colágeno tipo III.

2 OBJETIVO

Avaliar o comportamento *in vitro* de fibroblastos oriundos de leito de úlcera venosa na presença de ORC/colágeno, associada ou não à prata, quanto aspectos morfofuncionais celulares e síntese de metaloproteinases (MMPs), seus inibidores (TIMPs), fator transformação de crescimento beta (TGF β), colágeno tipo I e colágeno tipo III.

3 CONCEITOS GERAIS

Úlceras crônicas de pele são definidas como lesão aberta que persistem por mais de 30 dias e demonstram pouca ou nenhuma atividade cicatricial espontânea²⁶.

Úlceras crônicas podem ser consequentes de diversas etiologias destacando-se: venosa, arterial, traumática, infecciosa e diabética^{1,2}. Dentre essas, a de origem venosa acomete 1% da população mundial com prevalência crescente com a idade²⁷ e corresponde a 70% de todas as úlceras crônicas²⁸.

A úlcera de etiologia venosa ou simplesmente “úlcera venosa” causa ao paciente dor e alterações funcionais que afetam suas atividades diárias, gerando impacto socioeconômico significativo. Estima-se que nos Estados Unidos sejam gastos mais que 2.5 bilhões de dólares por ano para o tratamento de pacientes com úlcera venosa²⁷⁻³⁰.

Anatomicamente o sistema venoso dos membros inferiores é formado pelas veias profundas, superficiais e perforantes que comunicam as duas primeiras. O sangue é direcionado dos membros inferiores para o coração com ajuda da contração dos músculos da perna. Para permitir o fluxo unidirecional do sangue por essa rede venosa há presença de válvulas bicúspides. Com a queda da pressão no sistema arterial profundo, as válvulas fecham evitando um refluxo e aumentando a pressão no sistema venoso superficial. Com o relaxamento da musculatura da perna, há o esvaziamento do sistema venoso profundo e consequentemente queda da pressão, promovendo abertura das válvulas e direcionando o fluxo de sangue do sistema superficial ao profundo^{4,5,29,31}.

A doença venosa surge quando a pressão venosa é aumentada em decorrência do prejuízo do retorno sanguíneo. Isso pode ser resultado da incompetência valvular, obstrução venosa, disfunção dos músculos da perna ou combinações desses fatores^{4,5,29}.

Clinicamente essa insuficiência venosa se caracteriza por presença de dilatação venosa, veias reticulares, veias varicosas, edema, eczema, lipodermoesclerose, atrofia branca, telangiectasia, alteração da pigmentação do membro, dor e ulceração venosa^{32,33,34}.

Quando ocorre a formação de ulcerações, essas são encontradas mais frequentemente na *gaiter area*, que é a região compreendida entre tornozelo e

metade da panturrilha na porção medial da perna, acima do maléolo medial. Tais lesões apresentam características clínicas muito peculiares, como: edema que piora no final do dia e melhora com a elevação do membro, hiperpigmentação ou dermatite ocre, lipodermatoesclerose, dor, eczema e ulcerações que podem ser únicas ou múltiplas e em geral formato irregular, superficial, bordas bem definidas e com exsudado amarelado. Após seis semanas sem cicatrização essa ferida é denominada de crônica^{5,35,36}.

Além do exame clínico, é importante avaliar doença arterial associada. Para isso pode-se recorrer ao cálculo do índice tornozelo/braço, angiografia, pletismografia a ar, ultrassonografia para analisar a anatomia vascular e o Doppler de onda contínua para avaliar a hemodinâmica^{29,34}.

A classificação descritiva da doença venosa é realizada pelo sistema internacional CEAP, sendo avaliado: sinais clínicos (C), etiologia (E), disfunção anatômica (A) e condições fisiopatológicas (P) e classificada em 7 categorias (de 0 a 6), além da presença ou ausência de sintomas^{32,33,34}.

Várias teorias tentam explicar como a hipertensão venosa gera formação de úlceras cutâneas, porém, todas são unânimes em considerar que ocorre fibrinólise defeituosa, deposição excessiva de fibrina, dano capilar e hipertensão venosa^{6-8,37,38}.

Browse e Burnand⁶ relatam que a hipertensão venosa distende capilares promovendo extravasamento de macromoléculas para o fluido intersticial. A principal macromolécula que extravasa é o fibrinogênio que no espaço intersticial será polimerizado formando fibras insolúveis. Tais fibras, quando depositadas ao redor dos capilares, formam barreira para passagem do oxigênio e nutrientes, ocasionando morte celular e ulceração.

Coleridge-Smith *et al.*⁷ propõem que a pressão elevada no sistema venoso do paciente levam à redução da pressão de perfusão capilar. Com a redução desse fluxo capilar há retenção de leucócitos e eritrócitos que liberarão radicais livres e enzimas proteolíticas resultando em danos dos capilares. Aumentando a permeabilidade dos capilares há perda de fibrinogênio e outras proteínas do plasma resultando na formação de “rolhas” ou *cuffs* de fibrina. Além disso, o extravasamento de leucócitos resulta em áreas de isquemia ao redor dos capilares.

A teoria proposta por Falanga e Eaglestein⁸ propõe que a distensão capilar causada pela hipertensão venosa propicia o extravasamento de fibrinogênio, alfa-macroglobulina e outras macromoléculas do vaso para a derme. Essas moléculas “aprisionam” fatores de crescimento e outros responsáveis pela homeostase, tornando-os indisponíveis para o processo de reparação cicatricial.

Após a ocorrência da lesão tecidual, normalmente ocorre reparo tissular. Esse é caracterizado por uma série de eventos, bem coordenados que possuem a finalidade de restaurar a integridade e funcionalidade da pele³⁹.

Para que a reparação ocorra e, portanto, haja a substituição do tecido lesionado pelo sadio, é necessário haver migração celular. Esse processo é didaticamente dividido em fases que interagem e se sobrepõem, a saber: fase homeostase/inflamatória, fase de proliferativa e fase de remodelação^{39, 40}.

A primeira fase tem por finalidade conter o sangramento. Inicialmente ocorre vasoconstrição. O contato do sangue com as proteínas da matriz extracelular ativando a cascata de coagulação proporcionando a agregação plaquetária e formação do trombo¹⁶. O coágulo é composto por colágeno, plaquetas, trombina e fibronectina, esses elementos estimulam o início da resposta inflamatória. A formação do coágulo possui a função de servir como “ponte” para a entrada de neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, além de estimular liberação de citocinas e fatores de crescimento^{41, 42, 43}.

Imediatamente após a formação do coágulo, há resposta de neutrófilos que constituirão, nesse momento, 50% de todas as células presentes na lesão. À medida que ocorre acúmulo de mediadores inflamatórios, prostaglandinas são produzidas levando à vasodilatação a fim de permitir o aumento da concentração de neutrófilos e mediadores como interleucina – 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), TGF- β e fator plaquetário 4 (PF4)^{41, 44}. Neutrófilos são responsáveis por produzir ROS (espécie reativa de oxigênio), proteases e citocinas pro inflamatórias com a finalidade de “higienizar” a ferida. Quando esse processo é completado ocorrerá apoptose dos neutrófilos e chegada dos macrófagos⁴³.

Monócitos são atraídos para a região e diferenciados em macrófagos atingindo pico de concentração na ferida após 48-72 horas da lesão⁴⁴. Macrófagos secretam: fator de estimulação de colônias de macrófagos (citocina necessária para a sobrevivência dos macrófagos e monócitos), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , importante citocina inflamatória), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas, importante na quimioataxia e proliferação de fibroblastos), VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), EGF (fator de crescimento epidérmico), IL-1 e síntese de óxido nítrico (NO). Essas células são responsáveis pelo início e propagação da formação do novo tecido na ferida sendo de extrema importância para a transição da inflamação para o reparo^{42, 45}.

Células endoteliais também produzem NO em resposta à hipóxia, nessa situação há estímulo maior para síntese de VEGF. O aumento da concentração de NO também estimula vasodilatação protegendo tecidos novos de isquemia⁴¹.

Linfócitos são atraídos para a ferida após 72 horas da lesão havendo aumento gradativo de sua concentração, atingindo uma dominância após aproximadamente 14 dias. Essas células além de serem responsáveis pela produção de antígenos no sistema imunológico secretam fatores de crescimento que contribuem para a remodelação dos tecidos⁴⁴.

Nessa fase há envolvimento de substâncias químicas para se iniciar e controlar a inflamação. Dentre elas destacam-se a histamina, responsável pela vasodilatação, serotonina, que contribui para a permeabilidade das vênulas e a heparina, possui ação anticoagulante. Envolvidas nessas fases também estão as prostaglandinas que contribuem para a vasodilatação (prostaglandina D2 - PGD2, prostaglandina E2 - PGE2 e prostaglandinas F2 α - PGF2 α), atração de leucócitos para a área lesionada e sensibilização dos receptores de dor (PGE2) e leucotrienos que fazem quimioatração e agregação de neutrófilos (leucotrieno B4), vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular (leucotrieno C4, leucotrieno D4 e leucotrieno E4)^{40, 45}.

Fatores de crescimento exercem função ímpar nessa fase, destacando-se PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) como quimioatraente de monócitos, macrófagos e fator mitogênico para fibroblastos. Muitos fatores de

crescimento secretados pelos macrófagos influenciam proliferação celular, angiogênese e síntese de matriz extracelular. Destacam-se entre esses TGF- α (fator de crescimento tumoral- α), importante na migração de queratinócitos e reepitelização, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promotores de migração de fibroblastos e células endoteliais⁴⁵.

Fase inflamatória pode persistir a fim de garantir que bactérias e tecidos desvitalizados sejam eliminados da ferida, havendo, em algumas situações prolongamento dessa etapa contribuindo como um dos fatores responsáveis pela cronicidade da ferida⁴⁴.

A fase seguinte é denominada fase proliferativa que é caracterizada por angiogênese, formação de tecido de granulação, depósito de colágeno e reepitelização⁴⁴.

Angiogênese é iniciada no momento em que há formação do tampão hemostático e plaquetas liberam TGF- β , PDGF e FGF (fator de crescimento de fibroblastos). Em resposta à hipóxia, VEGF é produzido e em combinação com outras citocinas, induzem células endoteliais a desencadear neovascularização e reparar danos dos vasos sanguíneos. O centro da ferida é quase avascular, uma vez que necessita de propagação de novos e intactos vasos da borda da ferida. À medida que processo de angiogênese ocorre, uma rica rede de capilares é formada pelas ramificações dos vasos saudáveis. Inicialmente esses capilares são frágeis e permeáveis contribuindo para formação de edema tecidual e aparecimento de tecido de granulação^{41, 44}.

Células epiteliais da borda da ferida começam a se multiplicar formando barreira à perda de fluídos e invasões bacterianas. O estímulo para proliferação epitelial é gerado por síntese de EGF e TGF- α (fator de crescimento transformador alfa) produzido pela ativação plaquetária e macrófagos. Epitelização é estimulada pelas citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α). Por sua vez, fibroblastos sintetizam e secretam fator de crescimento de queratinócitos (KGF-1, KGF-2) e IL-6 que farão estimulação dos queratinócitos circundantes estimulando-os para migrarem para a área da lesão, com posterior proliferação e diferenciação em epiderme. Essa proliferação de queratinócitos estimula expressão de VEGF induzida pelos IL-1, TNF- α , TGF- β 1 e KGF^{41,45}.

Nessa fase proliferativa fibroblastos são predominantes e estimulados a proliferar pela ação de fatores de crescimento do tampão homeostático (principalmente TGF- β e PGGF - fator de crescimento derivado de plaqueta), migrando pela ferida^{44,30}. Fibroblastos agora localizados no leito da ferida, estimulados pela secreção dos macrófagos de TGF- β 1, se diferenciam em miofibroblastos (célula que possui grandes feixes de actina contendo microfilamentos dispostos ao longo do citoplasma), e começam a produzir colágeno, essa concentração de TGF- β chega ao pico em uma ferida normal por volta do 7 -14 dias^{41, 46}.

Em resposta ao PDGF e o TGF- β , os fibroblastos começam a sintetizar uma matriz provisória composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina. Inicialmente esse tecido conjuntivo é frouxo, desorganizado e fraco^{41,44,47}.

Haverá contração da matriz de colágeno levando ao fechamento das bordas do ferimento e remodelação do tecido conjuntivo provisório com finalidade de restaurar a arquitetura resistência física original. Para tal, há necessidade da reabsorção de fibrilas de colágeno provisória (tipo III) pelas MMPs e síntese de fibrilas de colágeno tipo I, mais resistentes^{47,48}. Esse fenômeno caracteriza o início da terceira etapa do processo de reparo tecidual, a fase de remodelação^{45, 44}.

Essa degradação de colágeno na ferida é controlada por várias enzimas proteolíticas (MMPs) secretadas por macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos, sendo que, durante as fases do processo de reparo tecidual há necessidade de distintas combinações de MMPs e TIMPs⁴². O desequilíbrio entre a expressão de MMPs e seus inibidores (TIMPs) pode contribuir para uma cicatrização defeituosa e fibrose excessiva^{40,45,49}.

Nas feridas crônicas há persistência da fase inflamatória impedindo a progressão do processo de cicatrização⁵⁰. Trengove *et al.*⁵¹ publicaram o primeiro trabalho que comparou e demonstrou diferença de concentração das citocinas inflamatórias (IL1, IL6 e TNF α) nas úlceras venosas que não cicatrizavam e das que cicatrizavam. Após essa publicação outros estudos demonstraram alterações do microambiente da ferida com a presença de

citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e MMPs em concentração elevada^{50,52-54} dificultando o processo de reparo tecidual.

Apesar de vários estudos, os fatores bioquímicos da cronicidade da úlcera venosa ainda não estão totalmente esclarecidos, entretanto, sabe-se que essas úlceras apresentam desequilíbrio entre produção de MMPs e TIMPs^{10,11}, além de metabolismo anormal de colágeno¹² e alterações na ação de fatores de crescimento¹⁵.

As MMPs constituem um grupo de enzimas (endopeptidases) zinco dependente responsáveis pela degradação da MEC e membranas basais⁵⁵. Também estão envolvidas na liberação de fatores de crescimento da membrana celular ou MEC, clivagem de fatores de crescimento para as membranas celulares, disponibilização de moléculas de adesão celular e ativação de outras MMPs através de outros processos não catabólicos⁵⁶. Também participam de outros processos patológicos como no câncer e metástases, doenças pulmonares, esclerose múltipla entre outras^{57,58}.

Em 1962, Gross e Lapeire⁵⁹ realizaram as primeiras pesquisas para determinar a ação da collagenase em anfíbios. As MMPs foram por eles classificadas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinases. Essa classificação foi baseada na organização e no substrato em que atuam, no entanto, com o conhecimento das novas MMPs, um sistema de numeração sequencial foi criado, agrupando-as de acordo com a sua estrutura molecular⁵⁷. Atualmente as MMPs são divididas em sete grupos diferentes baseadas no substrato que afeta e na sua organização, sendo esses grupos: collagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, metaloestastases, MMPs tipo membrana (MT-MMPs) e outras MMPs^{60,61}.

Essas enzimas são sintetizadas na sua forma inativa, zimogenos (pro-MMPs) e são majoritariamente ativadas fora da célula, com exceção daquelas “tipo membranas” (MT-MMPs) que são ativadas na superfície celular. Esse fenômeno de ativação ocorre devido à quebra de uma ligação de cisteína Zn^{+2} , cuja função é bloquear a reatividade do sítio ativo, convertendo, assim, os zimogenos (forma inativa) em MMPs (forma ativa)⁵⁷. Todas MMPs contêm íons de Zn^{+2} no sítio de ação catalítica e requerem íons de Ca^{+2} para estabilização e atividade, sendo denominadas enzimas metalodependentes⁵⁷.

Na pele, as metaloproteinases são capazes de decompor elementos da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos e outras glicoproteínas estruturais) e participam na ativação de fatores de crescimento (TGF- β e VEGF)¹⁸. A degradação proteolítica da MEC é essencial para o processo de remodelação e reparação, sendo que queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos são fontes de MMPs. Durante o processo de reparo tecidual, as MMPs são, também, responsáveis por: interação epidermo-mesenquimal quando da migração dos queratinócitos; viabilizar angiogênese e remodelar os tecidos conectivos recém-formados^{17,62}

Úlceras crônicas apresentam maiores concentrações dessas MMPs^{10,63,62,64} quando comparadas à pele normal, gerando metabolismo anormal de colágeno. Podemos destacar como responsável pelo metabolismo de colágeno MMPs-1 (colagenase 1) e MMP-13 (colagenase 3) como principais proteinases envolvidas na *turnover* de colágeno, sendo MMP-1 mais eficiente na degradação de colágeno tipo III quando comparada a colágeno, MMP-13 é mais eficiente na degradação do tipo II do que o tipo I e III^{17,62,65}. MMP-2 (gelatinase A) também é responsável pelo metabolismo de colágeno, mais especificamente atuando na fase final de degradação do colágeno após clivagem iniciada pelas colagenases^{17,60}. Já MMP-3 (estromelisina 1) e MMP-10 (estromelisina 2) atuam nos mesmos substratos, colágeno e não colágeno (fibronectina, colágeno tipo IV, V, IX e X), não estando presentes na epiderme ou derme intacta porém, estão presentes na ferida aguda ou crônica. MMP-3 é expressa por fibroblastos dérmicos e participa da formação do tecido de granulação^{17,60,66}.

Na pele, a regulação da atividade das MMPs é controlada, dentre outros fatores, pela ação de inibidores endogenos de MMP, as TIMPs^{56,67}. Existem 4 tipos de TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 e TIMP4) no microambiente das lesões e apesar de todas as quatro serem capazes de inibir todas as MMPs conhecidas na proporção 1:1, a eficácia dessa inibição varia com cada TIMP. Acredita-se que equilíbrio entre MMPs e TIMPs seja responsável pela manutenção da MEC, aumentos de MMPs resultam em degradação de MEC, enquanto aumento de TIMPs resulta em proteção da MEC e diminuição da ação proteolítica^{61,68}.

Há evidências que muitas condições patológicas (cicatrices cutâneas, fibrose pulmonar e neuropatia diabética) estão associadas à excessiva deposição de MEC, decorrentes do aumento da expressão de TIMP1 nesses ambientes “pró-fibróticos”, sugerindo, assim, que TIMPs 1 e 2 diminuam degradação da MEC. Já TIMP 3, exerce a função de regulação dos processos inflamatórios (controlando a regulação do TGF- β 1), além de inibir a remodelação da MEC^{69,70}.

Há evidência de que, *in vitro*, exsudato de úlceras crônicas possui maior concentração de MMP-1 e MMP-3 secretados pelos fibroblastos dérmicos e menor produção de TIMP-1 se comparado ao exsudato de feridas agudas, sugerindo que na úlcera venosa esses mediadores podem propiciar um micro ambiente de ação proteolítica dificultando o fechamento da lesão¹⁰.

Outro estudo que comparou a concentração de MMP-2 e TIMP-2 entre exsudato de úlceras venosas crônicas e úlceras venosas em regressão evidenciou maior concentração de metaloproteinase (MMP-2) e menor de inibidor de metaloproteinase (TIMP-2) na amostra de úlcera venosa crônica sugerindo níveis maiores de proteinases nessas lesões¹¹.

Fibroblastos presentes no leito de úlceras venosas são funcionalmente diferentes de fibroblastos de pele normal, tanto na produção de colágeno intracelular quanto de fator transformador β 1 (TGF- β 1), demonstrando que fibroblastos de úlcera venosa apresentam dificuldade de resposta ao TGF- β , interferindo na síntese de matriz extracelular incluindo síntese de colágeno¹⁵.

O TGF- β é responsável por regular quase todas etapas do processo de reparo tecidual e a sinalização inadequada pode implicar em processos patológicos da pele incluindo feridas crônicas e cicatrização exacerbada⁷¹, havendo evidências de correlação entre TGF- β e processos fibróticos⁷². Fisiologicamente, esse fator de crescimento promove resolução de ferida graças à produção de proteínas da MEC e inibição da MMPs, no entanto, em doenças fibróticas, a produção exacerbada de TGF- β pode comprometer a cicatrização^{71,73}.

A subfamília do TGF- β , que consiste de três isoformas (β 1, β 2 e β 3), exerce importante papel no reparo tecidual. TGF- β 1 é encontrado em níveis

elevados em feridas crônicas e promove diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, produção de componentes da MEC e quimiotaxia celular⁷¹.

O tratamento das feridas é dinâmico e depende da evolução das fases da reparação tecidual. Inclui métodos clínicos, na fase inicial, e cirúrgicos, sendo o curativo mais frequentemente utilizado. Um arsenal terapêutico vasto, composto por curativos passivos, com princípios ativos, inteligentes, biológicos e compressivos é capaz de auxiliar no reparo do tegumento em várias situações. Os curativos são utilizados para melhorar as condições do leito da ferida podendo ser em algumas ocasiões, o próprio tratamento definitivo. Em muitas situações é apenas etapa intermediária para o tratamento cirúrgico^{36,74}.

Nas úlceras venosas a primeira linha de tratamento é terapia compressiva, porém, cerca de 60% dos pacientes apresentam úlceras que não cicatrizam após 12 semanas e 40% dos pacientes não cicatrizam mesmo após 24 semanas com essa terapêutica²⁵.

Graças aos estudos que evidenciaram falhas no processo de reparo tecidual levando à cronicidade dessas lesões, novas terapêuticas foram desenvolvidas⁷⁴. Curativos que interagem com o meio da ferida conseguindo alterar seu microambiente ganharam destaque⁷⁵, dentre esses curativos, a literatura tem dado ênfase à celulose oxidada regenerada (*oxidized regenerated cellulose* - ORC)/colágeno associado ou não a prata¹⁸.

O curativo de ORC/colágeno, comercialmente denominado Promogran® (Systagenix, Gargrave, UK), é uma matriz absorvente de poros abertos, esterilizada e liofilizada⁷⁶. Quando ORC/colágeno está associado à prata (1%) recebe o nome comercial de Promogran Prisma® (Systagenix, Gargrave, UK).

Quimicamente a ORC é produzida pelo processo de oxidação de grupos de glucose de celulose com dióxido de nitrogênio resultando em um material solúvel e biodegradável utilizado há mais de décadas⁷⁷ principalmente como agente hemostático^{76, 78}.

Segundo o fabricante, para o preparo do componente colágeno, presente no material de curativo, a derme bovina é cortada em quadrados de 10 cm e lavadas com solução de hidróxido de sódio 0,4% (v/v) por 10 dias com finalidade de remover resíduos de anexos de pele e componentes que não sejam de colágeno. Após, esse período o material é fragmentado e

homogeneizado em ácido acético 0,05 M restando uma fração sólida de 4% (p/v). ORC em pó, é acrescida à suspensão de colágeno na proporção de 45:55 (ORC : colágeno) resultando na concentração sólida total de 1,0% (p/v) da mistura homogeneizada. Essa suspensão final é então liofilizada, embalada e esterilizada com irradiação gama²¹.

Outra versão produzida é o curativo de ORC/colágeno associado à prata (Promogran Prisma®) com ação antimicrobiana⁷⁶. Atualmente há vários curativos desenvolvidos na indústria utilizando a prata na sua composição, porém, esses produtos vêm enfrentando vários questionamentos em relação a seu custo e benefício⁷⁹⁻⁸².

Existem várias formas de compostos utilizando prata (elemento prata, composto por prata metal e monocristal de prata; composto inorgânico, como o óxido de prata, fosfato de prata, sulfaziadina de prata, entre outros, e complexo orgânico, como alginato de prata, carboximetilcelulose com prata) podendo a prata estar disposta no curativo em camada (na superfície do curativo), na estrutura do curativo ou em ambas as localizações^{22,79}.

Para se tornar bactericida o átomo de prata precisa perder um elétron e se tornar íon de carga positiva (Ag^+), esses ânions se ligarão à moléculas ou íons negativos presentes nas membranas celulares bacterianas rompendo-as e ao seu DNA bloqueando, assim, enzimas da cadeia respiratórias^{79,83}.

Vários espectros bacterianos são suscetíveis à prata, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE), vírus e fungos. Entretanto, prata também pode penetrar em células próprias da ferida interagindo com proteínas e interferindo em seus processos energéticos, função enzimática e proliferação celular. Tal efeito traz algumas controvérsias na sua utilização, dentre elas podemos destacar: menores taxas de cicatrização, citotoxicidade, efeitos sistêmicos (como argíria), resistência bacteriana à prata além do custo elevado do tratamento^{79,83}.

Apesar dessa controvérsia, prata pode trazer benefícios clínicos caso utilizada adequadamente. Assim, recomenda-se que o produto tenha concentrações baixas de prata (uma parte por milhão de íons de prata ou menos). Havendo consenso de não utilização de curativos com prata superior

que 2 semanas em casos em que não houve nenhum sinal de evolução da cicatrização⁷⁹.

Promogran® e Promogran Prisma®, são apresentados como matrizes moduladoras de protease, gerando microambiente propício a cicatrização de feridas⁸⁴. Na presença de exsudato o material de curativo mostra alta capacidade de absorção e se transformam em gel biodegradável. Esse gel se liga às MMPs, possibilitando, assim, “preservação” dos fatores de crescimento, estímulo ao crescimento de tecido de granulação e resolução da ferida^{84,85}.

Estudos comprovaram benefícios clínicos na utilização da ORC/colágeno⁸⁶⁻⁹³, dentre eles podemos destacar a comparação da evolução da ferida de grupos de pacientes com úlcera venosa utilizando a terapia compressiva tratado com ORC/colágeno ou tratado com hidropolímero/hidrocolóide no qual foi possível observar uma melhor epitelização e recuperação da microcirculação do membro afetado no grupo de pacientes tratado com ORC/colágeno¹⁹. Corroborando esses resultados, Vin *et al.*²⁰ em estudo clínico comparando a terapia compressiva associada ao curativo com ORC/colágeno ou gaze não aderente em portadores de úlceras venosas demonstraram maior redução de área cruenta, em menor tempo no grupo tratado com ORC/colágeno. Tais autores atribuem esse fato à capacidade da ORC/colágeno de reduzir a ação proteolítica e reequilibrar o microambiente da ferida.

Comprovando a hipótese de diminuição de que ORC/colágeno altera microambiente da ferida diminuindo ação proteolítica, Smeets *et al.*⁹⁴ realizaram estudo comparando exsudatos de úlceras venosas de um grupo tratado com associação ORC/colágeno e hidrocolóide e outro, tratado somente com hidrocolóide. Os autores concluíram que não houve diferença de concentração de MMP-2 nos dois grupos, porém, encontraram importante redução da atividade de gelatinase e elastase no grupo tratado com ORC/colágeno, confirmando a evidência de que esse curativo favorece um meio fisiologicamente mais propício para o reparo tecidual.

Cullen *et al.*⁸⁷ analisando exsudato de úlceras diabéticas demonstraram capacidade da ORC/colágeno de se ligar às MMP reduzindo sua concentração no exsudato das feridas e estabilizando relação de síntese e degradação no

meio. Estudo realizado por Ulrich *et al.*⁹⁵ onde foi analisada ação de ORC/colágeno no exsudato de feridas diabéticas concluiu que ORC/colágeno apresentou a propriedade de diminuir os níveis de MMPs (MMP-2) do exsudato havendo melhor evolução das feridas, corroborando com outras publicações.

Em estudo randomizado controlado comparando o uso da ORC/colágeno/prata e tratamento padrão em feridas de pés diabéticos, demonstrou que tratamento com ORC/colágeno/prata mostrou melhor taxa de cicatrização de feridas havendo 50% de redução de área em 4 semanas e continuidade do processo de reparo tecidual nas semanas subsequentes e prevenindo desenvolvimento de infecção²³. Outro estudo prospectivo não comparativo também demonstrou eficácia clínica, com maior taxa de cicatrização, menor dor e sangramento, de curativo com ORC/colágeno/prata⁹⁶.

Com foco na resposta celular, Hart *et al.*²¹ realizaram estudo *in vitro* em que testaram fibroblastos humanos provenientes de derme íntegra quanto à quimioatração na presença de três diferentes diluições de ORC/colágeno (1:100; 1:1000; 1:10.000). Os testes demonstraram maior quimioatração celular no meio de cultura contendo ORC/colágeno menos diluída. Também foi testada a capacidade de proliferação desses fibroblastos expostos a três diferentes concentrações de ORC/colágeno (1.4, 2.8 e 4.2 mg/mL) sendo observada maior proliferação nas concentrações 2.8 e 4.2 mg/mL.

Assim, os estudos apresentados sugerem que a ORC/colágeno possui a propriedade de estimular a proliferação de fibroblastos, diminuir a concentração de MMPs no microambiente da ferida, proteger fatores de crescimento^{21,87,94,95} e ainda quando associada à prata agregar característica de diminuir a proliferação de microrganismos e evitar infecção^{23,96}.

Contudo, apesar dos estudos previamente citados, ainda há lacunas quanto a interferência da ORC/colágeno, associada ou não à prata, no componente celular presente no leito de úlceras crônica, assim, em nosso estudo pretendemos verificar a ação *in vitro* dessas substâncias em fibroblastos oriundos de úlcera venosa, buscando elucidar efeitos desse curativo nos processos celulares e consequentemente no microambiente da ferida.

4 MÉTODO

4.1 Tipo de estudo

Esse é um estudo *in vitro*, prospectivo, controlado, não randomizado, não cego.

4.2 Procedimentos éticos

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) sob o número: CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 21868413.5.0000.0068 (**Anexo A**) e com apoio FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo 2014/21443-0.

Todos os sujeitos foram convidados a participar sendo assegurada privacidade e não identificação bem como o direito de retirar o material cedido a qualquer momento.

Antes da realização de qualquer procedimento, a pesquisadora explicou objetivo e metodologia da pesquisa. Após o esclarecimento de eventuais dúvidas foi solicitado a cada sujeito a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo B ou C**) com a finalidade de autorizar a doação do tecido.

4.3 Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 04, Pesquisa de Cultura Celular e Cicatrização - da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os ensaios multiplex foram realizados no Laboratório de Fisiopatologia da Inflamação no LIM 17 do HCFMUSP e os

ensaios de caracterização celular e imunoenaios foram realizados no Laboratório de Hematologia e Biologia Molecular no LIM 31.

4.4 População e coleta da amostra

Fibroblastos oriundos de pele normal (NHF - *normal human fibroblasts*) foram obtidos a partir de amostras de pele não-cicatricial, doadas por 12 pacientes do gênero feminino de idade entre 20 e 50 anos, sem morbidades, submetidas à mastoplastia redutora de caráter estético realizadas no Centro Cirúrgico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (IHC) por cirurgião plástico membro da equipe de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP. O material foi doado ao nosso grupo com intuito exclusivo de pesquisa.

Fibroblastos provenientes do leito de úlcera venosa (VUF - *venous ulcer fibroblasts*) foram obtidos de 12 pacientes do gênero feminino, faixa etária de 40 a 65 anos, portadoras de úlcera de membros inferiores cuja existência era superior a 6 meses e decorrente de insuficiência venosa com classificação (CEAP) C6 (presença de lesão), sem comprometimento arterial, tratadas no ambulatório de cirurgia plástica do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses indivíduos não apresentavam comorbidades que pudessem modificar a fisiopatologia das úlceras ou unicamente hipertensão arterial sistêmica, não estavam fazendo uso de corticoides, anti-inflamatórios ou quimioterápicos. Foram excluídos portadores de úlceras de outras etiologias, bem como, portadores de insuficiência arterial. Todas as feridas apresentavam tecido de granulação em moderada quantidade, pouco ou nenhum tecido necrótico e ausência de sinais clínicos de infecção e não estavam sendo tratadas com curativo contendo prata na sua composição.

4.5 Cultivo Celular

Amostras de tecido de granulação de úlcera venosa (n=12) e de pele normal (n=12), depois de lavados em solução fisiológica e descontaminados em etanol 70%, foram subdivididas em fragmentos de aproximadamente 1 mm² e transferidas para tubo cônico contendo colagenase IA 1mg/mL (Sigma: C2674). Após refrigeração por aproximadamente 12 horas, tais fragmentos foram submetidos a três ciclos de centrifugação (1500 rpm por 5 minutos), seguidos de aspiração do sobrenadante e lavagem em PBS. Após a última aspiração, as células sedimentadas no fundo do tubo foram homogeneizadas em meio de cultura padrão (denominado D10) e constituído por: 90% de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Meio Eagle Modificado por Dulbecco; DMEM – GIBCO 12800-017), acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF; Vitrocell/Embriolife 11) com 1% de antibióticos e antifúngico (estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL, GIBCO 15249.062) e 1% de glutamina (L-glutamina 200 mM (100 x); GIBCO 25030.081), e transferidos para frascos de cultura celular com superfície de cultivo de 25 cm² (TPP 90025). A partir de então, os frascos de cultura foram mantidos em ambiente controlado a 37°C com 5% de CO₂.

As culturas foram mantidas em incubadora embebidas em meio de cultura. Trocas de meio foram efetuadas a cada 72 horas, até que cerca de 70 – 80% das células aderidas à superfície de cultivo apresentassem aspecto de confluência, quando as culturas foram amplificadas. A cada amplificação as células foram contadas em câmara hemocitométrica (Neubauer, Kasvi K5.0011).

O fluxograma apresentado na **Figura 1** descreve a seleção de pacientes e obtenção de células.

Figura 1 - Fluxograma de procedimentos e ensaios realizados no estudo para obtenção de NHF e VUF

4.6 Ensaios preliminares

Previamente aos ensaios de interação entre fibroblastos e ORC/colágeno, parâmetros como tempo de duplicação celular (que determina o tempo de estímulo) e concentração de ORC/colágeno com ou sem prata (estímulo a ser utilizado) precisaram ser definidos (**Figura 2**).

Figura 2 - Fluxograma de ensaios realizados no estudo

4.6.1 Caracterização dos VUFs quanto à síntese de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III.

Após obtenção celular foi realizado o ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III para confirmação das características celulares de VUFs. A vimentina é uma proteína presente nos fibroblastos responsável pela adesão, migração e sinalização celular⁹⁷, o colágeno tipo I e colágeno tipo III são proteínas produzidas por essa célula⁴⁶, assim a presença dessas três proteínas confirma que os VUFs são fibroblastos.

Em microplacas pretas de fundo chato de 96 poços (Corning 3599), foram semeados, em triplicata, VUF (aproximadamente 4×10^3 / poço), entre 2ª e 4ª amplificação, provenientes de 3 pacientes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície de cada poço. Após a adesão, os fibroblastos foram expostos por 72 horas ao meio com solução **D10** (controle).

As células cultivadas foram primeiramente fixadas às suas placas de cultivo. Depois de retirado sobrenadante de cada poço, seguido por duas lavagens de 100 µL de DPBS (Dulbecco's Tampão Salina Fosfato), as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich P-6148) por 2 horas a 4°C. Após a incubação as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,1% (Sigma Aldrich 93443) a 4°C por 15 minutos e bloqueadas com 5% de DPBS (Sigma Aldrich A9418) e BSA tipo 3 (*Bovine serum albumine*, albumina bovina; Sigma A4503) por 40 minutos a temperatura ambiente em agitação. Após tal fixação, anticorpos de colágeno tipo I (diluição 1:100; (*rabbit*) antibody Rockland (600.401.103-0.5) e colágeno tipo III (diluição 1:100; (*rabbit*) antibody -, Rockland 600-401-105-0.1) foram colocados nos diferentes poços nas concentrações, os anticorpos vimentina (utilizado 50 µL; Flex Monoclonal *mouse* anti-vimentina clone 9 - ready to use. Dako IR630) foram colocados após retirado o conteúdo de cada poço, então, as células foram incubadas “*overnight*” a 4°C. Após a incubação de 24 horas na geladeira foi realizada uma lavagem com DPBS e adicionada uma solução contendo anticorpo secundário

(DPBS + intercalante Hoechst, Thermo Fisher Scientific 33342, diluição 1:1000 + anticorpo secundário 1:1000). Para os anticorpos secundários para colágeno tipo I e III foi utilizado Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, A11008, já para o anticorpo secundário de vimentina foi utilizado R-phycoeritrina *got anti mouse* (Invitrogen P852), e DBPS e uma nova incubação em agitação na temperatura ambiente por 1 hora foi realizada. Após, foi realizada uma lavagem dos poços com DPBS e acrescido 100 µL para ser realizada a leitura utilizando ImageXpress – Molecular Devices. As células positivas e suas respectivas intensidades foram determinadas usando o software MetaXpress – Molecular Devices. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.6.2 Ensaio de tempo de duplicação celular (*doubling time*) de fibroblastos oriundo de NHF e VUF.

O tempo de uma duplicação celular foi calculado para se determinar o tempo de estímulos que as células receberão.

Em placas de 24 poços (Corning Costar 3524), 3 amostras de NHF e 3 amostras de VUF entre 2ª e 4ª amplificações foram semeados (aproximadamente 10×10^3 / poço) em triplicadas. Após a adesão, os fibroblastos foram mantidos em meio de cultura adequado. Nos momentos 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas foram desprendidos dos poços de cultura e contados em câmara hemocitométrica. Os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, Inc, USA)⁹⁸ e expressos em horas.

4.6.3 Determinação da concentração de ORC/colágeno associado ou não a prata por espectrofotometria com MTT

O MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é método colorimétrico rápido frequentemente utilizado para avaliar proliferação

celular e citotoxicidade⁹⁹. O ensaio se baseia na clivagem, realizada por mitocôndrias ativas, do sal amarelo tetrazólio para o composto formazan (cristais azuis/púrpura) em célula metabolicamente ativas. Com esse ensaio pretendemos determinar as concentrações de estímulo que interferiram na proliferação celular dos VUFs e NHF.

Em placas de 96 poços (Corning CLS 3599), foram semeados, em triplicata, NHF (aproximadamente 5×10^3 / poço), entre 2ª a 4ª amplificação, provenientes de 12 pacientes e VUF (aproximadamente $5 \times 5 \times 10^3$ /poço), entre 2ª a 4ª amplificação, provenientes de 12 pacientes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície de cada poço.

Após a adesão, os fibroblastos foram expostos às três concentrações de ORC/colágeno além do meio com solução D10 (controle). De acordo com Hart *et al.*²¹ (1 fragmento de 6mm de diâmetro da placa de ORC/colágeno é igual a 1,4 mg/mL desse material).

As soluções de ORC/colágeno (Promogran® - Systagenix M772028) foram preparadas dissolvendo-se fragmentos de ORC/colágeno em meio de cultura por 48 horas a 37°C. De acordo com Hart *et al.*²¹ 1 fragmento de 6mm de diâmetro da placa de ORC/colágeno é igual a 1,4 mg/mL desse material. Quatro concentrações de ORC/colágeno foram testadas: 1,4 mg/mL (1 fragmentos/mL – denominada **ORC1**), 2,8 mg/mL (2 fragmentos/mL – denominada **ORC2**), 4,2 mg/mL (3 fragmentos/mL- denominada **ORC3**) e 8,4 mg/mL (6 fragmentos/mL - denominada **ORC6**).

O Promogran Prima®; possui prata (concentração total de 1%, formulado com adição de prata 0,25%) e concentração de colágeno e ORC superior ao Promogran® permitindo maior capacidade de absorção de exsudato⁸⁴. Assim, as soluções de ORC/colágeno com prata (Promogran Prima® - Systagenix; PS2028) foram preparadas dissolvendo-se fragmentos de ORC/colágeno com prata em meio de cultura por 48 horas a 37°C. Também foram testadas quatro concentrações de ORC/colágeno com prata: 1,4 mg/mL (0,5 fragmentos/mL – denominada **ORC1+Ag**), 2,8 mg/mL (1 fragmentos/mL – denominada **ORC2+Ag**), 4,2 mg/mL (1,5 fragmentos/mL- denominada **ORC3+Ag**) e 8,4 mg/mL (3 fragmentos/mL - denominada **ORC6+Ag**)⁸⁴.

Após, respectivamente, 24, 48, 72 e 96 horas os poços tiveram o seu meio de cultura aspirado, após foi adicionado 200µL de solução de MTT (composta por 10% de solução de MTT de 5mg/mL – thiazolyl blue terazolium, Sigma C2674 e 90% de DMEM). Após a adição da solução de MTT, as placas foram incubadas por 3 horas em estufa a 37⁰C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram novamente lavadas com 100 µL de DMSO (Sigma-Aldrich D5879) e incubadas por 30 minutos. As placas foram agitadas por 1 minuto e após a absorbância foi medida em leitor automático de placas de cultura (Promega) com comprimento de onda de 560 nm, e filtro de referência de 560 nm.

Os poços com meio de cultura, sem células, foram considerados como *background* e o seu valor descontado dos valores obtidos para as demais amostras.

4.7 Ensaios de interação VUFs – ORC/colágeno/Ag

4.7.1 Proliferação dos VUFs expostos a ORC/colágeno com e sem adição de prata.

Após os ensaios para escolha da concentração de ORC/colágeno com e sem adição de prata, foi avaliada a proliferação utilizando-se células oriundas de pele normal e úlcera venosa expostas ao meio padrão (D10), à ORC/colágeno de 2,8 mg/mL (**ORC2**) e ORC/colágeno e prata 4,2 mg/mL (**ORC3+Ag**) no momento de 72 horas. Para tanto, seguindo a metodologia do ensaio anterior (4.6.2) utilizando VUF proveniente de 12 pacientes. Os resultados foram expressos em absorbância.

4.7.2 Síntese de metaloproteínases, inibidores tissulares de metaloproteínases e fatores de crescimento nos VUFs.

Nesse ensaio pretendeu-se avaliar o efeito do estímulo ORC/colágeno com e sem a adição de prata quanto síntese de MMPs e TIMPs mediadoras do reparo tecidual.

Em placas multipoços de 24 poços foram semeados, em triplicata VUF oriundos de leito de úlceras venosas (n=8), na entre a 2ª e 4ª amplificação. Após adesão celular as células foram expostas ou não a ORC2 ou ORC3+Ag.

Após 72 horas os respectivos sobrenadantes foram coletados, centrifugados (1.500 rpm) sob refrigeração por 5 minutos e congelados de -4°C em freezer -80°C para posteriormente serem utilizados nos ensaio multiplex.

Foram analisados os meios de cultura, por nós denominados “sobrenadantes” dos seguintes estímulos: **D10; ORC2 e ORC3+Ag.**

MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP1, TIMP 2, TIMP 3, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3, presentes nesses sobrenadantes foram avaliadas pelo método de imunoensaio *Multiplex bead-based* (Millipore, MA, USA) conforme protocolo do fabricante.

Foi realizada contagem de proteína total presente em cada poço para realizar o ajuste dos valores encontrados de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP1, TIMP 2, TIMP 3, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 para 1pg/mL de proteína. Assim, após coleta do sobrenadante foi realizada lavagem de cada poço com PBS, adicionado 1000 μ L de solução de NaOH 0,5 M, coletado e congelada a solução para posteriormente ser analisada em espectrômetro 280 λ , os resultados foram expressos nesse espectrômetro em mg/mL. Para a expressão do resultado da quantidade de proteína total de cada poço foi feita a conversão dos resultados de mg/mL para pg/mL. Os resultados de MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP1, TIMP 2, TIMP 3, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 do imunoensaio *Multiplex bead-based* foram expressos em pg/mL, assim, foi realizada a correção para encontrar a quantidade de síntese de citocinas analisadas (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10, MMP-13, TIMP1,

TIMP 2, TIMP 3, TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3). Os resultados foram expressos em pg/mL da citocina presente em 1 pg/mL de proteína.

4.7.3. Síntese de colágeno tipo I e colágeno tipo III nos VUFs.

Para se avaliar a interferência dos estímulos (ORC2 e ORC3+Ag) nos VUFs foi realizado ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de colágeno tipo I e colágeno tipo III.

Em microplacas pretas de fundo chato de 96 poços (Corning 3599), foram semeados, em triplicata, VUF (aproximadamente 4×10^3 / poço), entre 2ª e 4ª amplificação, provenientes de 3 pacientes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície de cada poço. Após a adesão, os fibroblastos foram expostos por 72 horas à **ORC2, ORC3+Ag** e meio com solução **D10** (controle). A seguir, as mesmas etapas do ensaio 4.6.1 foram realizadas sendo utilizado os anticorpos de colágeno tipo I (diluição 1:100; (rabbit) antibody Rockland (600.401.103-0.5) e colágeno III (diluição 1:100; (rabbit) antibody -, Rockland 600-401-105-0.1) e os anticorpos secundários para colágeno tipo I e III, diluição 1:1000 (Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, A11008) Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.7.4. Síntese de vimentina dos VUFs após estímulo com ORC2 e ORC3+Ag.

Para se avaliar se a exposição aos estímulos ORC2 e ORC3+Ag alterou características celulares de VUFs foi realizado ensaio de imunofluorescência indireta para detecção de vimentina.

Em microplacas pretas de fundo chato de 96 poços (Corning 3603), foram semeados, em triplicata, VUF (aproximadamente 4×10^3 / poço), entre 2ª e 4ª amplificação, provenientes de 3 pacientes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície de cada poço. Após a adesão, os fibroblastos foram expostos por 72 horas ao meio com solução ORC2 e ORC3+Ag. A seguir, as mesmas etapas do ensaio 4.6.1 foram realizadas sendo utilizado os anticorpos vimentina (utilizado 50 uL; Flex Monoclonal mouse anti-vimentina clone 9 - ready to use. Dako IR630) e o anticorpo secundário de vimentina diluição 1:1000 foi utilizado R-phycoeritrina got anti mouse (Invitrogen P852). Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.8 Análises estatísticas

Foi utilizada a planilha eletrônica MS- Excel (*Microsoft- Office, Microsoft, INC*2013) para compilação e organização dos dados.

Para os resultados do ensaio de *doubling time* (4.6.2) foi calculada a média das triplicatas e os dados inseridos no software GraphPad Prism 7 *software* (*GraphPad Software, Inc, USA*) utilizando-se as funções regressão linear e não-linear.

Para os resultados de caracterização dos VUFs (4.6.1), determinação da concentração de ORC/colágeno associado ou não à prata (4.6.3) e ensaios de interação dos VUFs – estímulo (4.7) foi utilizado o pacote estatístico IBM SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), em sua versão 24.0 (IBM, USA). Esses resultados foram expressos em média e desvio padrão no caso de variáveis numéricas. Com base nos resultados decidiu-se pela utilização do teste de Wilcoxon pareado (Wilcoxon *signed-ranktest*) para a comparação entre as medidas efetuadas antes e depois do estímulo e demonstrado por Z. Foram consideradas apenas as medidas finais de cada série temporal de tratamento. Em todos os casos, foi considerada significância estatística para valores de $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia celular

A morfologia dos NHFs e VUFs esta demonstrada na **Figura 3**.

Figura 3 – Imagem representativa de (a) NHF (normal human fibroblasts); (b) VUF (venous ulcer fibroblasts). MOC 100x.

5.2 Ensaio Preliminares

5.2.1 Caracterização dos VUFs quanto à síntese de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III.

Após cultivo celular sem qualquer adição de estímulo, verificou-se a positividade na fluorescência de sinalização para vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III como apresentado na **Figura 4**.

Figura 4 – Imagem representativa da fluorescência da sinalização de vimentina (a), colágeno tipo I (b) e colágeno tipo III (c) nos VUFs após 72 horas de cultivo em meio padrão (D10), 100 µm.

5.2.2 Ensaio de tempo de duplicação celular (*doubling time*) de fibroblastos oriundo de pele normal e úlcera venosa.

O tempo de duplicação de NHF foi de 52 ± 11 horas enquanto para VUF o resultado foi 62 ± 8 horas, assim, determinou-se 72 horas como tempo de estímulo suficiente para uma duplicação celular.

5.2.3 Determinação da concentração de ORC/colágeno associado ou não a prata por espectrofotometria com MTT

Para NHF antes e após estímulo, interferência positiva na proliferação foi observada em ORC2 ($p < 0,05$) nos momentos 24, 48, 72 e 96 horas (**Tabela 1**). Quanto aos fibroblastos de úlcera venosa estimulados com ORC2, não foi observada diferença estatística do tratamento no momento 24 ($p = 0,373$) (**Tabela 2**).

Quando da adição de prata aos estímulos (ORC/colágeno/Ag) maior homogeneidade de resposta foi observada no estímulo ORC3+Ag ($p < 0,05$), demonstrando interferir positivamente nos VUFs nos tempos de 48, 72 e 96 horas (**Tabela 4**) e NHFs nos tempos 72 e 96 horas ($p < 0,05$) (**Tabela 3**).

Tabela 1 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos normais** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

Fibroblasto normal	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
24 horas	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,745	0,912	0,745	0,855	0,745	0,761	0,745	0,693
Mediana	0,780	0,925	0,780	0,850	0,780	0,790	0,780	0,765
Dp	0,165	0,52	0,165	0,86	0,165	0,119	0,165	0,210
Z*	-2,572		-2,182		-1,199		-0,457	
p valor	0,012		0,029		0,231		0,647	
48 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,756	0,820	0,756	0,887	0,756	0,837	0,756	0,725
Mediana	0,750	0,780	0,750	0,920	0,750	0,835	0,750	0,750
Dp	0,134	0,140	0,134	0,117	0,134	0,120	0,134	0,220
Z*	-0,140		-2,723		-1,852		-1,047	
p valor	0,889		0,006		0,064		0,295	

continua |

continuação

Tabela 1- Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos normais** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

72 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,813	1,031	0,813	1,094	0,813	0,991	0,813	0,846
Mediana	0,750	1,045	0,750	1,100	0,750	0,980	0,750	0,850
Dp	0,175	0,038	0,175	0,092	0,175	0,061	0,175	0,089
Z*	-2,243		-2,437		-2,194		-0,980	
p valor	0,025		0,015		0,028		0,327	
96 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,938	1,071	0,938	1,104	0,938	0,989	0,938	0,880
Mediana	0,920	1,110	0,920	1,090	0,920	0,970	0,920	0,890
Dp	0,110	0,959	0,110	0,083	0,110	0,760	0,110	0,083
Z*	-2,347		-2,669		-1,158		-1,172	
p valor	0,019		0,008		0,274		0,241	

* Teste de Wilcoxon Signed Ranks, nível de significância <0,05

Tabela 2 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos de úlcera venosa** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

Fibroblasto de úlcera venosa 24 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,905	0,935	0,905	0,957	0,905	0,912	0,905	0,873
Mediana	0,835	0,930	0,835	0,990	0,835	0,900	0,835	0,880
Dp	0,223	0,477	0,223	0,060	0,223	0,028	0,223	0,458
Z*	-0,652		-0,890		-0,119		-0,533	
p valor	0,515		0,373		0,906		0,594	
48 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,855	1,059	0,855	1,035	0,855	0,952	0,855	0,863
Mediana	0,710	1,050	0,710	1,010	0,710	0,935	0,710	0,870
Dp	0,252	0,097	0,252	0,045	0,252	0,787	0,252	0,055
Z*	-2,397		-2,449		-1,172		-0,866	
p valor	0,017		0,014		0,241		0,386	

continua

continuação

Tabela 2 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos de úlcera venosa** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

72 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	1,005	1,000	1,005	1,141	1,005	1,023	1,005	0,9775
Mediana	0,990	0,980	0,990	1,125	0,990	1,020	0,990	0,990
Dp	0,067	0,062	0,067	0,058	0,067	0,071	0,067	0,610
Z*	-0,170		-2,103		-0,280		-0,677	
p valor	0,865		0,036		0,779		0,498	
96 horas	ORC1		ORC2		ORC3		ORC6	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,998	1,016	0,998	1,115	0,998	0,970	0,998	1,013
Mediana	1,030	0,990	1,030	1,113	1,030	0,995	1,030	1,025
Dp	0,131	0,980	0,131	0,060	0,131	0,095	0,131	0,108
Z*	-1,067		-2,095		-0,491		-0,120	
p valor	0,286		0,036		0,624		0,905	

* Teste de Wilcoxon Signed Ranks, nível de significância <0,05

Tabela 3 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos normais** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno com prata** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

Fibroblastos normais	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
24 horas	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,745	0,861	0,745	0,853	0,745	0,785	0,745	0,849
Mediana	0,780	0,910	0,780	0,895	0,780	0,830	0,780	0,900
Dp	0,165	0,146	0,165	0,163	0,165	0,101	0,165	0,217
Z*	-2,581		-2,570		-1,777		-2,766	
p valor	0,010		0,010		0,076		0,006	
48 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,756	0,854	0,756	0,840	0,756	0,806	0,756	0,785
Mediana	0,750	0,810	0,750	0,880	0,750	0,835	0,750	0,840
Dp	0,134	0,193	0,134	0,206	0,134	0,144	0,134	0,219
Z*	-1,658		-1,811		-1,220		-0,545	
p valor	0,097		0,070		0,222		0,586	

continua

continuação

Tabela 3 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos normais** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno com prata** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

72 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,813	1,015	0,813	0,957	0,813	0,960	0,813	0,824
Mediana	0,750	1,010	0,750	1,020	0,750	0,960	0,750	0,830
Dp	0,175	0,207	0,175	0,202	0,175	0,077	0,175	0,159
Z*	-1,818		-1,505		-2,215		-0,511	
p valor	0,069		0,132		0,027		0,609	
96 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,938	1,043	0,938	1,010	0,938	1,104	0,938	0,786
Mediana	0,920	1,000	0,920	1,070	0,920	1,150	0,920	0,840
Dp	0,110	0,135	0,110	0,150	0,110	0,135	0,110	0,157
Z*	-1,780		-1,334		-2,243		-1,581	
p valor	0,075		0,182		0,025		0,114	

* Teste de Wilcoxon Signed Ranks, nível de significância <0,05

Tabela 4 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos de úlcera venosa** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno com prata** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

Fibroblastos de úlcera venosa 24 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,905	0,955	0,905	0,934	0,905	0,989	0,905	0,835
Mediana	0,835	0,935	0,835	0,940	0,835	0,925	0,835	0,820
Dp	0,223	0,089	0,223	0,121	0,223	0,151	0,223	0,081
Z*	-0,969		-1,274		-0,663		-0,714	
p valor	0,333		0,203		0,508		0,475	
48 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,855	1,00	0,855	1,032	0,855	1,069	0,855	0,789
Mediana	0,710	1,070	0,710	1,000	0,710	1,065	0,710	0,755
Dp	0,252	0,107	0,252	0,062	0,252	0,106	0,252	0,099
Z*	-0,919		-2,293		-2,499		-0,296	
p valor	0,358		0,022		0,012		0,767	

continua

continuação

Tabela 4 - Medidas de dispersão da absorbância, p valor e Z antes (meio padrão – D10) e após a exposição dos **fibroblastos de úlcera venosa** nas diferentes concentrações de **ORC/colágeno com prata** nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas

72 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	1,005	1,075	1,005	1,053	1,005	1,119	1,005	1,025
Mediana	0,990	1,080	0,990	1,050	0,990	1,110	0,990	1,030
Dp	0,067	0,674	0,067	0,057	0,067	0,066	0,067	0,032
Z*	-2,677		-1,424		-2,552		-0,665	
p valor	0,007		0,154		0,011		0,512	
96 horas	ORC1+Ag		ORC2+Ag		ORC3+Ag		ORC6+Ag	
	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
Média	0,998	0,973	0,998	1,026	0,998	1,137	0,998	0,890
Mediana	1,030	0,990	1,030	1,040	1,030	1,130	1,030	0,890
Dp	0,131	0,096	0,131	0,037	0,131	0,025	0,131	0,120
Z*	-0,510		-0,711		-2,201		-1,009	
p valor	0,610		0,477		0,028		0,313	

* Teste de Wilcoxon Signed Ranks, nível de significância <0,05

5.3 Ensaios de interação VUFs – ORC/colágeno/Ag

5.3.1 Proliferação dos VUF expostos à ORC/colágeno com e sem adição de prata.

Quando comparadas as médias das VUFs no meio controle (Média = 1,005; Dp = 0,067), meio contendo ORC2 (Média = 1,141; Dp = 0,058) e ORC3+Ag (Média = 1,119; Dp = 0,066) nas 72 horas, observamos que houve interferência positiva na proliferação celular, inferindo ausência de citotoxicidade e homogeneidade entre as multiplicações celulares (**Figuras 5 e Tabelas 2 e 4**).

Figura 5 – Medidas de dispersão das absorbâncias dos VUFs no momento 72 horas expostos ao meio controle (D10), ORC2 e ORC3+Ag, ($p < 0,05$)

5.3.2 Síntese de metaloproteínas, inibidores tissulares de metaloproteínas e fatores de crescimento.

5.3.2.1 Metaloproteínas

Na comparação individual dos estímulos ao controle notamos que:

Na **Tabela 5** nota-se que houve interferência da síntese de MMP1 nos VUFs após 72 horas nos meios ORC3+Ag em relação ao meio controle ($p < 0,05$). Ao ser observada a média de MMP1 após a exposição à ORC3+Ag (Média = $1807,385 \times 10^{-7}$; Dp = $1478,420 \times 10^{-7}$) nota-se um aumento da produção dessa citocina em relação aos VUFs expostos ao meio controle, no entanto, não houve interferência da ORC2 (Média = $909,567 \times 10^{-7}$; Dp = $701,882 \times 10^{-7}$) se comparado ao meio controle (Média = $953,937 \times 10^{-7}$; Dp = $1198,900 \times 10^{-7}$) para produção de MMP1 ($p > 0,05$).

Tabela 5- Comparação da síntese de **MMP1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	953,937	909,565	953,937	1807,385
Mediana	499,935	792,760	499,935	1213,365
Dp	1198,900	701,882	1198,900	1478,420
Z	-0,629		-3,457	
p- Valor*	0,530		0,001	
Interferência do tratamento	Não		Sim	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Na **Tabela 6** observa-se que não houve interferência da síntese de MMP2 nos VUFs após 72 horas nos meios ORC 2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle ($p > 0.05$).

Tabela 6 - Comparação da síntese de **MMP2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	3898,323	4214,196	3898,323	2949,196
Mediana	3332,600	3928,525	3332,600	2358,170
Dp	2359,415	2257,039	2359,415	1806,158
Z	-0,543		-1,486	
p- Valor*	0,587		0,137	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na **Tabela 7** pode-se observar que não houve interferência da síntese de MMP3 nos VUFs após 72 horas nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle ($p>0.05$).

Tabela 7 - Comparação da síntese de **MMP3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	1603,172	1523,614	1603,172	2371,754
Mediana	1039,785	1252,730	1039,785	412,175
Dp	1578,378	1148,076	1578,378	4275,271
Z	-0,257		-0,182	
p- Valor*	0,797		0,855	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Quanto à MMP10, a **Tabela 8** apresenta que não houve interferência da síntese dessa metaloproteinase nos VUFs após 72 horas nos meios ORC 2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle ($p>0.05$).

Tabela 8 - Comparação da síntese de **MMP10** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	9,135	11,334	9,135	6,111
Mediana	6,205	9,150	6,205	2,330
Dp	7,495	7,780	7,495	6,570
Z	-1,257		-1,280	
p- Valor*	0,209		0,199	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

A **Tabela 9** mostra que não houve interferência da síntese de MMP13 nos VUFs após 72 horas nos meios ORC 2 em relação ao meio controle ($p > 0.05$). Porém, se comparado o meio controle (Média = $2,950 \times 10^{-7}$; Dp = $1,804 \times 10^{-7}$) e ORC3+Ag (Média = $1,812 \times 10^{-7}$; Dp = $0,847 \times 10^{-7}$), houve uma diminuição da síntese de MMP13 ($p < 0.05$).

Tabela 9 - Comparação da síntese de **MMP13** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição nos meios ORC2 e ORC3+Ag em relação ao controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	2,950	7,135	2,950	1,812
Mediana	2,510	2,280	2,510	1,610
Dp	1,804	12,511	1,804	0,847
Z	-0,314		-2,443	
p- Valor*	0,753		0,015	
Interferência do tratamento	Não		Sim	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Ao confrontarmos os resultados obtidos entre os estímulos ORC2 e ORC3+Ag pudemos observar que:

Para MMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio com ORC2 (Média = $909,564 \times 10^{-7}$; Dp = $701,882 \times 10^{-7}$) em relação à ORC3+Ag (Média = $1807,385 \times 10^{-7}$; Dp = $1478,420 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que o meio com ORC3+Ag interferiu positivamente ($p < 0.05$) na produção dessa citocina (Tabela 10).

Tabela 10 - Comparação da síntese de **MMP1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	909,564	1807,385
Mediana	792,760	1213,365
Dp	701,882	1478,420
Z		-3,286
p- Valor*		0,001
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Para MMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio com ORC2 (Média = $4214,196 \times 10^{-7}$; Dp = $2257,039 \times 10^{-7}$) em relação à ORC3+Ag (Média = $2949,196 \times 10^{-7}$; Dp = $1806,158 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que o meio com ORC3+Ag interferiu negativamente ($p < 0,05$) na produção dessa citocina (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação da síntese de **MMP2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	4214,196	2949,196
Mediana	3928,170	2358,170
Dp	2257,039	1806,158
Z		-2,257
p- Valor*		0,024
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de MMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio com ORC2 em relação à ORC3+Ag foi demonstrado que o meio com ORC3+Ag não interferiu ($p > 0,05$) na produção dessa protease (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Comparação da síntese de **MMP3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	1523,614	2371,754
Mediana	1252,730	412,175
Dp	1148,076	4275,271
Z		-0,857
p- Valor*		0,391
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de MMP10 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio com ORC2 (Média = $11,334 \times 10^{-7}$; Dp = $7,780 \times 10^{-7}$) em relação à ORC3+Ag (Média = $6,111 \times 10^{-7}$; Dp = $6,570 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que o meio com ORC3+Ag interferiu negativamente ($p < 0,05$) na produção dessa citocina (**Tabela 13**).

Tabela 13. Comparação da síntese de **MMP10** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	11,334	6,111
Mediana	9,150	2,330
Dp	7,780	6,570
Z		-2,714
p- Valor*		0,007
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de MMP13 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio com ORC2 em relação à ORC3+Ag foi demonstrado que o meio com ORC3+Ag não interferiu ($p>0,05$) na produção dessa protease (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Comparação da síntese de **MMP13** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	7,135	1,812
Mediana	2,280	1,610
Dp	12,511	0,847
Z		-1,829
p- Valor*		0,067
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

5.3.2.2 Inibidores de metaloproteínases

Na comparação individual dos estímulos ao controle notamos que:

Na comparação da síntese de TIMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio controle em relação à ORC2 e ORC3+Ag foi demonstrado que os meios estudados não interferiram ($p > 0,05$) na produção desse inibidor de protease (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Comparação da síntese de **TIMP1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	2422,509	2662,646	2422,509	1963,367
Mediana	2303,650	2254,015	1658,215	1658,215
Dp	1163,007	1188,146	1163,007	1144,168
Z	-0,829		-1,857	
p- Valor*	0,407		0,063	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Na comparação da síntese de TIMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio controle (Média = $745,001 \times 10^{-7}$; Dp = $399,166 \times 10^{-7}$) em relação à ORC2 e ORC3+Ag (Média = $449,420 \times 10^{-7}$; Dp = $213,917 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que somente o meio ORC3+Ag interferiu negativamente ($p < 0,05$) na produção dessa citocina (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Comparação da síntese de **TIMP2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	745,001	617,354	745,001	449,420
Mediana	708,515	576,060	708,515	410,750
Dp	399,166	299,399	399,166	213,917
Z	-1,371		-2,743	
p- Valor*	0,170		0,006	
Interferência do tratamento	Não		Sim	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de TIMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio controle (Média = $768,659 \times 10^{-7}$; Dp = $487,782 \times 10^{-7}$) em relação à ORC2 e ORC3+Ag (Média = $115,496 \times 10^{-7}$; Dp = $138,220 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que o meio ORC3+Ag interferiu negativamente na produção dessa citocina (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Comparação da síntese de **TIMP3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	768,659	1016,730	768,659	115,496
Mediana	697,890	813,140	697,890	75,425
Dp	487,782	1066,660	487,782	138,220
Z	-1,600		-4,143	
p- Valor*	0,110		0,000	
Interferência do tratamento	Não		Sim	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de TIMP1 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio ORC2 (Média = $2662,646 \times 10^{-7}$; Dp = $1188,146 \times 10^{-7}$) em relação ORC3+Ag (Média = $1963,367 \times 10^{-7}$; Dp = $1144,168 \times 10^{-7}$) foi demonstrado

que houve interferência negativa ($p < 0,05$) na produção dessa citocina no meio ORC3+Ag (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Comparação da síntese de **TIMP1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	2662,646	1963,367
Mediana	2254,015	1658,215
Dp	1188,146	1144,168
Z		-2,486
p- Valor*		0,013
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Na comparação da síntese de TIMP2 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio ORC2 (Média = $617,354 \times 10^{-7}$; Dp = $299,399 \times 10^{-7}$) em relação ORC3+Ag (Média = $449,420 \times 10^{-7}$; Dp = $213,971 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que houve interferência negativa ($p < 0,05$) na produção dessa citocina no meio ORC3+Ag (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Comparação da síntese de **TIMP2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	617,354	449,420
Mediana	576,060	410,750
Dp	299,399	213,971
Z		-2,600
p- Valor*		0,009
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Na comparação da síntese de TIMP3 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio ORC2 (Média = $1016,730 \times 10^{-7}$; Dp = $1066,660 \times 10^{-7}$) em relação ORC3+Ag (Média = $115,496 \times 10^{-7}$; Dp = $138,220 \times 10^{-7}$) foi demonstrado que houve interferência negativa ($p < 0,05$) na produção dessa inibidora de protease no meio ORC3+Ag (**Tabela 20**).

Tabela 20. Comparação da síntese de **TIMP3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	1016,730	115,496
Mediana	813,140	75,425
Dp	1066,660	138,220
Z		-4,286
p- Valor*		0,000
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

5.3.2.3 Fator de crescimento transformador beta β 1, 2 e 3

Comparando a síntese de TGF β 1 do meio controle em relação ao meio contendo ORC2 e ORC3+Ag não houve interferência do tratamento ($p > 0,05$) (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Comparação da síntese de **TGFβ1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	135,116	122,760	135,116	125,939
Mediana	108,925	124,745	108,925	120,745
Dp	116,109	58,855	116,109	49,577
Z	-0,229		-0,371	
p- Valor*	0,819		0,710	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de TGFβ2 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio controle em relação à ORC2 e ORC3+Ag foi demonstrado que não houve interferência dos meios na produção desse fator de crescimento ($p>0,05$) (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Comparação da síntese de **TGFβ2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	0,421	0,387	0,421	0,456
Mediana	0,345	0,360	0,345	0,435
Dp	0,338	0,205	0,338	0,161
Z	-0,014		-0,857	
p- Valor*	0,989		0,391	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação da síntese de TGFβ3 dos fibroblastos de úlcera venosa no meio controle em relação à ORC2 e ORC3+Ag foi demonstrado que não houve interferência dos meios na produção desse fator de crescimento ($p>0,05$) (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Comparação da síntese de **TGFβ3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	69,810	61,181	69,810	69,327
Mediana	55,910	54,370	55,910	68,345
Dp	56,594	30,573	56,594	27,149
Z	-0,571		-0,600	
p- Valor*	0,568		0,549	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Na comparação dos estímulos ORC2 e ORC3+Ag pudemos observar que:

Na síntese de TGF β 1 dos fibroblastos de úlcera venosa nos meios ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag foi demonstrado que não houve interferência do meio na síntese desse fator de crescimento ($p>0,05$) (**Tabela 24**).

Tabela 24 - Comparação da síntese de **TGFβ1** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	122,760	125,939
Mediana	124,745	120,610
Dp	58,855	49,577
Z	-0,171	
p- Valor*	0,864	
Interferência do tratamento	Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Quando comparada a produção de TGFβ2 nos meios ORC2 e ORC3+Ag foi evidenciado que os meios não afetaram a síntese desse fator de crescimento ($p>0,05$) (**Tabela 25**).

Tabela 25 - Comparação da síntese de **TGFβ2** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	0,387	0,456
Mediana	0,360	0,435
Dp	0,205	0,161
Z		-1,538
p- Valor*		0,124
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

Quando comparada a produção de TGFβ3 nos meios ORC2 e ORC3+Ag foi evidenciado que os meios não afetaram a síntese desse fator de crescimento ($p>0,05$) (**Tabela 26**).

Tabela 26 - Comparação da síntese de **TGFβ3** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, (10^{-7} pg/mL por pg/mL de proteína)

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	69,810	69,327
Mediana	55,910	68,345
Dp	56,594	27,149
Z		-1,057
p- Valor*		0,290
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

5.3.3 Síntese de colágeno tipo I e colágeno tipo III

Quando comparada a produção de colágeno tipo I nos meios contendo ORC2 e ORC3+Ag ao meio controle foi evidenciado que os estímulos não afetaram a síntese dessa proteína ($p>0,05$) (**Tabela 27**).

Tabela 27 - Comparação da síntese de **colágeno tipo I** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	196,130	210,452	196,130	205,132
Mediana	174,580	201,280	174,580	198,440
Dp	39,862	33,744	39,862	44,436
Z	-1,718		-1,690	
p- Valor*	0,086		0,091	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Quando comparados os estímulos ORC2 e ORC3+Ag também ficou evidenciado que não houve interferência do tratamento ($p>0,05$) (**Tabela 28**).

Tabela 28 - Comparação da síntese de **colágeno tipo I** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	210,452	205,132
Mediana	201,280	198,440
Dp	33,744	44,436
Z		-1,690
p- Valor*		0,091
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

A **Figura 6** mostra síntese do colágeno tipo I nos VUFs após 72 horas de cultivo no meio controle, ORC2 e ORC3+Ag.

Figura 6 – Imagem representativa da fluorescência do colágeno tipo I dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 µm

Quando comparada a produção de colágeno tipo III entre controle e estímulos ORC2 e ORC3+Ag foi evidenciado que os estímulos não afetaram a síntese dessa proteína ($p>0,05$) (**Tabela 29**).

Tabela 29 - Comparação da síntese de **colágeno tipo III** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	291,337	282,397	291,337	307,350
Mediana	280,950	275,505	280,950	292,170
Dp	36,206	47,452	36,206	57,846
Z	-0,700		-1,400	
p- Valor*	0,484		0,161	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Quando comparada a produção de colágeno tipo III nos meios ORC2 (Média = $282,397 \times 10^{-7}$; Dp = $47,452 \times 10^{-7}$) e ORC3+Ag (Média = $307,350 \times 10^{-7}$; Dp = $57,846 \times 10^{-7}$) foi evidenciado que o meio contendo ORC3+Ag interferiu positivamente na síntese dessa proteína ($p<0,05$) (**Tabela 30**).

Tabela 30 - Comparação da síntese de **colágeno tipo III** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	282,397	307,350
Mediana	275,505	292,170
Dp	47,452	57,846
Z		-2,366
p- Valor*		0,018
Interferência do tratamento		Sim

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

A **Figura 7** é uma imagem representativa da síntese do colágeno tipo III nos VUFs após 72 horas de cultivo no meio controle, ORC2 e ORC3+Ag.

Figura 7 – Imagem representativa da fluorescência de colágeno tipo III dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 µm.

5.3.4 Síntese de vimentina dos VUFs após estímulo com ORC2 e ORC3+Ag

A **Tabela 31** pode-se observar que não houve interferência da síntese de vimentina na comparação dos VUFs no meio controle em relação à ORC2 e ORC3+Ag ($p>0,05$).

Tabela 31 - Síntese de **vimentina** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 e ORC3+Ag em relação ao meio controle (D10), em intensidade de fluorescência

	D10 X ORC2		D10 X ORC3+Ag	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
Média	280,080	286,347	280,080	256,386
Mediana	276,400	301,140	276,400	269,440
Dp	43,474	33,035	43,474	101,964
Z	-0,533		-0,700	
p- Valor*	0,594		0,484	
Interferência do tratamento	Não		Não	

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância $< 0,05$.

Assim como na **Tabela 32** vê-se que não houve interferência da síntese de vimentina na comparação dos VUFs no meio ORC2 em relação à ORC3+Ag ($p>0,05$).

Tabela 32 - Síntese de **vimentina** dos fibroblastos de úlcera venosa após 72 horas de exposição no meio com ORC2 em relação ao meio com ORC3+Ag, em intensidade de fluorescência

	ORC2 X ORC3+Ag	
	ORC2	ORC3+Ag
Média	286,347	256,386
Mediana	301,140	269,440
Dp	33,035	101,964
Z		-0,280
p- Valor*		0,779
Interferência do tratamento		Não

* Correlação de Wilcoxon, nível de significância < 0,05.

A **Figura 8** é uma imagem representativa da síntese do vimentina nos VUFs após 72 horas de cultivo no meio controle, ORC2 e ORC3+Ag.

Figura 8 – Imagem representativa da fluorescência de vimentina dos VUFs expostos aos meios controle (a), ORC2 (b) e ORC3+Ag (c) após 72 horas, 100 μm.

6 DISCUSSÃO

Úlceras crônicas de membros inferiores decorrem de diversas etiologias, dentre essas, a úlcera de origem venosa acomete 1% da população mundial e corresponde a 75% de todas as úlceras crônicas²⁷. Estudos evidenciaram falhas no processo de reparo tecidual levando à cronicidade dessas lesões⁶⁻⁸. Novas terapêuticas têm sido desenvolvidas. Curativos que interagem com o meio da ferida conseguindo alterar seu microambiente ganharam destaque, dentre esses, a literatura tem dado ênfase à celulose oxidada regenerada (oxidized regenerated cellulose - ORC) associada ao colágeno^{18,30,74,75}.

A literatura científica descreve que ORC/colágeno estimula proliferação de fibroblastos, diminui concentração de MMPs no microambiente da ferida, evita degradação de fatores de crescimento e ainda quando associada à prata agrega a característica de diminuir a proliferação de microrganismos e evitar infecção⁸⁴. Contudo, ainda há lacunas quanto a interferência da ORC/colágeno, associada ou não à prata, no componente celular presente no leito de úlceras crônica²⁵, assim, em nosso estudo pretendemos avaliar a ação *in vitro* dessas substâncias em fibroblastos oriundos de úlcera venosa, buscando elucidar efeitos desse curativo nos processos celulares e consequentemente no microambiente da ferida.

Para tanto, células provenientes de úlceras venosas e pele normal não-cicatricial, foram cultivadas. Existem, na literatura, diversas técnicas de obtenção celular, entretanto, no presente estudo optou-se por padronizar a técnica de obtenção dos NHF e VUF por digestão enzimática da matriz extracelular com collagenase^{100,101}.

Uma vez cultivados observou-se na microscopia óptica que fibroblastos provenientes de pele normal se diferenciam quanto à morfologia quando comparados aos fibroblastos provenientes de tecido de úlcera venosa (item 5.1; Figura 3). Tais achados são confirmados pelo estudo de Stanley *et al*¹⁰² que evidencia que os fibroblastos oriundos de pele normal apresentam formato afunilado, regular e com maior índice de confluência celular na placa de cultura; fibroblastos oriundos de úlcera venosa apresentam forma irregular sendo poligonal e alargado com núcleo com características não uniforme e menor taxa de confluência.

Uma vez obtidas, as células foram caracterizadas para confirmação se realmente tratava-se de fibroblastos (item 4.6.1; Figura 4). Tanto vimentina, quanto colágeno tipo I e tipo III são proteínas produzidas por fibroblastos^{46,97}. Em nossas amostras as três proteínas estavam expressas (item 5.2.1).

Para determinarmos qual o melhor tempo de exposição celular aos diferentes estímulos, calculamos o tempo de duplicação celular (*doubling time*) (item 4.6.2). Os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism 7* e, assim, determinamos que 72hs de exposição seriam suficientes para que ocorresse uma duplicação celular (item 5.2.2).

Os produtos comerciais Pormogran® (ORC/colágeno) e Promogran Prima® (ORC/colágeno/prata) se diferem na sua composição tanto pela presença da prata quanto pela concentração de ORC/colágeno⁸⁴, assim, foi necessário determinarmos qual(uais) a(s) concentração(ões) de ORC/colágeno com e sem prata onde houvesse maior homogeneidade de proliferação celular (item 4.6.3).

O presente estudo demonstrou que as concentrações de 2.8 mg/mL (ORC2) e 4.2 mg/mL (ORC3+Ag) apresentaram maior homogeneidade de resposta ($p < 0,05$) (Tabelas 1 a 4). Nossos resultados concordam com Hart *et al.*²¹ na avaliação da interferência de ORC/colágeno em NHF.

Não há na literatura dados descritivos de proliferação de fibroblastos na presença de ORC/colágeno associado à prata. Em nossos ensaios com NHFs e VUFs maior homogeneidade de interferência positiva foi observada no estímulo ORC3+Ag ($p < 0,05$) (item 5.2.3; Tabela 1 a 4).

Após estabelecidas as concentrações dos estímulos e o tempo de exposição, foram realizados os ensaios de interação entre VUFs e ORC/colágeno com e sem adição de prata (item 4.7). Os produtos comerciais Promogran® e Promogran Prisma®, são apresentados como matrizes moduladoras de proteases, gerando microambiente propício a cicatrização de feridas⁸⁴. Assim, não avaliamos qualquer possível interferência dos estímulos em NHFs dado que esses fibroblastos são morfofuncionalmente diferentes (item 5.1; Figura 3).

Nesse ensaio foi avaliada a proliferação dos VUFs expostos às concentrações padronizadas (item 4.7.1). Como resultado, foi observada discreta diferença da média de absorbância dos VUFs nos meios ORC2 (Média = 1,141; Dp = 0,058) e ORC3+Ag (Média = 1,119; Dp = 0,066) demonstrando homogeneidade de proliferação entre ORC2 e ORC3+Ag no momento das 72 horas (Tabelas 2 e 4; Figura 5). Não há na literatura dados semelhantes com os quais pudéssemos confrontar nossos achados.

Para a verificação da síntese de MMPs, TIMPs e TGF β utilizamos o método de imunoensaio *Multiplex bead-based* (item 4.7.2).

A tecnologia *Multiplex bead-based* utiliza microesferas (*beads*) de poliestirenos corados com diferentes intensidades de vermelho e revestidos com anticorpos de captura específicos contra os analitos de interesse. Na leitura, utilizando-se LASER, as concentrações de *beads* corados magnetizados ou não são detectadas por sinal de fluorescência pelo equipamento Luminex®¹⁰³ e expressas em pg do analito/mL da solução analisada.

Em relação à produção de metaloproteinases, observamos aumento da síntese da MMP1 nas células expostas a ambos os estímulos ORC2 e ORC3+Ag (Tabelas 5 e 10). Não encontramos na literatura indexada dados para confrontar nossos resultados.

Histologicamente, as úlceras venosas apresentam tecido fibroso formando “cuffs” de fibrina ao redor dos capilares dificultando trocas gasosas, passagem de fatores de crescimento e plasma, estimulando células inflamatórias e favorecendo a presença de camada de exsudato fibroso com espécies de bactérias e debris³⁷. Esses “cuffs” são compostos por fibronectina, tenascina, laminina, fibrina, colágeno tipo I e III³⁸. O aumento da síntese de MMP1 encontrado em nossos ensaios, pode trazer benefícios dependendo das características e estágio de evolução da ferida, pois ao tentar controlar o excesso de deposição de fibrina pode haver, conseqüentemente, diminuição da formação dos “cuffs” possibilitando reorganização da MEC.

Nas sínteses de MMP2, MMP3, MMP10 e MMP13 não houve alterações estatisticamente significativas quando comparado o meio controle e ORC2 (Tabelas 6 a 9).

Em estudo onde biópsias de feridas de pés diabéticos foram analisadas quanto à produção de MMP2 e MMP13 foi demonstrado não haver diferença dos pacientes tratados com ORC/colágeno e com o tratamento convencional¹⁰⁴. Apesar desse estudo abordar outro tipo de ferida crônica, tais achados vão de encontro aos nossos resultados, pois não houve alteração da síntese de MMP2 e MMP13 nos fibroblastos cultivados em ORC/colágeno.

Smeets *et al.*⁹⁴ e Cullen *et al.*⁸⁷ encontraram diminuição na quantidade de MMP2 nos exsudatos de feridas crônicas antes e após tratamento com ORC/colágeno sendo atribuída essa redução de concentração à capacidade da ORC/colágeno de se ligar às proteases e regular o microambiente. Essas publicações tiveram como objetivo avaliar a interferência do curativo no leito da ferida e não a influência celular na síntese de MMPs, diferindo, portanto, dos resultados do presente estudo (Tabela 6).

Ao avaliarmos os resultados comparativos entre os estímulos ORC2 e ORC3+Ag houve diminuição de síntese de MMP2 e MMP10 nos meios contendo prata (Tabelas 11 e 13). Quando observada a MMP13, houve uma interferência negativa estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente na comparação do meio controle e meio contendo ORC3+Ag (Tabelas 9 e 14). Assim, podemos inferir que a presença de prata na composição do curativo afeta a produção dessas MMPs nos fibroblastos de úlcera venosa, entretanto, esse elemento químico não interferiu estatisticamente ($p > 0,05$) na síntese na MMP 3 (Tabela 12).

Estudos vem demonstrando que a nanop prata possui a capacidade de diminuir a expressão de MMP2 apresentando ação anti-inflamatória^{105,106}, porém, não há na literatura estudos anteriores a esse que avaliassem a ação da prata iônica nos fibroblastos quanto à síntese das MMPs. O presente estudo demonstrou que esse tipo de prata, presente na composição do curativo, interferiu diminuindo a síntese de MMP2, MMP10 e MMP13 pelos fibroblastos de úlcera venosa o que nos permitiu inferir que prata iônica também possua ação anti-inflamatória.

As sínteses de TIMP1, TIMP2 e TIMP3 permaneceram inalteradas quando comparados meio controle e ORC2 (Tabelas 15 a 17), porém, na comparação entre meio controle e ORC3+Ag houve uma redução das sínteses

de TIMP2 e TIMP3 (Tabelas 15 a 17). Na comparação matemática entre ORC2 e ORC3+Ag houve diminuição de todos os tipos de TIMPs (Tabelas 18 a 20). Dessa forma, acreditamos que a interação ORC/colágeno e prata na composição do curativo interfere na síntese de TIMPs, porém, não há na literatura outros estudos que demonstrem tal achado.

O equilíbrio das MMPs e TIMPs é responsável pela degradação e deposição de MEC exercendo papel primordial na concretização do reparo tecidual. O controle da expressão dessas proteases e seus inibidores é essencial para a resolução da ferida sendo que concentrações elevadas por muito tempo de MMPs geram excessiva degradação da MEC levando à cronicidade da ferida⁴⁹. Esse equilíbrio entre MMP e TIMPs parece ir além da deposição de MEC, exercendo influência também nos processos biológicos de ativação de proteínas, incluindo citocinas e proteínas da superfície celular, alterando a sinalização de TGF β , influenciando no processo inflamatório, diferenciação de fibroblasto em miofibroblastos⁷⁰.

Nas úlceras venosas foi observada menor concentração de TIMP1, TIMP2 e TIMP3 dificultando a neutralização das proteases¹⁰⁷, também foi observado maior concentração de MMP1 e MMP3 e menor concentração de TIMP1 no exsudato de úlcera venosa se comparado com exsudatos de feridas crônicas¹⁰. No presente estudo, essa diminuição de TIMP1, TIMP2 e TIMP3 somente foi observada nos meios contendo prata. Essa interferência da ORC/colágeno/prata no equilíbrio entre as MMPs e TIMPs pode ser positiva no tratamento de feridas crônicas dependendo das condições e estágio de evolução da ferida

Em relação à TGF β 1, TGF β 2 e TGF β 3 não houve alteração da síntese em nenhuma das situações avaliadas (Tabelas 21 a 26). A ausência de estudos que demonstre a interferência da ORC/colágeno ou ORC/colágeno/prata na síntese de TGF β dificulta a comparação dos resultados, no entanto, é possível inferir que a manutenção do padrão de síntese desse fator de crescimento pode ser benéfico para o processo de reparo tecidual, pois, o aumento da síntese poderia gerar maior deposição de MEC e fibronectina no leito da ferida agravando o processo fibrótico patológico característico da patologia venosa.

Outros fatores avaliados nesse estudo foram as sínteses de colágeno tipo I e tipo III na presença dos diferentes estímulos (ensaio 4.7.3), sendo demonstrado que não houve alteração de produção de colágeno tipo I em nenhum estímulo estudado (Tabelas 27 e 28; Figura 6). A constância dos valores de colágeno tipo I foi esperada, visto que nossa avaliação foi feita em 72hs de exposição e fibroblastos na fase inflamatória crônica e no início da fase proliferativa não priorizam a produção desse colágeno.

Quanto a síntese de colágeno tipo III, os valores obtidos no meio com ORC3+Ag (Média = 307,350; Dp = 57,846) mostram-se discretamente maiores que a média do meio ORC2 (Média = 282,375 ; Dp= 47,453). O estímulo ORC2 mostra tendência inibitória, apesar de não ter sido encontrada relevância estatística em tal achado. Quanto à ORC3+Ag parece haver tendência de aumento na síntese dessa proteína, também sem respaldo matemático. Porém, a comparação matemática entre os estímulos ORC2 e ORC3+Ag confirma interferência positiva, estatisticamente significativa, na síntese do colágeno tipo III na presença de ORC3+Ag (Tabelas 29 e 30; Figura 7).

Kwan *et al.*¹⁰⁸ evidenciaram em lesões de ratos a interferência positiva da prata no metabolismo de colágeno propiciando maior expressão, formação de fibras mais organizadas e de maior força tênsil, resultando em melhor organização espacial de colágeno. Dessa forma, a adição adequada desse metal à composição de curativo, parece ser uma opção terapêutica importante para as úlceras venosas que apresentam diminuição de produção de colágeno e deposição excessiva de fibrina⁶⁻⁹.

Naik & Kowshik¹⁰⁹, em revisão de literatura, observam que a presença de prata pode ser benéfica ao corpo humano quando usada criteriosamente. Meta-análise publicada por Dissemond *et al.*¹¹⁰ que revisa a utilização de diversos curativos contendo prata na sua composição concluiu que a utilização desse metal, apesar de provocar controvérsias no meio científicos, é favorável ao reparo tecidual.

Assim, podemos inferir que a prata adicionada à ORC/colágeno além de atuar como agente antimicrobiano²² pode ter ação anti-inflamatória e parece exercer influência na produção de colágeno. Foi confirmado que *in vitro* a associação da prata à ORC/colágeno não agiu como fator citotóxico sugerindo

capacidade de alterar fatores metabólicos dos VUFs, podendo favorecer o reparo tecidual. No entanto, futuros estudos são necessários para elucidar qual interferência da prata no metabolismo do colágeno e no processo de reparo tecidual.

Quanto à síntese de vimentina (item 4.7.4), houve manutenção da concentração em todos os estímulos estudados (item 5.3.4; Tabelas 31 e 32; Figura 8). A vimentina é a principal proteína constituinte do fibroblasto atuando como integradora dos processos que ocorrem durante o reparo tecidual. Participa na proliferação dos fibroblastos, acúmulo de colágeno, diferenciação de queratinócitos e, portanto, reepitelização. Na ausência dessa proteína os processos celulares são inibidos interrompendo a regeneração tecidual^{111,112}. A constância da presença de vimentina no meio controle e nos diferentes estímulos mostra que não houve modificação na sinalização mediada pela vimentina em muitos processos essenciais para o reparo tecidual.

Nesse trabalho pudemos perceber que a ORC/colágeno interfere no metabolismo celular da MMP1 agregando outra propriedade àquela já confirmada por outros autores, de modificar o microambiente da ferida^{87,94}. Porém, quando acrescida prata na composição desse curativo, alterações metabólicas celulares adicionais com interferência em outras MMPs, TIMPs e colágeno tipo III agrega ao curativo outras características e indicações de uso.

Estudos *in vitro* possuem limitações em relação ao conhecimento dos fenômenos biológicos já que avaliam apenas um tipo celular dificultando a compreensão de demais interações celulares e metabólicas, assim, há necessidade da extensão desse estudo para elucidar mais fatores que envolvem a ORC/colágeno e ORC/colágeno/prata no processo de reparo tecidual.

7 CONCLUSÕES

A presença dos estímulos ORC/colágeno e ORC/colágeno/prata não apresentou citotoxicidade para VUFs e não modificou as suas características celulares.

A ORC/colágeno interferiu positivamente na síntese de MMP1, enquanto a associação de ORC/colágeno com prata interferiu negativamente na síntese de MMP2, MMP10, MMP13, TIMP1, TIMP 2 e TIMP3.

Não houve interferência da ORC/colágeno ou ORC/colágeno/prata na síntese de TGF β e colágeno tipo I, porém, pode-se inferir aumento da síntese de colágeno tipo III nos VUFs estimulados com ORC3+Ag.

8 ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo in vitro do comportamento de fibroblastos oriundos de úlcera venosa na presença de celulose oxidada regenerada e colágeno

Pesquisador: Cesar Isaac

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21868413.5.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 502.918

Data da Relatoria: 22/01/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa experimental in vitro, bem apresentado e sem qualquer problema de ordem ética.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a provável ação da celulose oxidada sobre fibroblastos no processo de reparação de úlceras varicosas crônicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos para os indivíduos quer do grupo controle (obtenção de fibroblastos normais de fragmentos de pele obtidos durante mamoplastia redutora) e do grupo doente (obtenção de fibroblastos do tecido de granulação retirado durante o tratamento das lesões ulcerosas).

Não haverá benefícios diretos para os indivíduos da pesquisa, entretanto, os resultados a serem obtidos poderão embasar mais uma opção terapêutica para as úlceras crônicas da pele.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa experimental, prospectivo. O mesmo é bem planejado e conta com o apoio de profissionais colaboradores e infraestrutura para a sua condução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os textos dos termos de consentimento livre e esclarecido para os indivíduos que fornecerão o

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 502.918

material cutâneo controle, assim como para os indivíduos com úlcera crônica estão adequados.

Recomendações:

Os pesquisadores enviaram a manifestação de colaboração/anuência do Serviço Multiusuário de Microscopia Eletrônica, conforme anteriormente solicitado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado sob o ponto de vista ético; sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 20 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

**ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para
paciente submetidos à mastoplastia**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO :.... M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO

Nº..... APTO:.....

BAIRRO:

CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo *in vitro* do comportamento de fibroblastos oriundos de úlcera venosa na presença de celulose oxidada regenerada e colágeno**

PESQUISADORES: **Dr.º César Issac** (cargo/função: Pesquisador Responsável, Médico, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas - Divisão de Cirurgia Plástica (LIM04) HC-FMUS e professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, CRM SP: 56.601) **Profª Dr.ª Viviane Fernandes de Carvalho** (cargo/função: Professora co-orientadora, Enfermeira, Assistente Técnico de Saúde da Diretoria Executiva do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, COREN-SP: 116.158) **Profº Dr.º Marcus Castro Ferreira** (cargo/função: Pesquisador orientador, Professor Titular da Faculdade de Medicina da USP responsável pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, CRM: 12.926), **Profª Dr.ª Suzana Beatriz Veríssimo de Melo** (cargo/função: bióloga, responsável pelo laboratório de fisiologia da inflamação – LIM-17 de Reumatologia) e **Júlia Teixeira Nicolosi** (cargo/função: Pesquisadora Executante, Enfermeira, Mestre em Enfermagem pela Universidade Guarulhos, COREN-SP: 92.171).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses.

Rubricas: Representante legal:_____

Pesquisador:_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para que você autorize a sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar os efeitos do curativo de celulose oxidada regenerada/colágeno.

Como você decidiu se submeter a uma cirurgia de mastoplastia com finalidade estética gostaríamos de solicitar a doação da pele retirada, que, nesses casos, é geralmente desprezada, porém, pode ter utilidade em estudos como o nosso que visa à obtenção de células da pele para testar no laboratório a ação da substância.

Somente a pele que seria descartada na sua cirurgia será recolhida e utilizada na pesquisa. Não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico da mastoplastia, que será realizado da forma proposta pelo seu cirurgião. Nenhum desconforto ou risco é possível uma vez que nada se altera na cirurgia. Apenas o destino da pele retirada será modificado.

Neste projeto não haverá benefício direto para o participante, pois se trata de estudo experimental para avaliar o comportamento das células presentes na pele do corpo humano. O benefício esperado com o estudo será o maior conhecimento da ação da substância celulose oxidada regenerada/colágeno sobre tais células. Dessa forma, essas informações poderão auxiliar os profissionais de saúde a conhecerem melhor a celulose oxidada regenerada/colágeno e utilizá-la para melhorar a assistência prestada no tratamento de feridas.

Caso você deseje e autorize doação do excedente de pele, necessitamos assine esse termo de consentimento livre e esclarecido. Nenhum outro procedimento em você será realizado.

A pesquisa será realizada em laboratório com o excedente de pele que você doou.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, Prof^o Dr.^o Marcus Castro Ferreira, Dr.^o Cesar Isaac, Dr.^a Viviane Fernandes de Carvalho e a Enf^a Júlia Teixeira Nicolosi, os quais poderão ser encontrados no Laboratório de Cultura de Células do LIM dentro da Faculdade de Medicina da USP localizado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 1216, Cerqueira César, Telefones: 11 3062-0415. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 17,18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Você possui o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Rubricas: Representante legal: _____

Pesquisador: _____

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:

“Estudo in vitro do comportamento de fibroblastos oriundos de úlcera venosa na presença de celulose oxidada regenerada e colágeno”

Eu discuti com um dos pesquisadores (Enf^a Júlia Teixeira Nicolosi, Dr Cesar Isaac, Dr.^a Viviane Fernandes de Carvalho, Prof^a Dr.^a Suzana Beatriz Veríssimo de Melo ou Prof^o Dr.^o Marcus Castro Ferreira) sobre a minha decisão em consentir a sua participação nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /
(para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador Data / /
(carimbo ou letra legível)

**ANEXO C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para
paciente submetidos ao curativo de úlcera venosa**

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO :... M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO
Nº..... APTO:.....
BAIRRO:
CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo *in vitro* do comportamento de fibroblastos oriundos de úlcera venosa na presença de celulose oxidada regenerada e colágeno**

PESQUISADORES: **Dr.º César Issac** (cargo/função: Pesquisador Responsável, Médico, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas - Divisão de Cirurgia Plástica (LIM04) HC-FMUS e professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, CRM SP: 56.601) **Profª Dr.ª Viviane Fernandes de Carvalho** (cargo/função: Professora co-orientadora, Enfermeira, Assistente Técnico de Saúde da Diretoria Executiva do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, COREN-SP: 116.158) **Profº Dr.º Marcus Castro Ferreira** (cargo/função: Pesquisador orientador, Professor Titular da Faculdade de Medicina da USP responsável pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, CRM: 12.926), **Profª Dr.ª Suzana Beatriz Veríssimo de Melo** (cargo/função: bióloga, responsável pelo laboratório de fisiologia da inflamação – LIM-17 de Reumatologia) e **Júlia Teixeira Nicolosi** (cargo/função: Pesquisadora Executante, Enfermeira, Mestre em Enfermagem pela Universidade Guarulhos, COREN-SP: 92.171).

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses.

Rubricas: Representante legal: _____ Pesquisador: _____
--

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para que você autorize a sua participação voluntária neste estudo que visa avaliar os efeitos do curativo de celulose oxidada regenerada/colágeno

Será necessário coletar uma amostra do leito da ferida da úlcera venosa (biópsia) com anestesia local e sem a necessidade de internação hospitalar. Isso será realizado durante o curativo que você rotineiramente se submete. A amostra terá 1,5 cm de tamanho para que no laboratório possam ser obtidas células necessárias para testar a ação da substância celulose oxidada regenerada/colágeno. Esse procedimento será realizado por cirurgião plástico membro da equipe de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Neste estudo não haverá benefício direto para o participante, pois se trata de estudo experimental para avaliar o comportamento das células presentes na pele do corpo humano. O benefício esperado com o estudo será o maior conhecimento da ação da substância celulose oxidada regenerada/colágeno sobre as células. Dessa forma, essas informações poderão auxiliar os profissionais de saúde a conhecerem melhor a celulose oxidada regenerada/colágeno e utilizá-la para melhorar a assistência prestada no tratamento de feridas.

Caso você deseje e autorize a doação de uma mínima porção de tecido da ferida, necessitamos assine esse termo de consentimento livre e esclarecido. Nenhum outro procedimento em você será realizado. A pesquisa será realizada em laboratório com a pele que você doou.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, Prof^o Dr.^o Marcus Castro Ferreira, Dr.^o Cesar Isaac, Dr.^a Viviane Fernandes de Carvalho e a Enf^a Júlia Teixeira Nicolosi, os quais poderão ser encontrados no Laboratório de Cultura de Células do LIM dentro da Faculdade de Medicina da USP localizado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 1216, Cerqueira César, Telefones: 11 3062-0415. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 17,18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Você possui o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Rubricas: Representante legal: _____

Pesquisador: _____

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:

“Estudo in vitro do comportamento de fibroblastos oriundos de úlcera venosa na presença de celulose oxidada regenerada e colágeno”

Eu discuti com um dos pesquisadores (Enf^a Júlia Teixeira Nicolosi, Dr Cesar Isaac, Dr.^a Viviane Fernandes de Carvalho, Prof^a Dr.^a Suzana Beatriz Veríssimo de Melo ou Prof^o Dr.^o Marcus Castro Ferreira) sobre a minha decisão em consentir a sua participação nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /
(para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador Data / /
(carimbo ou letra legível)

9 REFERÊNCIAS

1. Bergqvist D, Lindholm C, Nelzén O. Chronic leg ulcers: The impact of venous disease. *Journal of Vascular Surgery*. 1999;29(4):752-755.
2. Burton CS. Venous ulceration. *Clinical Materials*. 1991;8(3-4):203-208.
3. Fowkes FG, Evans CJ, Lee AJ. Prevalence and risk factors of chronic venous insufficiency. *Angiology*. 2001;52 Suppl 1:S5-15.
4. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic Venous Insufficiency. *Circulation*. 2005;111(18):2398-2409.
5. Bergan JJ, Schmid-Schönbein GW, Smith PDC, Nicolaides AN, Boisseau MR, Eklof B. Chronic Venous Disease. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(5):488-498.
6. Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet*. 1982;2(8292):243-245.
7. Coleridge Smith PD, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296(6638):1726-1727.
8. Falanga V, Eaglstein WH. The "trap" hypothesis of venous ulceration. *Lancet*. 1993;341(8851):1006-1008.
9. Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S, Tekoppele JM, van Els B, Smith A. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *Br J Surg*. 2008;95(3):319-325.
10. Subramaniam K, Pech CM, Stacey MC, Wallace HJ. Induction of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 in normal dermal fibroblasts by chronic venous leg ulcer wound fluid*. *Int Wound J*. 2008;5(1):79-86.
11. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, et al. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2006;31(3):306-310.
12. Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S, TeKoppele JM, van Els B, Smith A. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *British Journal of Surgery*. 2008;95(3):319-325.

13. Herrick SE, Ireland GW, Simon D, McCollum CN, Ferguson MW. Venous ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both normal and hypoxic conditions. *J Invest Dermatol*. 1996;106(1):187-193.
14. Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg*. 1998;28(5):876-883.
15. Hasan A, Murata H, Falabella A, et al. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor-beta 1. *J Dermatol Sci*. 1997;16(1):59-66.
16. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. *Wound Repair and Regeneration*. 2011;19(2):134-148.
17. Kähäri V-M, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*. 1997;6(5):199-213.
18. Morin RJ, Tomaselli NL. Interactive Dressings and Topical Agents. *Clinics in Plastic Surgery*. 2007;34(4):643-658.
19. Wollina U, Schmidt WD, Kronert C, Nelskamp C, Scheibe A, Fassler D. Some effects of a topical collagen-based matrix on the microcirculation and wound healing in patients with chronic venous leg ulcers: preliminary observations. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005;4(4):214-224.
20. Vin F, Teot L, Meaume S. The healing properties of Promogran in venous leg ulcers. *J Wound Care*. 2002;11(9):335-341.
21. Hart J, Silcock D, Gunnigle S, Cullen B, Light ND, Watt PW. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects in vitro on fibroblast biology and in vivo in a model of compromised healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(12):1557-1570.
22. Vermeulen H, van Hattem JM, Storm-Versloot MN, Ubbink DT. Topical silver for treating infected wounds. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2007(1):Cd005486.
23. Gottrup F, Cullen BM, Karlsmark T, Bischoff-Mikkelsen M, Nisbet L, Gibson MC. Randomized controlled trial on collagen/oxidized regenerated cellulose/silver treatment. *Wound Repair Regen*. 2013;21(2):216-225.
24. Wu S, Applewhite AJ, Niezgoda J, et al. Oxidized Regenerated Cellulose/Collagen Dressings: Review of Evidence and

- Recommendations. *Advances in Skin & Wound Care*. 2017;30(11 Suppl 1):S1-S18.
25. Westby MJ, Norman G, Dumville JC, Stubbs N, Cullum N. Protease-modulating matrix treatments for healing venous leg ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016;12:Cd011918.
 26. Mosti G, De Maeseneer M, Cavezzi A, et al. Society for vascular surgery and American Venous Forum Guidelines on the management of venous leg ulcers: The point of view of the International Union of Phlebology. *International Angiology*. 2015;34(3):202-218.
 27. Lal BK. Venous ulcers of the lower extremity: Definition, epidemiology, and economic and social burdens. *Seminars in Vascular Surgery*. 2015;28(1):3-5.
 28. O'Donnell Jr TF, Passman MA, Marston WA, et al. Management of venous leg ulcers: Clinical practice guidelines of the Society for Vascular Surgery® and the American Venous Forum. *Journal of Vascular Surgery*. 2014;60(2, Supplement):3S-59S.
 29. Alavi A, Sibbald RG, Phillips TJ, et al. What's new: Management of venous leg ulcers: Approach to venous leg ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2016;74(4):627-640.
 30. Zeng R, Lin C, Lin Z, et al. Approaches to cutaneous wound healing: basics and future directions. *Cell and Tissue Research*. 2018.
 31. Angle N, Bergan JJ. Chronic venous ulcer. *BMJ*. 1997;314(7086):1019.
 32. Porter JM, Moneta GL, An International Consensus Committee on Chronic Venous D. Reporting standards in venous disease: An update. *Journal of Vascular Surgery*. 1995;21(4):635-645.
 33. Eklöf B, Rutherford RB, Bergan JJ, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: Consensus statement. *Journal of Vascular Surgery*. 2004;40(6):1248-1252.
 34. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic Venous Insufficiency. *Circulation*. 2014;130(4):333-346.
 35. Abbade LPF, Lastória S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2006; 81: 509-522.

36. Aldunate JLCB, Isaac C, Ladeira PRSd, Carvalho VF, Ferreira MC. Úlceras venosas em membros inferiores. *Revista de Medicina*. 2010; 89(3-4): 158-163.
37. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol*. 1992;141(5):1085-1095.
38. Pappas PJ, DeFouw DO, Venezio LM, et al. Morphometric assessment of the dermal microcirculation in patients with chronic venous insufficiency. *Journal of Vascular Surgery*. 1997;26(5):784-795.
39. DiPietro LA, Burns AL. *Wound Healing: methods and protocols*. New Jersey 2003.
40. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):94-101.
41. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
42. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(10):738-746.
43. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in physiology*. 2018;9:419.
44. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*. 2011;29(10):475-479.
45. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
46. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004;9:283-289.
47. Pollard TD, Earnshaw WC. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Saunders - Elsevier; 2006.
48. Eisinger M, Sadan S, Silver IA, Flick RB. Growth regulation of skin cells by epidermal cell-derived factors: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(6):1937-1941.

49. McCarty SM, Percival SL. Proteases and Delayed Wound Healing. *Advances in Wound Care*. 2013;2(8):438-447.
50. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease – Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(10):1964-1974.
51. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2000;8(1):13-25.
52. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *Journal of Vascular Surgery*. 2009;49(4):1013-1020.
53. Gohel MS, Windhaber RAJ, Tarlton JF, Whyman MR, Poskitt KR. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *Journal of Vascular Surgery*. 2008;48(5):1272-1277.
54. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease – Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2016;1862(10):1900-1908.
55. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993;4(2):197-250.
56. Michopoulou A, Rousselle P. How do epidermal matrix metalloproteinases support re-epithelialization during skin healing? *Eur J Dermatol*. 2015;25 Suppl 1:33-42.
57. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-174.
58. Moali C, Hulmes DJ. Extracellular and cell surface proteases in wound healing: new players are still emerging. *Eur J Dermatol*. 2009;19(6):552-564.
59. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1962;48:1014-1022.

60. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(4):225-234.
61. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):255-268.
62. MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2015;355(3):410-428.
63. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(5):642-648.
64. Tarlton JF, Bailey AJ, Crawford E, Jones D, Moore K, Harding KD. Prognostic value of markers of collagen remodeling in venous ulcers. *Wound Repair Regen*. 1999;7(5):347-355.
65. Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. 2002;92(1):12-18.
66. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Structure, Function, and Biochemistry*. 2003;92(8):827-839.
67. Toriseva M, Kähäri VM. Proteinases in cutaneous wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66(2):203-224.
68. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004;49(3):187-198.
69. McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL. The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: A focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2012;20(2):125-136.
70. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biology*. 2015;44–46:247-254.
71. Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Advances in Wound Care*. 2013;2(5):195-214.

72. Connor TB, Jr., Roberts AB, Sporn MB, et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *The Journal of Clinical Investigation*. 83(5):1661-1666.
73. Watterson KR, Lanning DA, Diegelmann RF, Spiegel S. Regulation of fibroblast functions by lysophospholipid mediators: potential roles in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2007;15(5):607-616.
74. Nicolosi JT, Altran SC, Barragam JP, de Carvalho VF, Isaac C. Terapias compressivas no tratamento de úlcera venosa: estudo bibliométrico. *Aquichan*. 2015. 2015;15(2).
75. Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2017;1864(11, Part B):2220-2227.
76. Promogran™ & Promogran™ Prisma [Internet]. 2010 [capturado 01 junho de 2018.]. Disponível em: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjT2uWZqrPbAhXBipAKHQ67Ct8QFggpMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.woundsinternational.com%2Fmedia%2Fissues%2F287%2Ffiles%2Fcontent_8836.pdf&usq=AOvVaw0jEEN-HyK8MQdv7IA57py8
77. Dan Dimitrijevic S, Tatarko M, Gracy RW, Linsky CB, Olsen C. Biodegradation of oxidized regenerated cellulose. *Carbohydrate Research*. 1990;195(2):247-256.
78. Stilwell RL, Marks MG, Saferstein L, Wiseman DM. Oxidized Cellulose: Chemistry, Processing and Medical Applications. In: Domb AJ, Kost J, Wiseman DM, eds. *Handbook of Biodegradable Polymers*. CRC Press ed. Amsterdam 2010:291-386.
79. International consensus. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus [Internet]. Kathy Day. 2012 [capturado 01 junho de 2018]. Disponível: <https://www.google.com/search?q=Appropriate+use+of+silver+dressings+in+wounds.+An+expert+working+group+consensus&ie=utf-8&oe=utf-8&client=firefox-b-ab>
80. Politano AD, Campbell KT, Rosenberger LH, Sawyer RG. Use of Silver in the Prevention and Treatment of Infections: Silver Review. *Surgical Infections*. 2013;14(1):8-20.
81. Michaels JA, Campbell B, King B, Palfreyman SJ, Shackley P, Stevenson M. Randomized controlled trial and cost-effectiveness analysis of silver-

donating antimicrobial dressings for venous leg ulcers (VULCAN trial). *Br J Surg*. 2009;96(10):1147-1156.

82. Leaper D. Appropriate use of silver dressings in wounds: international consensus document. *Int Wound J*. 2012;9(5):461-464.
83. Yamada M, Foote M, Prow TW. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2015;7(3):428-445.
84. Cullen B, Ivins N. Promogran and Promogran Prisma Made Easy. *Wounds International*. 2010.
85. Grothier L. Understanding the use of collagen/oxidised regenerated cellulose dressings. *Wounds International*. 2015;6(2):34–40.
86. Omugha N, Jones AM. The management of hard-to-heal necrobiosis with PROMOGRAN. *Br J Nurs*. 2003;12(15 Suppl):S14-20.
87. Cullen B, Smith R, McCulloch E, Silcock D, Morrison L. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*. 2002;10(1):16-25.
88. Franceschini G, Visconti G, Terribile D, et al. The role of oxidized regenerate cellulose to prevent cosmetic defects in oncoplastic breast surgery. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2012;16(7):966-971.
89. Temiz A, Ozturk C, Bakunov A, Kara K, Kaleli T. A new material for prevention of peritendinous fibrotic adhesions after tendon repair: oxidised regenerated cellulose (Interceed), an absorbable adhesion barrier. *Int Orthop*. 2008;32(3):389-394.
90. Tausche A-K, Sebastian G. Wound conditioning of a deep tissue defect including exposed bone after tumour excision using PROMOGRAN* Matrix, a protease-modulating matrix. *International Wound Journal*. 2005;2(3):253-257.
91. Romanelli M, Mulder G, Paggi B, Macchia M, Panduri S, Dini V. The use of a collagen matrix in hard-to-heal venous leg ulcers. *J Wound Care*. 2015;24(11):543-544, 546-547.
92. Kakagia DD, Kazakos KJ, Xarchas KC, et al. Synergistic action of protease-modulating matrix and autologous growth factors in healing of diabetic foot ulcers. A prospective randomized trial. *Journal of diabetes and its complications*. 2007;21(6):387-391.

93. Veves A SPPHT. A randomized, controlled trial of promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Archives of Surgery*. 2002;137(7):822-827.
94. Smeets R, Ulrich D, Unglaub F, Woltje M, Pallua N. Effect of oxidised regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with chronic venous ulceration. *Int Wound J*. 2008;5(2):195-203.
95. Ulrich D, Smeets R, Unglaub F, Woltje M, Pallua N. Effect of oxidized regenerated cellulose/collagen matrix on proteases in wound exudate of patients with diabetic foot ulcers. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2011;38(5):522-528.
96. Konstantinow A, Fischer TV, Ring J. Effectiveness of collagen/oxidised regenerated cellulose/silver-containing composite wound dressing for the treatment of medium-depth split-thickness skin graft donor site wounds in multi-morbid patients: a prospective, non-comparative, single-centre study. *Int Wound J*. 2017;14(5):791-800.
97. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2050-2062.
98. GraphPad Software I. Graph Pad Software: GraphPad Software. [online] Inc; 2017 [capturado 30 novembro 2017]. Disponível: <https://www.graphpad.com/>.
99. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1):55-63.
100. Wang H, van Blitterswijk CA, Haas MB-D, Schuurman AH, Lamme EN. Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 2004;40(8):268-277.
101. Takashima A. Establishment of Fibroblast Cultures. *Current Protocols in Cell Biology*. 2001;00(1):2.1.1-2.1.12.
102. Stanley AC, Park HY, Phillips TJ, Russakovsky V, Menzoian JO. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J Vasc Surg*. 1997;26(6):994-999; discussion 999-1001.

103. Chowdhury F, Williams A, Johnson P. Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex® and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *Journal of Immunological Methods*. 2009;340(1):55-64.
104. Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, Reschke K, Lehnert H. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. *Journal of diabetes and its complications*. 2006;20(5):329-335.
105. Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*. 2002;10(3):141-151.
106. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2008;4(3):241-251.
107. Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Human pathology*. 1999;30(7):795-802.
108. Kwan KHL, Liu X, To MKT, Yeung KWK, Ho C-m, Wong KKY. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011;7(4):497-504.
109. Naik K, Kowshik M. The silver lining: towards the responsible and limited usage of silver. *Journal of applied microbiology*. 2017;123(5):1068-1087.
110. Dissemond J, Bottrich JG, Braunwarth H, Hilt J, Wilken P, Munter KC. Evidence for silver in wound care - meta-analysis of clinical studies from 2000-2015. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*. 2017;15(5):524-535.
111. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-beta-Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(30):E4320-4327.
112. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *Journal of Cell Science*. 1998;111(13):1897.