DÉCIO ABDO FILHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE
INTERLEUCINA-8, CXCR1 E CXCR2, E DA ATIVIDADE
PROLIFERATIVA EM FIBROBLASTOS DE QUELÓIDE E DE PELE
NORMAL**

**Tese apresentada a
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
para obtenção do
Título de Doutor em Ciências**

**Orientadora: Profa. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues
Co-orientador: Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria
Área de Concentração: Clínica Cirúrgica**

São Paulo

2006

DÉCIO ABDO FILHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE
INTERLEUCINA-8, CXCR1 E CXCR2, E DA ATIVIDADE
PROLIFERATIVA EM FIBROBLASTOS DE QUELÓIDE E DE PELE
NORMAL**

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

São Paulo

2006

À Minha Amada Mãe, Vilma:

Sempre Mãe, amiga, fonte de estímulo, coragem e perseverança

Para enfrentar qualquer desafio.

Ao Meu Pai, Décio:

Exemplo de Médico e orientador para a vida.

A Minha Esposa, Adriana:

**Presente companheira que com amor conduz a rotina de nossa
família.**

Aos Meus Filhos André e Amanda,

Razões de minha vida.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues, presente orientadora que me guiou com dedicação, generosidade e compreensão. Os meus especiais agradecimentos pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelos exemplos de postura na ciência, na ética e na vida.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, orientador e amigo, disposto incentivador, cuja participação foi de valor inestimável para a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Aldo Junqueira Rodrigues Júnior, pela oportunidade da realização deste projeto junto à Disciplina de Topografia Estrutural Humana da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos Profs. Drs. Angelita Habr-Gama, Joaquim José Gama-Rodrigues e Antonio Carlos Abramo, modelos de médicos, orientadores dos passos da vida profissional e científica que antecederam esta fase de minha jornada, pelos ensinamentos e conselhos.

Ao Dr. Edson Roberto Volpiani, cirurgião e amigo, pelo imprescindível auxílio nas cirurgias.

Ao Prof. Dr. Ulisses Ribeiro Júnior, amigo e incentivador, pela apresentação à Disciplina para a realização deste trabalho.

As Dras. Cecília Tomiko Nobumoto e Ginalda Cremonesi Zambone, Diretoras do Hospital e Maternidade Municipal Prof. Mário Degni, da Prefeitura Municipal de São Paulo, por terem permitido a realização dos procedimentos cirúrgicos, bem como o acesso dos auxiliares do laboratório ao centro cirúrgico.

A Alexandre Queiroz Silva, Gina Camilo Rocha Silvestre, Maria das Graças Ribeiro Batista, Leide Santos e Shirley de Sousa, integrantes do Laboratório de Investigação Médica 02 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas importantes contribuições e amizade.

A Sibeles Palomino Campoy Maria, esposa do Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria, pelo carinho e estímulo.

A Jorge Ferreira Júnior, pelo auxílio nas análises do Citometro de Fluxo no Instituto Butantan da Secretaria de Saúde.

Aos pacientes que doaram tecidos para a realização da pesquisa.

Lista de abreviações e símbolos

IL-8	interleucina-8
CXCR1	receptor 1 da interleucina-8
CXCR2	receptor 2 da interleucina-8
TGF β	fator de crescimento transformante β
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
HLA	antígenos leucocitários humanos
IgE	imunoglobulina E
GRO- α	fator de crescimento relacionado ao gene α
Mig	monocina induzida por interferon ?
IP-10	proteína indutora de interferon ?
PF4	fator plaquetário-4
IL-6	interleucina-6
IL-13	interleucina-13
MGSA	fator estimulante de crescimento de melanócito
cm	centímetro
mg	miligrama
ml	mililitro
°C	grau Celsius
PBS	solução tampão de fosfato de sódio
ATV	solução de tripsina 0,2% e Versene 0,1%
USA	Estados Unidos da América

mM	milimol
DMSO	dimetil sulfóxido
rpm	rotações por minuto
TRIS	hidroximetilaminometano
v/v	volume/volume
PI	iodeto de propídio
g	grama
NaCl	cloreto de sódio
HCL:	ácido clorídrico
SFB	soro fetal bovino
Anti-IL-8R1	anticorpo anti-receptor R1 de IL-8
Anti-IL-8R2	anticorpo anti-receptor R2 de IL-8
ATCC	American Culture Type Collection
PE	ficoeritrina
RNAse	ribonuclease
BD	Becton-Dickinson
H E	Hematoxilina-eosina
x	vezes
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol,diidrocloridro
n.s.	não significativo
X	média
D.P.	desvio padrão
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
IL-1	interleucina-1

TNF- α	fator de necrose tumoral - α
IL-6	interleucina-6
TRAF-1 e 2	proteína transmembrana associada aos receptores do TNF
IAP-1 e 2	genes anti-apoptóticos não inibidores de caspases
xIAP	genes anti-apoptóticos não inibidores de caspases
MEC	matriz extracelular
TIMP I e TIMP II	inibidor de metaloprotease tecidual tipo I e II
TGF- β 1	fator de crescimento transformante β 1
MGSA	fator estimulante de crescimento de melanoma
NAP-2	proteína ativadora de neutrófilo-2
NF κ B	proteína reguladora de transcrição de genes

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1 A e B. Aspectos macroscópicos de cicatrizes quelóideanas de
pacientes incluídos neste estudo..... 51

Figura 2 A. e B.Aspecto microscópico da pele normal e
quelóide.....52

Figura 3 A. Fotomicrografias de cultura de fibroblastos de cicatriz
quelóideana.....54

Figura 3 B. Fotomicrografias de cultura de fibroblastos de pele normal.....55

Figura 4 A. Fotomicrografia do aspecto morfológico dos núcleos celulares de
fibroblastos de cultura de cicatriz quelóideana.....56

Figura 4 B. Fotomicrografia do aspecto morfológico dos núcleos celulares de
fibroblastos de cultura de pele normal.....57

Figura 5 A e B. Fotomicrografias demonstrando a sobreposição dos núcleos
celulares de fibroblastos de cicatriz quelóideana.....58

Figura 6 A – E. Gráficos das aquisições das populações celulares obtidas por citometria de fluxo. A – Morfologia quelóide; B – Morfologia pele normal; C – Controle positivo quelóide; D – Controle positivo pele normal; E – Controle negativo.....60

Figura 7. Gráficos das expressões dos receptores CXCR1 e CXCR2 de IL-8 obtidos por citometria de fluxo. A – Fibroblastos de quelóide; B – Fibroblastos de pele normal.....61

Figura 8. Gráficos das expressões dos receptores CXCR1 e CXCR2 de IL-8 nas populações de fibroblastos em cultura. A– Fibroblastos de quelóide; B– Fibroblastos de pele normal; C Médias das expressões dos receptores CXCR1 e CXCR2.....63

Figura 9. Distribuição percentual nas fases do ciclo celular da população celular de fibroblastos de cicatriz queiloideana mantidos em cultura. A Imagem de aquisição por citometria de fluxo; B– Médias as populações.....65

Figura 10. Distribuição percentual nas fases do ciclo celular da população de fibroblastos de pele normal mantidos em cultura. A- Imagem de aquisição por citometria de fluxo; B – Médias das populações.....67

Figura 11. Distribuição percentual nas fases do ciclo celular de fibroblastos ex-vivo das porções centrais de cicatrizes quelóideanas. A – Imagem obtida por citometria de fluxo; B – Médias das populações.....71

Figura 12. Distribuição percentual nas fases do ciclo celular de fibroblastos ex-vivo das porções periféricas de cicatrizes quelóideanas. A – Imagem obtida por citometria de fluxo; B – Médias das populações.....73

Figura 13. Distribuição percentual nas fases do ciclo celular de fibroblastos ex-vivo de peles normais. A – Imagem obtida por citometria de fluxo; B – Médias das populações.....77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de pacientes.....122

Tabela 2. Expressão do receptor CXCR1 de IL-8 em fibroblastos de quelóide e de pele normal em cultura e controles positivos.....124

Tabela 3. Expressão do receptor CXCR2 de IL-8 em fibroblastos de quelóide e de pele normal em cultura e controles positivos.....125

Tabela 4. Distribuição da população de fibroblastos de cicatriz quelóideana mantidos em cultura nas fases do ciclo celular.....126

Tabela 5. Distribuição da população de fibroblastos de pele normal mantidos em cultura nas fases do ciclo celular.....127

Tabela 6. Comparação das fases do ciclo celular de fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal mantidos em cultura.....69

Tabela 7. Distribuição nas fases do ciclo celular das populações celulares de fibroblastos ex-vivo da porção central de cicatrizes quelóideanas. 128

Tabela 8. Distribuição nas fases do ciclo celular das populações celulares de fibroblastos ex-vivo da porção periférica de cicatrizes queloidianas. 129

Tabela 9. Análise estatística das fases do ciclo celular dos fibroblastos das porções central e periférica de cicatrizes queloidianas.....75

Tabela 10. Distribuição nas fases do ciclo celular das populações celulares de fibroblastos ex-vivo de peles normais. 130

Tabela 11. Distribuição percentua nas fases do ciclo e diferenças estatísticas entre as amostras de fibroblastos de pele normal e das porções central e periférica de cicatrizes queloidianas ex-vivo.....79

Tabela 12. Análise comparativa da capacidade proliferativa e da fase quiescente das populações de fibroblastos de cicatriz queloidiana e de pele normal, mantidos em cultura.....81

Tabela 13. Análise comparativa da capacidade proliferativa e da fase quiescente das populações de fibroblastos ex-vivo das porções central e periférica de cicatriz queloidiana e de pele normal.....82

Tabela 14. Análise comparativa da capacidade proliferativa e da fase quiescente entre as populações de fibroblastos de cicatriz quelóideana mantidas em cultura e extraídas ex-vivo.....	83

ÍNDICE

Resumo.....	19
Summary.....	22
Introdução.....	25
Aspectos clínicos.....	26
Aspectos histológicos.....	28
Aspectos bioquímicos	29
Aspectos imunológicos.....	30
Objetivos.....	37
Métodos.....	39
Casuística.....	40
Preparo da amostras.....	41
Cultura de fibroblastos.....	41
Preparo das amostras de fibroblastos ex-vivo.....	43
Análise da expressão dos receptores de IL-8 em fibroblastos cultivados, por citometria de fluxo.....	44
Análise das fases do ciclo celular de fibroblastos em cultura e de fibroblastos ex-vivo.....	46

Análise histopatológica.....	48
Análise estatística.....	48
Resultados.....	49
Aspectos AP da cicatriz queloidiana.....	50
Aspectos gerais da cultura de fibroblastos de quelóide e de pele normal.....	53
Análise da expressão dos receptores de superfície celular de interleucina-8, CXCR1 e CXCR2, em amostras de fibroblastos cultivados de quelóide e de pele normal.....	59
Expressão do receptor de IL-8 CXCR1.....	61
Expressão do receptor de IL-8 CXCR2.....	62
Análise da atividade proliferativa de fibroblastos cultivados de cicatriz queloidiana e de pele normal.....	64
Ciclo celular de fibroblastos de cicatriz queloidiana em cultura.....	64
Ciclo celular de fibroblastos de pele normal em cultura.....	66
Análise comparativa do ciclo celular de fibroblastos cultivados de cicatriz queloidiana e de pele normal.....	68
Análise da atividade proliferativa de fibroblastos ex-vivo de cicatriz queloidiana e de pele normal.....	70

Ciclo celular de fibroblastos ex-vivo da porção central de cicatriz queloidiana.....	70
Ciclo celular de fibroblastos ex-vivo da porção periférica de cicatriz queloidiana.....	72
Análise comparativa do ciclo celular de fibroblastos ex-vivo das porções central e periférica de cicatriz queloidiana.....	74
Ciclo celular de amostras ex-vivo de fibroblastos de pele normal.....	76
Análise comparativa do ciclo celular de amostras ex- vivo de cicatriz queloidiana e de pele normal.....	78
Análise comparativa da capacidade proliferativa de fibroblastos de amostras de cicatriz queloidiana e de pele normal.....	80
Discussão.....	84
Conclusões.....	98
Referências Bibliográficas.....	100
Anexos.....	121

RESUMO

Abdo Filho, D., Determinação dos receptores de interleucina-8, CXCR1 e CXCR2, e da atividade proliferativa em fibroblastos de quelóide e de pele normal [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005.

O quelóide é um tumor fibroso benigno que ocorre durante a cicatrização da pele em indivíduos geneticamente predispostos. A cicatrização é um processo biológico complexo e depende da interação de diferentes estruturas teciduais e de um grande número de tipos celulares residentes e infiltrativos, que produzem citocinas. A interleucina 8 (IL-8), citocina pró-inflamatória, é super-expressa pelos fibroblastos durante o desenvolvimento do tecido de granulação, acelerando o processo de cicatrização. Como o quelóide resulta de uma reparação tecidual anormal após lesão da pele, o presente estudo teve por objetivo determinar a expressão dos receptores da IL-8, CXCR1 e CXCR2, e a capacidade proliferativa, pelo ciclo celular, dos fibroblastos quelóideanos cultivados e extraídos *ex vivo*, por citometria de fluxo. Fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal foram obtidos de 21 pacientes da raça negra, com idade variando entre 10 e 40 anos, de lesões com até 2 anos de evolução. Em nosso estudo constatamos expressão reduzida dos receptores para a IL-8, CXCR1(35,7%±11,2) e CXCR2 (27,8%±11,3), em fibroblastos de cicatriz quelóideana cultivados, comparando com a pele normal (44,1±16,2 e 46,3±27,1 respectivamente).

Entretanto, essa diferença só foi significativa para o receptor CXCR2. A baixa expressão desses receptores poderia ser decorrente da atividade de metaloproteinases, que regulam a expressão de proteínas da superfície celular, através de clivagem enzimática, ou a capacidade reduzida de internalização e a reciclagem de receptores, mantida por filamentos de actina do citoesqueleto, que nos fibroblastos do quelóide estão diminuídos. Em relação ao ciclo celular de fibroblastos cultivados do quelóide e da pele normal, verificamos diferenças não significantes da capacidade de replicação (fase S do ciclo celular) e de apoptose. No quelóide observamos significativo aumento de células na fase G2/M, indicando aumento da velocidade de divisão celular. Para confirmar esses achados estudamos o ciclo celular de fibroblastos extraídos *ex vivo*, da porção periférica e central do quelóide e da pele normal. Os fibroblastos da porção periférica apresentaram porcentagem significativamente maior de células com capacidade replicativa, fase S do ciclo ($22,9\% \pm 11,6$), em relação à porção central ($4,7\% \pm 2,9$) e à pele normal ($6,8\% \pm 4,9$), e maior velocidade de divisão celular, fase G2/M ($18,6 \pm 12,0$), em relação à porção central ($35,6 \pm 7,0$) e pele normal ($32,3 \pm 6,9$). Verificamos que a porção central apresentou maior porcentagem de células em apoptose ($7,0\% \pm 2,1$), comparado à porção periférica ($4,9\% \pm 1,9$) e pele normal ($2,0\% \pm 0,86$). Esses dados indicam que as células da porção periférica do quelóide parecem ser responsáveis pela elevada taxa de proliferação, justificando o crescimento expansivo a partir das margens da cicatriz queloideana, com desenvolvimento de lesão semelhante a tumor, bem como a porção central ser responsável pela

fibrose, contendo células quiescentes e apoptóticas. Esses resultados sugerem modulação diferencial das reações celulares através das vias de sinalização para proliferação ou morte celular programada. Neste sentido, a baixa expressão dos receptores da IL-8, CXCR1 e principalmente de CXCR2, nos fibroblastos do quelóide sugere capacidade reduzida da IL-8 em promover cicatrização acelerada. A baixa atividade da IL-8 sobre os fibroblastos queiloideanos estaria promovendo desregulação da resposta inflamatória e com isso atraindo novas células inflamatórias para o local e produzindo sinais alterados, como grande produção da citocina TGF β . Essa desregulação do processo de cicatrização, com alteração de citocinas e da matriz extracelular, poderia ser responsável pelas duas populações de fibroblastos, uma proliferativa na periferia e outra quiescente e apoptótica na porção central. Finalizando, podemos concluir que nossos resultados correspondem às alterações histológicas e clínicas do quelóide que se expande nos limites da lesão.

SUMMARY

Abdo Filho, D., *Determination of the interleukin-8 receptors CXCR1 and CXCR2, and proliferative activity in keloids and normal skin fibroblasts* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2005.

A keloid is a benign fibrous tumor that occurs during wound healing in genetically predisposed individuals. Healing is a complex biological process and depends on the interaction of different tissue structures and a great number of resident and infiltrative cell types. The interleukin-8 (IL-8), a proinflammatory chemokine, showed higher expression in fibroblasts during the development of the granulation tissue, promoting more rapid tissue maturation. Since keloids result from abnormal wound healing, the objective of the present study was to determine the expression of CXCR1 and CXCR2, IL-8 receptors, and the proliferation capacity, throughout the cell cycle, of the keloid fibroblasts extracted *ex vivo* and those submitted to *in vitro* cultivation. Normal skin and keloid scar fibroblasts were obtained from 21 African-Brazilian patients, aged from 10 to 40 years, whose lesions had evolved for no longer than 2 years. Expression of receptors and the cell cycle was assessed by flow cytometry. We showed lower expression of the CXCR1 (35,7%±11,2) and CXCR2 (27,8%±11,3) in keloid fibroblasts, when compared with normal skin (44,1±16,2 e 46,3±27,1 respectively), but the difference was not significant for the CXCR1 receptor. This lower expression

of IL-8 receptors in keloid fibroblasts could be due to the action of metalloproteinases, which regulate the surface protein enzymatically, or fibroblastic cytoskeleton conditions, which influence receptor internalization and recycling. The distribution assessment of cell cycle phases of fibroblasts cultivated from keloid scars and normal skin did not show significant difference in replication capacity and apoptosis. The keloid fibroblasts presented a significantly higher proportion of cells in the G2/M phase, suggesting higher rate of cell division. To confirm these results we studied the cell cycle of fibroblasts extracted *ex vivo*, now separated by central and peripheral portions of keloid and normal skin. The peripheral fibroblasts showed significant high cell proportions in phase S ($22,9\% \pm 11,6$), compared with the central portion ($4,7\% \pm 2,9$) and normal skin ($6,8\% \pm 4,9$), and higher cells in division phase G2/M ($18,6\% \pm 12,0$), compared with the central portion ($35,6\% \pm 7,0$) and normal skin ($32,3\% \pm 6,9$). The central portion showed higher proportion of apoptosis ($7,0\% \pm 2,1$), compared with the peripheral portion ($4,9\% \pm 1,9$) and normal skin ($2,0\% \pm 0,86$). These results suggest that the keloid peripheral cells could be responsible for the proliferation rate, justifying the expansive keloid growth at the borders of the keloid scar, in a similar fashion to tumor development and the central portion being responsible for fibrosis, with quiescent and apoptotic cells. These results suggest a differentiated modulation of cell reactions by signal pathways for programmed cellular proliferation or death. In this sense, the low expression of the IL-8 receptors CXCR1 and CXCR2 in keloid fibroblasts suggests a diminished capacity of IL-8 to promote accelerated healing. This low

expression of IL-8 receptors in keloid fibroblasts could promote the dysregulation of the inflammatory response and thus attract more inflammatory cells to the site, producing different signals, such as a high production of the TGF β cytokine. This dysregulation of the healing process, with changed cytokine and extracellular matrix expression, could be responsible for two different cell populations of fibroblasts, one proliferation at the periphery and the other fibrotic at the center of the lesion, with apoptotic and quiescent cells. Finally, we conclude that our results correspond to the histological and clinical changes of keloids that grow beyond the wound boundaries.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Aspectos Clínicos

O quelóide é um processo cicatricial caracterizado por exceder-se além dos limites da lesão que o originou e pela tendência à recidiva após sua ressecção (Peacock et al., 1970). Sua descrição data de séculos, sendo encontrada pela primeira vez no papiro Smith. Foi também observado em esculturas do século XIII da região oeste da Nigéria. Posteriormente, este processo foi citado por Retz (1770) e Alibert (1802), quando passou a ser denominado, diferenciando-o do crescimento canceroso, pela designação ora consagrada (Rockwell et al., 1988; Datubo-Brown, 1990). Este termo deriva do grego, *chele*, que significava garra de caranguejo, referindo-se à maneira pela qual a lesão se expande lateralmente no tecido normal (Berman et al., 1995). O quelóide é um fenômeno exclusivo do ser humano, não sendo encontrado em animais, portanto não havendo um modelo experimental, fato que dificulta seu estudo.

O quelóide ocorre em todas as raças, sendo prevalente em indivíduos negros e amarelos. Cosman et al. (1961) encontraram incidência de 4,5 a 16,0% em cicatriz de vacinação clinicamente sugestiva de quelóide em indivíduos negros e hispânicos.

Koonin (1964) correlacionou a maior incidência em raças de pele mais escura com a alteração no metabolismo do hormônio estimulante de melanócito.

Oluwasanmi (1974) relatou incidência de 6,2 % em uma comunidade rural africana. Esta teoria está apoiada em vários estudos relatados por Ketchum et al. (1974): - em raças de pele escura, os melanócitos são mais reativos ao hormônio estimulante de melanócito; - pessoas com pele mais pigmentada parecem ter mais prevalência para o quelóide; - os locais mais incidentes no corpo são aqueles que têm maior concentração de melanócitos (é raro em palmas das mãos e plantas dos pés, onde a concentração de melanócitos é mínima); - a maior incidência é nas fases de maior desenvolvimento, como puberdade e gravidez, quando se tem maior atividade hipofisária e esta se relaciona com aumento na pigmentação; - responde ao uso de corticóides que são inibidores da liberação do hormônio estimulante de melanócito.

A relação familiar é sugerida como herança autossômica dominante, porém ainda permanece objeto de estudo (Bloom, 1956; Omo-Dare, 1975; Cohen et al., 1990). Ambos os sexos são acometidos, de forma igual, dentro de um mesmo grupo populacional e mesma faixa etária. Com relação à idade é mais incidente entre a primeira e a terceira décadas, sendo mais raro nas lesões dos extremos da vida. Algumas hipóteses explicam este fato: 1) jovens são mais expostos a traumatismos; 2) a pele dos jovens tem maior tensão que a pele do idoso, que é mais flácida e redundante; 3) a síntese de colágeno é maior em jovens (Ketchum et al., 1974).

Quanto à distribuição, é mais freqüente em regiões com maior tensão na pele, onde a pele é mais espessa, sendo raro nas pálpebras, genitália, palmas das mãos e plantas dos pés. Crockett (1964) propôs uma ordem

para susceptibilidade: 1) primeira ordem: em indivíduos susceptíveis, todas as cicatrizes em certas áreas desenvolverão um quelóide (pré-esternal, dorso, deltóideas); 2) segunda ordem: o tipo de agressão pode influenciar para o desenvolvimento de um quelóide em algumas áreas (orelha, braço, tórax anterior, couro cabeludo, fronte, região da barba); 3) terceira ordem: em certas áreas é incomum e, se presente, de menor proporção (região lombar, abdome, região central da face, genitália).

Clinicamente, o quelóide se desenvolve secundariamente a lesões cutâneas, muitas vezes sendo estas desconhecidas do paciente, que relata ser a cicatriz de crescimento espontâneo. Isto ocorre porque as lesões menores como acne, pústulas e picadas de inseto podem se complicar com a formação de uma cicatriz queloidiana (Datubo-Brown, 1990).

1.2. Aspectos Histológicos

Histologicamente, o quelóide diferencia-se da pele normal e do processo cicatricial por apresentar um grande número de vasos sanguíneos, alta densidade de células mesenquimais e espessa camada de células epiteliais (Matsuoka et al., 1988). As fibras colágenas estão dispostas em rodaminho, configurando nódulos (Kischer e Brody, 1981). São observados alguns macrófagos e em maior quantidade linfócitos e eosinófilos. Outra característica é a abundância de substância basal mucinosa entre as fibras colágenas.

A análise pela microscopia eletrônica de varredura mostra a perda da organização das fibras colágenas, quando comparado com pele normal ou cicatriz normal madura. No quelóide as fibras colágenas são maiores e mais irregulares, conectadas casualmente, e não se apresentando orientação com a superfície epitelial (Clark, 1993). Kischer et al. (1982) observaram que a microvascularização no quelóide encontra-se parcial ou completamente ocluída devido a um excesso de células endoteliais quando comparada com a pele normal.

1.3. Aspectos Bioquímicos

Placik et al. (1992) relataram que a composição bioquímica do tecido quelóideano comparando com pele normal: 1) aumentadas quantidades de água, cálcio, histamina, fosfatase ácida, alanina transaminase, desidrogenase láctica, α globulinas (α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina), fibronectina e RNAm de fibronectina, elastina, glicosaminoglicanas, proteoglicanas (sulfato de condroitina-4), galactosil-hidroxilisil-glucosil transferase, prolina-hidroxilase, sendo a excessiva deposição de colágeno, um dos achados mais marcantes do quelóide (Craig et al., 1975; Diegelmann et al., 1979); 2) quantidade aumentada de peptídeos procolágeno devido à diminuída degradação (Abergel et al., 1985); 3) variáveis quantidades de colágeno tipo III (aumentada, semelhante ou diminuída); 4) quantidades aumentadas ou semelhantes de colágeno tipo I, razão colágeno tipo I para tipo III, RNAm procolágeno tipo I; 5) quantidades

semelhantes de RNAm procolágeno tipo II, III, IV, V. Neste trabalho foi observado que com esta variedade de resultados se necessita maior estudo para esclarecer a causa para a acumulação de colágeno, porém alguns trabalhos auxiliam no direcionamento para possíveis responsáveis: 1) o aumento de α -globulinas, apesar de variável, em comparação com pele normal ou cicatriz de padrão normal, pois que estas proteínas inibem a colagenase e podem resultar em diminuição da degradação de colágeno; 2) há quantidade elevada de histamina no quelóide, sendo que estudos prévios demonstraram que esta proteína aumentou a síntese de tecido de granulação, podendo ser um fator de estimulação da síntese de colágeno (Bischoff et al.,1991; Atiyeh et al.,2005).

1.4. Aspectos Imunológicos

Há evidências de fatores imunológicos envolvidos na gênese do quelóide (Oluwasanmi et al., 1976; Boxman et al.,1996; Singer e Clark, 1999). O fato de uma primeira incidência de quelóide se formar lentamente e o crescimento secundário, após a excisão, ser rápido, tem sido interpretado como uma resposta imunológica, decorrente da exposição e sensibilização a antígeno, do estabelecimento de memória, da reinoculação do antígeno, e da ativação da imunidade humoral e celular (Kazeen et al., 1988). Outros fatores imunológicos têm sido relacionados à predisposição pelo desenvolvimento do quelóide, como por exemplo, os haplotipos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) B14, BW16, BW35, B21, DR5 e

DQW3 (Laurentaci et al., 1977; Castagnoli et al., 1990), e indivíduos do grupo sanguíneo A (Ramakrishnan et al., 1974). Entretanto estas relações com antígenos de histocompatibilidade não têm sido confirmadas em todos os estudos. Também são conflitantes os resultados de investigações para dosagens de imunoglobulinas e complemento em cicatrizes quelóideanas (Kazeen et al., 1988; Cohen et al., 1979; Bloch et al., 1984), sendo correlacionada à extensão do quelóide com o infiltrado linfocitário do local da ferida e com o aumento do número de linfócitos T do sangue periférico (Oluwasanmi et al., 1974; Jimbow et al., 1988). A presença de IgE na cicatriz quelóideana pode estimular os mastócitos a liberar grânulos citoplasmáticos que contém histamina, heparina, serotonina, ácido hidrolase, e uma protease neutra, que podem contribuir para a formação de quelóide, considerando que interferem na atividade da enzima lisil-oxidase que se relaciona com as ligações cruzadas entre as moléculas de colágeno, aumentando a quantidade de colágeno solúvel (Cohen et al., 1979; Schwartz et al., 1981; Buffoni et al., 1981; Nimni et al., 1983).

Após uma lesão da superfície cutânea, é desencadeada uma reação inflamatória caracterizada pelo extravasamento de células em decorrência da ruptura vascular, havendo uma coleção de neutrófilos na superfície da lesão (Garner et al., 1994). Imediatamente mais leucócitos são atraídos para o local, procedentes de vasos sanguíneos adjacentes, promovendo uma barreira contra agentes patogênicos. As plaquetas, que fazem os coágulos nos vasos sanguíneos lesados, também agem liberando fatores de crescimento. Os macrófagos surgem no local da injúria entre 48 e 96 horas

após a lesão, tendo sua primeira função relacionada ao processo inflamatório e debridamento, preparando para a migração e replicação dos fibroblastos. O papel dos linfócitos na cicatrização está relacionado aos linfócitos T específicos que migram para a lesão seguindo o influxo de outras células inflamatórias e macrófagos e, no leito da ferida em reparação, não são apenas células de ação imunológica, mas também são responsáveis pela produção e liberação de fatores de crescimento, sendo que na fase de remodelagem da cicatrização consistem no mais freqüente tipo leucocitário presente. As ações efetoras destas células são moduladas através da liberação de substâncias inibidoras e estimuladoras, denominadas citocinas, ou monocinas ou ainda interleucinas (Strieter et al., 1996). Estas substâncias consistem de pequenos peptídeos que são potentes ativadores celulares, relacionados à resposta celular na inflamação, e com função de moléculas reguladoras na maturação leucocitária, na diferenciação celular, na angiogênese, na fibroplasia e no crescimento epitelial, entre outras (Barbul, 1990; Koch et al., 1992; Clark-Lewis et al., 1995; Kadono et al., 1998; Longaker, 1999; Gillitzer e Goebeler, 2001; Strieter et al., 2005).

Entre as citocinas, a família das interleucinas, apesar do grande número de integrantes, apresenta características homogêneas, com propriedades comuns entre eles (Luster, 1998). Essas pequenas proteínas se compõem de 4 moléculas de cisteína formando 2 cadeias com união dissulfeto, que se dividem em dois grupos, CXC e CC, distintos devido à posição das primeiras duas cisteínas, que podem ser adjacentes (CC) ou separadas por um aminoácido (CXC).

A fase de fibroplasia no processo cicatricial se caracteriza pela produção de uma matriz protéica que será a base para posterior epitelização. A matriz protéica se compõe de uma malha de fibrina na qual se depositam fibroblastos que produzirão a matriz extracelular constituída predominantemente de colágeno entre outras proteínas e moléculas de adesão (Meyer et al., 2000). Também há estímulo para angiogênese neste tecido, sendo formados brotos vasculares, o que confere um aspecto macroscópico de coloração avermelhada. Como exposto acima, este mecanismo depende de células diferentes, e níveis de citocinas imuno-reguladoras alterados podem ter influência no aumento da deposição de colágeno, proporcionando um padrão de quelóide (Nirodi et al., 2000).

McCauley et al., em 1992, observaram diminuição da produção de interferon α , interferon γ , e fator de necrose tumoral β em células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de quelóide, comparados com pacientes-controles normais. Outras citocinas, GRO- α , Mig, IP-10, p4, IL-6, IL-13 e IL-8, entre outras mostram-se alteradas (Oriente et al. 2000; Xue et al., 2000; Gillitzer e Goebeler, 2001).

A Interleucina-8 é uma interleucina do grupo CXC, mediadora pró-inflamatória. Inicialmente os monócitos foram identificados como sua fonte, porém vários tipos de células foram vinculadas à sua produção, como, por exemplo, linfócitos T, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e vários tipos de células tumorais (Mukaida et al., 1989; LaRosa et al., 1992). Da mesma forma, sua atividade, foi primeiramente relacionada à migração dos leucócitos, e posteriormente receptores específicos para a interleucina-8 em

outros tipos de células, como por exemplo, todos os tipos de granulócitos, os monócitos, os mastócitos, alguns linfócitos, os fibroblastos e os queratinócitos foram identificados (Standiford et al., 1990; Thomas et al., 1991).

Os receptores da interleucina-8 são de dois tipos, denominados CXCR1 e CXCR2 e têm expressões com afinidades diferentes nos diversos tipos celulares em que estão presentes, sendo que em determinadas circunstâncias, como por exemplo, processos hiperplásicos, essa expressão é muito aumentada (Murdoch e Finn, 2000). Para esclarecer a participação da IL-8 no processo de cicatrização vários estudos foram realizados, analisando sua expressão em tecidos da ferida e da cicatriz (Rennekampff et al, 2000; Gillitzer & Goebeler, 2001). Rennekampff et al (2000), relataram que na fase inflamatória os níveis de IL-8 estão prolongadamente elevados e a sua ação se relaciona com a atração de polimorfonucleares, e influenciam a reepitelização por estímulo mitogênico sobre os queratinócitos além de reduzirem a contração da ferida.

Garner, em 1998, demonstrou maior concentração de IL-8 em amostras de pele de espessura parcial de lesões por queimadura, em comparação com amostras semelhantes de pele normal, que mostravam mínima secreção da citocina. Com este resultado este autor fez a hipótese de serem queratinócitos suprabasais de áreas lesadas uma fonte primária da IL-8 nas lesões, com liberação imunoreativa. Outras fontes celulares adicionais de IL-8 seriam as responsáveis pela prolongada elevação dos níveis de IL-8 (como acima citado, queratinócitos que migraram para o sítio

lesado, fibroblastos, células endoteliais, polimorfonucleares e monócitos) (Schröder et al, 1993; Sticherling et al, 1993; Baggiolini et al, 1989).

Schröder et al, em 1993, demonstraram por determinação de massa molecular e da seqüência de aminoácidos que a posição do resíduo 77, localizada na região amino terminal, era a isoforma prevalente nos fluidos de feridas, sendo que os polimorfonucleares e fibroblastos eram os maiores responsáveis por esta secreção, estimulados por outras citocinas, como IL-1 e TNF - α .

Os receptores de membrana para a IL-8 também apresentam afinidade para outra citocina pró-inflamatória, o fator estimulante de crescimento de melanócito (MGSA). Os dois tipos de receptores para a IL-8 apresentam 77% de homologia com os aminoácidos identificados, com sete domínios trans-membrana, sendo ambos pertencentes à família de receptores da proteína G, a diferença de afinidade entre eles está relacionada à capacidade de ligação com a MGSA, um com alta e outro com baixa afinidade.

A ligação entre a IL-8 e seus receptores está vinculada à presença de cálcio, havendo aumento de concentração destes íons na célula estimulada, como observado em neutrófilos (Lee et al., 1992; Neote et al., 1993).

Nanney et al (1995) mostraram o aumento de MGSA e CXCR2 em feridas de queimaduras em humanos, sugerindo relação da concentração do receptor com processo de regeneração epidérmica.

Neste estudo foi realizada a análise comparativa dos receptores de interleucina-8, CXCR1 e CXCR2, em fibroblastos de pele normal e de

quelóide, em amostras de cultura e de tecido congelado *ex vivo*, relacionando o índice proliferativo e capacidade de síntese, e assim, sua expressão sobre estas células.

<u>OBJETIVOS</u>

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivos:

2.1. Comparar a expressão dos receptores da IL-8 (CXCR1 e CXCR2) em fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal;

2.2. Avaliar a atividade proliferativa de fibroblastos de cicatriz quelóideana, porções central e periférica, e de pele normal, mantidos em cultura e em amostras *ex vivo*.

<u>MÉTODOS</u>

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram estudados 21 indivíduos de raça negra, portadores de cicatriz quelóide com até dois anos de evolução, com faixa etária entre 10 e 40 anos (Tabela 1 – Anexo 1). Os indivíduos foram submetidos à biópsia excisional, após consentimento informado, em sala cirúrgica com critérios de assepsia e antisepsia habituais, que englobou a cicatriz e pequena porção das margens laterais. Considerou-se no tecido cicatricial duas amostras distintas, correspondendo uma à porção central e outra à porção da margem da cicatriz imediatamente dentro de seu limite macroscópico. Para as amostras de pele normal foram extraídos tecidos de padrão cutâneo normal com distância a partir de 0,3 cm além do limite macroscópico da cicatriz. Todas as amostras foram encaminhadas para a análise histopatológica para a confirmação diagnóstica. O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do HC-FMUSP sob o número 213/03 (Anexo 2).

3.2 Preparo das Amostras

Imediatamente após a ressecção da cicatriz quelóide, juntamente com as margens laterais, foram retiradas amostras do tecido queiloideano, porções central e periférica, e do tecido normal da margem, com dimensões de 0,5cm x 0,5cm. Uma amostra de cada tecido foi imersa em meio de cultura Ham F-12 + soro fetal bovino + antibióticos (Ampicilina 20 mg/ml; estreptomicina 20 mg/ml; gentamicina 40 mg/ml) em tubo cônico estéril, para posterior desenvolvimento de cultura de fibroblastos. Outra amostra da cicatriz e da pele normal foi submetida a congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), para posterior obtenção de fibroblastos ex-vivo.

3.3 Cultura de Fibroblastos

As amostras foram submetidas a retirada dos restos sanguíneos, resíduos de gordura e de tecidos celulares degenerados pelo ato cirúrgico, sendo este processo de limpeza realizado em PBS estéril + antibióticos, sob fluxo laminar. Cada fragmento foi então subdividido em pequenas porções de cerca de 0,1cm x 0,1cm. Cada dez destas pequenas amostras foram acomodadas em placa de Petri de 35 mm, contendo meio de cultura Ham F-12 + soro fetal bovino + antibióticos, sendo em seguida incubadas em estufa à 37°C com 5% CO₂. Na primeira semana de cultivo foi adicionado 50 ml de meio de cultura Ham F-12 em dias alternados. Após este período, o meio de cultura foi trocado três vezes por semana. Em torno de 10 a 15 dias, deu-se

o início da liberação das células das amostras para o meio, estando estas aderidas no fundo da placa de Petri. Ao completar 30 dias de cultivo, os fragmentos de tecido foram retirados das placas, evitando assim o prejuízo da cultura, decorrente de toxinas liberadas com a morte celular. O próximo passo foi o preparo de subculturas, para aumentar o volume de material a ser analisado. O meio de cultura das placas de Petri foi aspirado, e depois a placa foi lavada com o PBS estéril por 3 vezes. Adicionou-se 1 ml de ATV (solução tripsina 0.2% e Versene 0.1%) permitindo a liberação das células que estavam aderidas ao fundo da placa. O produto foi então inativado pela adição de meio de cultura e soro fetal bovino. A suspensão celular foi retirada e submetida à centrifugação por 4 minutos a 1.500 rpm. Após desprezar o sobrenadante e resusender o sedimento com 1ml de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino, foi realizada a contagem de células viáveis. A determinação de viabilidade celular foi realizada pelo teste de exclusão celular pelo Azul Tripán, e alíquotas de fibroblastos foram incubadas com solução de Azul Tripán 0,5% (Merck – USA), e diluídas em solução salina tamponada (PBS) na proporção de 9/1. Após a homogenização, uma amostra de suspensão celular foi analisada sob microscópio de luz com objetiva de 20X. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e somente as amostras de fibroblastos que continham acima de 90% de células viáveis foram subcultivadas. Alíquotas destas células foram congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior utilização quando necessário.

3.4 Preparo das Amostras de Fibroblastos *Ex-vivo*

Amostras de tecido congelado em nitrogênio líquido de cicatriz queloidiana e de pele normal, foram processadas e analisadas segundo o método Vindelov (Vindelov et al, 1989).

Os fragmentos foram seccionados em placa de Petri e em pequenas porções em meio contendo 250mM de sucrose, 40mM de citrato trissódico e 5% de DMSO (dimetil sulfóxido) e submetidos à centrifugação a 2500 rpm, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 900ml de tripsina sobre o botão celular, deixando em repouso por 10 minutos, em temperatura ambiente. A seguir, foi adicionada solução contendo 3,4mM de citrato trissódico, 0,1ml v/v de Nonidete P40, 1,5mM de espermina tetra-hidrocloridrato e 0,5mM de TRIS (hidroximetilaminometano) pH=7,6. Após, foram adicionados 750ml de inibidor de tripsina (0,5 mg), de ribonuclease-A (0,1 mg), e deixada por 10 minutos em repouso à temperatura ambiente. Após filtrar a suspensão, 750ml de PI (iodeto de propídio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e espermina foram adicionados e deixado por 15 minutos em local escuro. A solução PI foi preparada seguindo as seguintes concentrações: 50mg de PI/ml em solução TRIS, contendo 12,14 g de TRIS, 5,84 g de NaCl (cloreto de sódio) e 6,9 ml de HCl 37% (ácido clorídrico) pH=7,6.

3.5 Análise da Expressão dos Receptores de Interleucina-8 em Fibroblastos Cultivados, por Citometria de Fluxo.

As culturas de fibroblastos, de cicatriz quelóideana e de pele normal, após atingirem 70 a 80% de confluência na placa de cultura, foram incubadas por 12 horas com meio de cultura depletado de cálcio, para facilitar o descolamento das células. A seguir, o meio de cultura foi desprezado, sendo adicionado 1ml de solução de ATV, incubando por 5 minutos à 37°C. Na sequência, o ATV foi inativado com adição de 1ml de soro fetal bovino. A suspensão de células foi então submetida à lavagem, por duas vezes, com PBS (solução tampão de fosfato de sódio, pH=7,4) e centrifugação a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspensionado em solução de PBS. A concentração celular foi ajustada, com auxílio de câmara de Neubauer, para 1×10^6 células/ml, por tubo e fixada em solução de paraformaldeído a 2% (Merck – USA) em PBS em um volume de 1ml da suspensão celular e 1ml de fixador (volume/volume), durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com SFB (Gibco Laboratories - USA) diluído a 5% em PBS, o sobrenadante descartado e ressuspensionado em solução de PBS. Alíquotas de 100ml destas suspensões de fibroblastos de cicatriz quelóide e de pele normal foram incubadas por 1 hora, à 4°C, com 1mg de anticorpo primário específico: anticorpos para receptores de interleucina-8, anti-IL8-R1 e anti-IL8-R2 (Santa Cruz, USA), e anticorpo específico para fibroblastos humanos (Santa Cruz, USA). Como controle positivo foi utilizada a linhagem

de células de melanoma humano SKmel-28 (ATCC – American Culture Type Collection – USA), conforme especificado pelo fabricante. Para o controle negativo as amostras de fibroblastos foram incubadas, por 1 hora, à 4°C, com anticorpos inespecíficos, que não apresentam afinidade ou ligantes na superfície dos fibroblastos, como os anticorpos inespecíficos anti-CD3 humano e anti-IgG de camundongo. Após este período as células foram lavadas com PBS gelado, 2 vezes, com centrifugação à 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular incubado com anticorpo secundário marcado com PE (Ficoeritrina, Alexa-Fluor 546 - Molecular Probes, USA) por 1 hora, à 4°C. Em seguida os anticorpos não ligados foram retirados por lavagem das suspensões celulares com PBS e centrifugação a 1500rpm, por duas vezes. Os botões celulares foram ressuspendidos em PBS contendo 0,1% de paraformaldeído.

A leitura e análise da expressão dos receptores na superfície dos fibroblastos das amostras de cicatriz quelóide e de pele normal foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (Fluorescence Activated Cell Analyser – Becton & Dickinson, USA) da Divisão Científica do Instituto Butantan da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Utilizando-se o programa “cell quest” (BD), com aquisição de 100.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granulosidade/complexidade) em escala linear e FL1 em escala logarítmica, que detecta a fluorescência da reação antígeno/anticorpo conjugado à PE.

A incidência de feixe de luz do citômetro no ângulo de 90° em cada célula da amostra forneceu, de acordo com a refração de seus raios, os

parâmetros morfológicos das células, quanto ao seu tamanho e complexidade interna. O software recebeu os dados, os quais foram plotados em gráfico, distribuindo desta maneira as células em diferentes populações. Os histogramas de cada amostra determinaram de forma indireta a quantidade de moléculas expressas por célula, ou seja, a intensidade de fluorescência, bem como a porcentagem de fluorescência, que determina o número porcentual de células que expressaram cada receptor específico.

3.5 Análise das Fases do Ciclo Celular de Fibroblastos em Cultura e de Fibroblastos *ex-vivo*.

Suspensões de 10^6 células de amostras de culturas de fibroblastos de pele normal e de quelóide em fase exponencial de crescimento foram imediatamente congeladas em tampão citrato (2mM) e mantidas em nitrogênio líquido, até o momento da análise. A determinação do ciclo celular foi realizada em citometria de fluxo FACScalibur (BD), utilizando a metodologia do iodeto de propídio. As suspensões celulares foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente com 30mg/ml de solução de tripsina (Difco Laboratories – USA) e em seguida com 5g/l de inibidor de tripsina (Sigma Chemical Co. – USA) e 0,1g/l de ribonuclease – A (Sigma Chemical Co. – USA). Após este período as células foram incubadas com 18mg/ml de iodeto de propídio (Sigma Chemical Co. – USA), por 15 minutos, a temperatura ambiente, seguida da análise em citometria de fluxo. A

aquisição da população celular, em média de 100.000 eventos foi realizada pelo programa “cell quest” (BD) e o conteúdo de DNA foi medido em intensidade de fluorescência (FL2), utilizando-se citômetro de fluxo FACScalibur (BD).

Após 10 dias de cultura, na fase de crescimento exponencial das células, as amostras de fibroblastos de quelóide e de pele normal foram processadas para análise das fases do ciclo celular denominadas de G0/G1, células quiescentes, não proliferativas e maduras; de S, fase de síntese do material genético; de G2/M, células com alta capacidade de proliferativa e de divisão; e de apoptose, fase subdiploide, caracterizada por morte celular programada.

Os resultados foram expressos em média porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular: apoptótica, G0/G1, S e G2/M.

As suspensões celulares foram incubadas com 250 ml de RNase e coradas com iodeto de propídio 50 mg/ml e avaliadas em um citômetro de fluxo baseado em lâmpada de mercúrio, utilizando eritrócitos de frango para calibração das células. A análise foi realizada com a identificação da população celular, em “gate”, ou quadrante definido de população celular homogênea adquirida pelo sistema de aquisição de imagem “cell quest”, procedendo-se em citômetro de fluxo FACScalibur (BD). Os histogramas de DNA foram analisados em programa de computador MOD-FIT (BD), sendo que o método permitiu avaliar, através da detecção de alterações do DNA, na ploidia, em que se encontra a célula distribuída nas fases do ciclo celular.

3.6 Análise Histopatológica.

Um fragmento representativo de cada uma das amostras foi submetido a rotina histológica, ou seja, fixado em solução de formol 10%, em tampão fosfato, embebida em parafina e submetida à cortes de 03 micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina e analisados sob microscópio de luz (Zeiss – Germany), para confirmação do diagnóstico clínico.

3.7 Análise Estatística.

A análise estatística foi realizada pelo método de Análise de Variância ANOVA seguido do teste comparativo múltiplo de TUKEY-KRAMER e KRUSKAL-WALLIS.

Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão, considerando-se como valores significantes $p < 0.05$.

<u>RESULTADOS</u>

4. RESULTADOS

4.1 Aspectos Anatomopatológicos da Cicatriz Queloideana.

O exame macroscópico mostrou epiderme de coloração acastanhada e derme de aspecto nodular, esbranquiçada e de consistência firme (Figuras 1 A e 1B).

Ao estudo microscópico a derme apresentou alta densidade de células mesenquimais, fibroblastos, com fibras colágenas dispostas em rodadoiro, gerando pequenos nódulos. Na epiderme notou-se discreta acantose.

As Figuras 2A e 2B ilustram estes achados.

Figura 1 A. Aspecto macroscópico de cicatriz quelóideana em lóbulo de orelha.

Figura 1 B. Aspecto macroscópico de cicatriz quelóideana em ombro e região dorsal.

Figura 2 A. Aspecto microscópico da pele normal. Notar derme apresentando fibras colágenas distribuídas homogeneamente sem arranjo, definidas em meio a raros fibroblastos (Coloração H E; Aumento 120x).

Figura 2 B. Aspecto microscópico do tecido da cicatriz quelóideana. Observar derme apresentando grande quantidade de fibroblastos dispostos em rodadozinho (Coloração H E; Aumento 120x).

4.2 Aspectos gerais da cultura de fibroblastos de quelóide e de pele normal.

Após 30 dias em cultura, as células aderentes foram removidas por processo de tripsinização e recultivadas em placas de cultura de fundo chato de 24 orifícios. Estas amostras foram analisadas depois de 10 dias em microscópio de luz invertido, sendo foto-documentadas.

As culturas de fibroblastos extraídos de quelóide apresentaram maior densidade celular em certos pontos da placa, formando camadas de células sobrepostas (Figura 3A). Nas amostras de pele normal, os fibroblastos apresentaram-se mais individualizados e formando uma monocamada homogeneamente distribuída (Figura 3B).

As amostras de cultura foram analisadas quanto aos arranjos dos núcleos celulares, conforme descrito no item materiais e métodos. Em relação aos fibroblastos do quelóide observamos diversidade nas formas dos núcleos celulares: núcleos em fase de morte celular por apoptose, núcleos com fragmentação e compactação da cromatina ao lado de núcleos íntegros. Estes achados são diferentes dos fibroblastos de pele normal onde não se observaram núcleos em apoptose. As Figuras 4A e 4B ilustram estes achados.

As Figuras 5A e 5B demonstram a sobreposição dos núcleos de fibroblastos de culturas de cicatriz queloideana correspondendo às camadas de células sobrepostas observadas nestes tecidos.

Figura 3 A. Aspecto da cultura de fibroblastos de cicatriz queloideana observado em microscópio de luz invertido. Fotomicrografias com aumentos de 300 e 600 vezes, respectivamente superior e inferior.

Figura 3 B. Aspecto da cultura de fibroblastos de pele normal observado em microscópio de luz invertido. Fotomicrografias com aumentos de 300 e 600 vezes, respectivamente superior e inferior.

Figura 4 A. Fotomicrografia do aspecto morfológico do núcleo celular de fibroblastos de cultura de cicatriz quelóideana corado com DAPI (4,6 – diamidino-2-fenilindol, diidrocloreto). Observa-se núcleo com condensação e fragmentação da cromatina nuclear, característico de célula em apoptose (seta). Aumento de 1720 vezes.

Figura 4 B. Fotomicrografia do aspecto morfológico do núcleo celular de fibroblasto de cultura de pele normal corado com DAPI (4,6 – diamidino-2-fenilindol, diidroclorido). Observa-se núcleo normal, com cromatina densa e ausência de fragmentação (seta). Aumento de 1720 vezes.

Figura 5 A e B. Fotomicrografias demonstrando a sobreposição dos núcleos celulares de fibroblastos (setas) de cicatriz quelóideana corados com DAPI (4,6 – diamidino-2-fenilindol,diidroclorido). Aumentos de (A) 690 vezes; (B) 1720 vezes.

4.3 Análise da expressão dos receptores de interleucina-8, CXCR1 e CXCR2, na superfície celular de fibroblastos cultivados de quelóide e de pele normal.

Amostras de fibroblastos de quelóide (n=21) e de pele normal (n=21), no 10º dia de cultivo, foram mantidas em cultura no tampão PBS (fosfato de sódio, 0,1 M, pH=7,4) suplementado com 5% de soro fetal bovino, por 24 horas. A seguir as células foram desprendidas da superfície da placa de cultura e estas suspensões celulares foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos anti-IL-8R1 (CXCR1), anti-IL-8R2 (CXCR2) e anti-fibroblasto (anticorpo específico que reconhece uma molécula de 112 kDa, expressa na superfície de fibroblastos humanos, e que não é identificada em células de sangue e em baixos níveis nas linhagens de melanoma) (Vienstra e Dowdle, 1992) e analisados por citometria de fluxo. Os resultados apresentados nas figuras 6A e 6B demonstram populações homogêneas de fibroblastos em todas as preparações do quelóide e da pele normal, respectivamente, analisada quanto ao tamanho e granulosidade, definidos pelo programa de aquisição de imagens "Cell Quest". O anticorpo anti-fibroblasto foi utilizado em todas as análises como controle positivo, apresentando média de especificidade de $93,9\% \pm 7,4$ para os fibroblastos de quelóide (Figura 6C) e de $96,5\% \pm 2,6$ para os fibroblastos de pele normal (Figura 6D). Como controle negativo foram utilizados anticorpos inespecíficos para receptores da diferenciação hematopoiética (CD3), cujos resultados não apresentaram marcação (Figura 6E).

Figura 6 A – E. Gráficos das aquisições da população de fibroblastos obtidas por citometria de fluxo com o programa “Cell Quest” (BD). **A-** Morfologia quelóide; **B-** Morfologia pele normal; **C-** Controle positivo – quelóide; **D-** Controle positivo – pele normal; **E-** Controle negativo.

4.3.1 Expressão do receptor de IL-8 CXCR1.

A média da expressão do receptor de interleucina-8 CXCR1 nos fibroblastos de quelóide foi de $35,7\% \pm 11,2$ e nos fibroblastos da pele normal foi de $44,1\% \pm 16,2$. A análise estatística não revelou diferença significativa ($p > 0,05$) na expressão do receptor R1 de interleucina-8 entre fibroblastos de quelóide e pele normal (Figuras 7A e 7 B; Tabela 2 Anexo 3).

Figura 7. Gráficos das aquisições da população de fibroblastos obtidas por citometria de fluxo com o programa “Cell Quest” (BD). Observa-se padrão diferencial dos receptores de IL-8 CXCR1 e CXCR2 na população celular de fibroblastos humanos mantidos em cultura.

A-Fibroblastos de quelóide; **B-** Fibroblastos de pele normal.

4.3.2 Expressão do receptor de IL-8 CXCR2.

Para o receptor de IL-8 CXCR2, a média da expressão, nos fibroblastos de quelóide, foi de $27,8\% \pm 11,3$ e na pele normal foi de $46,3\% \pm 27,1$.

A análise estatística revelou que a diferença foi altamente significativa, $p=0,001$ (Figuras 8A e 8B). A Tabela 3 (Anexo 4) apresenta os resultados obtidos de cada amostra individualmente.

A Figura 8C apresenta as diferentes proporções de receptores de IL-8 tipos CXCR1 e CXCR2 expressos em fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal.

Figura 8. Gráficos das aquisições da população de fibroblastos obtidas por citometria de fluxo com o programa “Cell Quest” (BD). Observa-se padrão diferencial dos receptores de IL-8 CXCR2 e CXCR1 na população de fibroblastos cultivados de cicatriz quelóideana. **A-** Fibroblastos de quelóide; **B-** Fibroblastos de pele normal; **C-** Gráfico das médias das expressões dos receptores CXCR1 e CXCR2 e análise estatística comparativa de variância de ANOVA (** $p < 0.001$).

4.4 Análise da atividade proliferativa de fibroblastos cultivados de cicatriz quelóideana e de pele normal

4.4.1 Ciclo celular de fibroblastos de cicatriz quelóideana em cultura.

A distribuição quanto ao ciclo celular dos fibroblastos de cicatriz quelóideana em cultura, analisados em citometria de fluxo, mostrou uma pequena proporção de células em apoptose ($9,6\% \pm 6,0$); na fase G0/G1, uma maior proporção de células quiescentes ($41,3\% \pm 10,2$); na fase S, uma proporção de $10,5\% \pm 2,6$; e na fase G2/M, ou proliferativa, encontraram-se $27,5\% \pm 13,9$ das células (Figuras 9 A e B). Os dados individuais de cada paciente estão apresentados na Tabela 4 (Anexo 5).

Figura 9. Porcentagem da distribuição da população celular nas fases do ciclo celular das amostras de fibroblastos de cicatriz quelóideana mantidos em cultura. **A**-Imagem da aquisição das fases do ciclo celular em citometria de fluxo; **B**-Médias das populações nas fases do ciclo celular. *** $p < 0.0001$

4.4.2 Ciclo celular dos fibroblastos de pele normal em cultura.

A análise da distribuição dos fibroblastos de pele normal em cultura quanto ao ciclo celular mostrou: uma pequena proporção de células na fase subdiploide, ou em apoptose ($4,3\% \pm 2,1$); na fase G0/G1, células quiescentes, uma grande proporção de células ($43,1\% \pm 13,7$); na fase S, ou de síntese, uma proporção de $8,3\% \pm 1,1$; na fase G2/M, fase proliferativa, encontraram-se $24,8\% \pm 11,6$ das células (Figura 10 A e B). Os dados individuais de cada paciente estão apresentados na Tabela 5 (Anexo 6).

Figura 10. Porcentagem da distribuição da população celular nas fases do ciclo celular das amostras de fibroblastos de pele normal mantidos em cultura. **A**-Imagem da aquisição das fases do ciclo celular em citometria de fluxo; **B**-Gráfico das médias das populações nas fases do ciclo celular.

4.4.3. Análise comparativa do ciclo celular de fibroblastos cultivados de cicatriz quelóideana e de pele normal.

A comparação dos dados das amostras de fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal, pelo teste estatístico de variância ANOVA, revelou diferenças significantes entre as proporções celulares nas diferentes fases do ciclo celular. Nossos resultados mostraram diminuição altamente significativa da proporção de fibroblastos da cicatriz quelóideana nas fases G0/G1 e G2/M do ciclo celular ($p < 0.001$), comparada à pele normal. A Tabela 6 mostra a média das proporções celulares nas diferentes fases do ciclo celular e os resultados das comparações estatísticas.

Tabela 6. Comparação das fases do ciclo celular de fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal mantidos em cultura.

Fases do Ciclo celular				
Fibroblastos	Apoptose	G0/G1	S	G2/M
cultivados	X $\pm$ DP	X $\pm$ DP	X $\pm$ DP	X $\pm$ DP
Pele Normal (n=10)	2.0 $\pm$ 0.85	59.3 $\pm$ 12.3	6.9 $\pm$ 4.9	32.3 $\pm$ 6.9
Cicatriz Quelóideana (n=10)	6.5 $\pm$ 2.6 (n.s.)	40.5 $\pm$ 7.9 ***p<0.001	11.5 $\pm$ 2.0 (n.s.)	17.9 $\pm$ 6.0 *** p<0.001

* Diferença estatística (Teste de Variância de ANOVA)

n.s. = não significativo

X = média

D.P. = desvio padrão.

4.5 Análise da atividade proliferativa de fibroblastos *ex-vivo* de cicatriz queloidiana e de pele normal.

Após a ressecção cirúrgica, as amostras foram imediatamente congeladas e mantidas em nitrogênio líquido, conforme descrito por Vindelov e Christensen (1990). As amostras de cicatriz queloidiana *ex-vivo* foram divididas em porções central e periférica e processadas para a análise do conteúdo e da qualidade do DNA, por citometria de fluxo.

4.5.1 Ciclo celular de fibroblastos *ex-vivo* da porção central de cicatriz queloidiana.

A análise do ciclo celular revelou que $7,1\% \pm 2,1$ dos fibroblastos estavam na fase de apoptose; que $59,7\% \pm 8,1$ estavam na fase quiescente G0/G1; que $4,7\% \pm 2,9$ estavam na fase de síntese S; que $35,6\% \pm 7,0$ das células estavam na fase proliferativa G2/M (Figura 11 A e B). Os dados individuais de cada paciente estudado estão apresentados na Tabela 7 (Anexo 7).

Figura 11. Distribuição dos fibroblastos *ex-vivo* nas diferentes fases do ciclo celular da porção central de cicatriz queloideana. **A-** Imagem obtida por citometria de fluxo com o programa MOD-FIT (BD); **B-** Gráfico das médias das populações nas fases do ciclo celular.

4.5.2. Ciclo celular de fibroblastos *ex vivo* da porção periférica da cicatriz quelóideana.

Nas amostras obtidas da periferia da lesão, as células encontravam-se assim distribuídas: $4,9\% \pm 1,9$ na fase apoptótica; $53,5\% \pm 11,8$ na fase quiescente G0/G1; $22,9\% \pm 11,6$ na fase de síntese S; $18,6\% \pm 12,0$ estavam na fase proliferativa G2/M (Figura 12 A e B). Os dados individuais estão apresentados na Tabela 8 (Anexo 8).

Figura 12. Distribuição dos fibroblastos *ex- vivo* nas diferentes fases do ciclo celular da porção periférica de cicatriz queloideana. **A-** Imagem obtida por citometria de fluxo com o programa MOD-FIT (BD); **B-** Gráfico das médias das populações nas fases do ciclo celular.

4.5.3 Análise comparativa do ciclo celular de fibroblastos ex-vivo das porções central e periférica de cicatriz quelóideana.

Comparando-se as porções central e periférica do quelóide observamos diferenças estatisticamente significantes. A porção periférica do quelóide mostrou quantidade significativamente menor de fibroblastos na fase G2/M ($p < 0,001$) e quantidade significativamente maior de fibroblastos na fase S ($p < 0,001$). Nas outras fases do ciclo celular não foram observadas diferenças significantes entre os fibroblastos da porção central e periférica do quelóide (Tabela 9).

Tabela 9. Análise estatística das fases do ciclo celular dos fibroblastos das porções central e periférica de cicatriz quelóideana.

Fases do Ciclo celular				
Fibroblastos	Apoptose	G0/G1	S	G2/M
Cicatriz	X ± DP	X ± DP	X ± DP	X ± DP
Quelóideana				
Porção Central (n=10)	7.0 ± 2.1	59.7 ± 8.1	4.7 ± 2.9	35.6 ± 7.0
Porção Periférica (n=10)	4.9 ± 1.9 (n.s.)	53.5 ± 11.8 (n.s.)	22.9 ± 11.6 ***p<0.001	18.6 ± 12.0 ***p<0.001

* Diferença estatística (Teste de Variância de ANOVA) p<0.05.

n.s. = não significativo

X = média

D.P. = desvio padrão.

4.5.4. Ciclo celular de amostras *ex-vivo* de fibroblastos de pele normal.

Os resultados da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular mostraram na pele normal uma pequena proporção de células em apoptose $2,0\% \pm 0,86$. A proporção de células na fase G0/G1 foi de $59,2\% \pm 12,3$. A fase S apresentou $6,8\% \pm 4,9$, enquanto que na fase G2/M, ou proliferativa, observamos uma proporção de $32,3\% \pm 6,9$ (Figura 13 A e B). A tabela 10 (Anexo 9) apresenta os dados individuais das amostras de pele normal.

Figura 13. Distribuição dos fibroblastos de pele normal *ex-vivo* nas diferentes fases do ciclo celular. **A-** Imagem obtida por citometria de fluxo com o programa MOD-FIT (BD); **B-** Gráfico das médias das populações nas fases do ciclo celular.

4.5.5. Análise comparativa do ciclo celular de amostras *ex-vivo* de cicatriz quelóideana e de pele normal.

A análise comparativa entre os fibroblastos *ex-vivo* das porções central e periférica da cicatriz quelóideana de pele normal quanto à distribuição nas fases do ciclo celular está apresentada na Tabela 11. Observamos maior proporção de apoptose na porção central, entretanto a análise estatística não revelou diferença significativa entre as porções central ($7,0\% \pm 2,1$) e periférica ($4,9\% \pm 1,9$). Quando comparamos a porcentagem de apoptose dos fibroblastos *ex-vivo* das porções central e periférica do quelóide com a pele normal ($2,0\% \pm 0,86$), observamos diferença significativa. A porcentagem de células apoptóticas nas porções central e periférica foi significativamente maior que na pele normal.

Na fase quiescente (G0/G1), não foi observada diferença significativa entre os fibroblastos da pele normal e das porções central e periférica da cicatriz quelóideana.

A fase S mostrou diferença altamente significativa, sendo maior na porção periférica ($22,9\% \pm 11,6$) em relação à porção central ($4,7\% \pm 2,9$) da cicatriz quelóideana. Não houve diferença significativa entre a porção central e pele normal.

A análise da fase G2/M mostrou que a porção periférica da cicatriz quelóideana apresenta menor ($18,6\% \pm 12,0$) proporção de células em comparação à porção central ($35,6\% \pm 7,0$) e à pele normal ($32,3\% \pm 6,9$).

Tabela 11. Distribuição porcentual e nas fases do ciclo celular e diferenças estatísticas entre amostras de fibroblastos de pele normal e das porções central e periférica de cicatrizes queloidianas ex-vivo.

Fases do Ciclo Celular	Fibroblastos ex vivo		
	Pele Normal (%) X ± DP	Cicatriz Queloidiana Porção Central (%) X ± DP	Cicatriz Queloidiana Porção Periférica (%) X ± DP
Apoptose	2,0 ± 0,8	7,0 ± 2,1 ***p< 0.0001	4,9 ± 1,9 **p< 0.001
G0/G1	59,2 ± 12,3	59,7 ± 8,1 (n.s.) p= 0.897	53,5 ± 11,8 (n.s.) p= 0.455
S	6,8 ± 4,9	4,7 ± 2,9 (n.s.) p= 0.272	22,9 ± 11,6 ** p= 0.001
G2/M	32,3 ± 6,9	35,6 ± 7,0 (n.s.) p= 0.357	18,6 ± 12,0 ** p< 0.001

* Diferença estatística (Teste de Variância de Kruskal Wallis) p<0.05.

n.s. = não significativo

X = média

D.P. = desvio padrão.

4.6. Análise comparativa da capacidade proliferativa (Somatória G2/M e S) dos fibroblastos de cicatriz quelóideana e de pele normal.

A análise estatística da capacidade da resposta de proliferação (G2/M+S) dos fibroblastos de pele normal mantidos em cultura não diferiu significativamente dos fibroblastos da lesão quelóideana. A proporção de células na fase quiescente (G0/G1) dos fibroblastos da cicatriz quelóideana foi significativamente menor que nos fibroblastos de pele normal (Tabela 12).

A capacidade proliferativa (G2/M+S) e a fase quiescente dos fibroblastos *ex vivo* não mostraram diferenças significantes entre as amostras de pele normal e das porções central e periférica da cicatriz quelóideana (Tabela 13).

Quando comparamos os resultados dos fibroblastos nas diferentes condições experimentais, cultura e *ex-vivo*, entre amostras da cicatriz quelóideana e pele normal, verificamos que a condição *ex vivo* melhor traduziu o experimento, pois observamos um aumento em torno de 1,5 vez ($p < 0.001$) na proporção de células na fase G2/M+S e fase G0/G1 das amostras *ex-vivo* da cicatriz quelóideana ($p < 0.001$) (Tabela 14).

A resposta de capacidade proliferativa dos fibroblastos extraídos *ex vivo* comparada aos fibroblastos cultivados foi melhor expressa, pois na condição *ex-vivo* pudemos observar a grande capacidade de síntese dos fibroblastos quelóideanos da periferia, bem como sua maior velocidade proliferativa. Os fibroblastos *ex vivo* da periferia também apresentaram pequena proporção de células na fase G2/M (Tabelas 4, 5 e 8 em anexos).

Tabela 12. Análise comparativa da capacidade proliferativa (G2/M + S) e da fase quiescente (G0/G1) das populações celulares das amostras de pele normal e de cicatriz quelóideana, mantidas em cultura.

Fibroblastos	Capacidade Proliferativa G2/M + S X ± DP	Fase Quiescente G0/G1 X ± DP
Cultura Pele Normal	43.0±13.7	33.1 ± 11.1
Cultura Cicatriz Quelóideana	41.3 ± 10.2	38.7 ± 14.1
	(n.s) p=0.54	(n.s) p=0.17

* Diferença estatística (Teste de Variância de Kruskal- Wallis) p<0.05.

n.s. = não significativo

X = média

D.P. = desvio padrão.

Tabela 13. Análise comparativa da capacidade proliferativa (G2/M + S) e da fase quiescente (G0/G1) das populações de fibroblastos *ex-vivo* das amostras de pele normal e das porções central e periférica da cicatriz quelóideana.

Fibroblastos	Capacidade Proliferativa	Fase Quiescente
	G2/M + S X ± DP	G0/G1 X ± DP
Ex-Vivo Pele Normal	39.2 ± 9.4	59.2 ± 12.3
Ex-Vivo Cicatriz Quelóideana Porção Central	40.4 ± 8.2	59.7 ± 8.1
Ex-Vivo Cicatriz Quelóideana Porção Periférica	41.6 ± 11.6	53.5 ± 11.8
	(n.s) p>0.05	(n.s) p>0.05

* Diferença estatística (Teste de Variância de Kruskal Wallis)

n.s. = não significativo

X = média

D.P. = desvio padrão

Tabela 14. Análise comparativa da capacidade proliferativa (G2/M + S) e da fase quiescente (G0/G1) entre fibroblastos cultivados e extraídos ex-vivo da cicatriz queloidiana.

Fibroblastos Cicatriz Queloideana	Capacidade Proliferativa (G2/M + S) X ± DP	Fase Quiescente (G0/G1) X ± DP
Cultura	38.7± 14.1	41.3 ± 10.2
Ex- Vivo	41.8 ± 9.9	56.6 ± 9.5
	*** p<0.001	*** p<0.001

* Diferença estatística (Teste de Variância de ANOVA seguido de Tukey-Kramer)

X = média

D.P. = desvio padrão

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Sistemas de cultura de células têm fornecido informações sobre o comportamento celular e auxiliado no esclarecimento de vários processos biológicos e patológicos, como para investigar o crescimento dos fibroblastos do quelóide e a produção de proteínas da matriz extracelular (Clark et al., 1995; Xu e Clark, 1996). Culturas de fibroblastos exibem características típicas de seu fenótipo in vivo: fibroblastos de quelóide continuam a produzir quantidades excessivas de colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanos. Nestas condições podem sofrer os efeitos da ação de moduladores metabólicos, como glicocorticóides, fatores de crescimento e substâncias mitogênicas (Tuan et al., 1991; Babu et al., 1992; Mukaida et al., 1992; Myles et al., 1992; Antilla et al., 1992; Russell et al., 1995; Tuan e Nichter, 1998). Estudos de cinética celular demonstraram que fibroblastos de quelóide não diferem dos fibroblastos de pele normal quando crescem em cultura na presença de soro fetal bovino (Russell e Witt 1976). Sob condições de privação de soro, as células da cicatriz queloidiana mostram maior crescimento que os fibroblastos normais, sugerindo que fatores de crescimento presentes no soro interferem na atividade proliferativa dos fibroblastos (Koch et al., em 1997, Wang et al., 2004). Diferentemente desses autores observamos que os fibroblastos do quelóide, mantidos em meio de cultura Ham-F12 suplementado com soro fetal bovino, apresentaram maior velocidade de crescimento que os da pele normal. Durante o crescimento do cultivo dos fibroblastos queloidianos observamos,

em alguns pontos, maior densidade celular, com perda de organização e formando confluências nodulares, como apresentado nas Figuras 4A e 4B. O mesmo foi observado por Nakaoka et al. (1995) e Ueda et al. (1999). Estes achados estão em acordo com o estudo de Kischer (1984), que demonstrou em microscopia eletrônica a presença de subtipos estruturais de fibroblastos em cicatriz quelóideana, com diferentes capacidades proliferativas, com predominância de fibroblasto ativo. Estudo de expressão gênica também sugere a presença de diferentes tipos de fibroblastos no quelóide (Sato et al., 1998). Outros estudos verificaram que os fibroblastos de quelóide produziram mais colágeno e outros componentes de matriz, que fibroblastos da derme normal, decorrente de sua excessiva capacidade proliferativa (Cohen et al., 1971; Craig, 1975; Calderon et al., 1996).

Conway et al. (1959, 1960) sugeriram a existência de duas populações distintas de fibroblastos relacionadas à atividade metabólica e seu aspecto morfológico no quelóide, denominadas de tipo I, correspondendo a pequenos fibroblastos com alta atividade metabólica e tipo II, grandes fibroblastos, com baixa atividade metabólica, encontrada em lesões quiescentes.

Para avaliar a real capacidade proliferativa dos fibroblastos do quelóide, realizamos avaliação do ciclo celular, por citometria de fluxo, de amostras mantidas em cultura. Verificamos que a capacidade de replicação (fase S do ciclo celular) dos fibroblastos quelóideanos, após a fase de confluência, foi maior que aqueles da pele normal, entretanto essa diferença não foi significativa. Esse achado pode ser decorrente da ação de

substâncias presentes no meio de cultura, como o soro fetal bovino. Corroborando com esse achado, observamos que os fibroblastos cultivados da cicatriz quelóideana apresentaram redução significativa de células na fase quiescente (G0/G1) e maior proporção na fase G2/M. Esses dados sugerem que os fibroblastos do quelóide apresentam maior capacidade de replicação com maior velocidade de divisão e/ou morte celular programada. Assim, verificamos também maior proporção de apoptose nos fibroblastos do quelóide, entretanto essa diferença não foi significativa. Esse conjunto de dados não significantes observados entre fibroblastos cultivados de quelóide e de pele normal, poderia ser explicado pelo tipo de amostragem que foi obtida (não separação entre as porções central e periférica da lesão) ou devido à presença de soro fetal bovino no meio de cultivo. Neste sentido, conhecendo a metodologia de Vindelov, que permite o estudo cinético e as relações quantitativas e qualitativas de DNA sem influência dos meios de cultivo, optamos por estudar a cinética celular em fibroblastos extraídos ex vivo. Para tal, obtivemos fibroblastos da pele normal e das porções central e periférica da cicatriz quelóideana.

O estudo do ciclo celular por citometria de fluxo dessas amostras ex vivo mostrou que os fibroblastos da porção periférica apresentaram porcentagem significativamente maior de células com capacidade replicativa, fase S do ciclo, em relação à porção central e à pele normal. Esses fibroblastos periféricos também apresentaram maior velocidade de divisão celular e/ou apoptose, indicando que as células da porção periférica do quelóide parecem ser responsáveis pela elevada taxa de proliferação,

apoptose e contínua síntese de colágeno. Essas características justificam o crescimento expansivo a partir das margens da cicatriz queloideana, com desenvolvimento de lesão semelhante a tumor e porção central fibrótica com células quiescentes e apoptóticas.

Esses resultados corroboram os achados dos autores anteriormente citados, que demonstraram diferentes subtipos de fibroblastos no quelóide, podendo justificar o comportamento biológico diferente destas células, confirmando nossas suspeitas levantadas quando do estudo dos fibroblastos cultivados. Calderon et al. (1996), também referem maior capacidade proliferativa dos fibroblastos queloideanos em modelo de cicatrização “in vitro” em ensaios de incorporação de timidina-³H.

Nakaoka et al. (1995) utilizando o marcador PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular), em cortes de parafina, também demonstraram alta densidade e índice proliferativo dos fibroblastos de cicatriz queloidena em relação à pele normal. Chen et al. (2003) também mostraram maior expressão de genes relacionados às proteínas de matriz extracelular, à fatores de crescimento, à capacidade proliferativa e às vias de apoptose nos fibroblastos do quelóide.

Em relação a apoptose, observamos nas culturas de fibroblastos de quelóide a presença de núcleos em diferentes aspectos morfológicos de apoptose, o que não foi encontrado nos fibroblastos cultivados de pele normal, como mostra as Figuras 3A e 3B. Suspeitamos da maior porcentagem de apoptose no estudo do ciclo celular dos fibroblastos cultivados e confirmamos com o estudo dos fibroblastos ex vivo. A cicatriz

quelóide, principalmente a porção central, apresentou maior proporção de apoptose que a pele normal. Nossos resultados contestam os obtidos por Akasaka et al. (2001), que demonstraram em análise de fragmentação do DNA em cortes de parafina, um significativo aumento das células em apoptose na porção periférica do quelóide. Esses autores contaram número de células em apoptose por campo, comparando área hipercelular da porção periférica com área hipocelular da porção central. O resultado desses autores representa um viés metodológico por considerar o número de células apoptóticas por campo e não a porcentagem de células apoptóticas na amostra.

Assim, comparando-se as duas condições experimentais, fibroblastos mantidos em cultura e amostras *ex vivo*, nossos resultados mostraram que a distribuição das populações de células nas diferentes fases do ciclo celular foi semelhante nas duas metodologias. Entretanto, observamos que as amostras *ex vivo* mostraram maior rendimento, favorecendo o estudo cinético e a observação das diferenças suspeitadas, representando melhor o comportamento biológico da cicatriz quelóideana.

Evidências recentes suportam o conceito de que lesões proliferativas e o crescimento tumoral "in vivo" dependem da evasão dos mecanismos homeostáticos de controle que operam vias de indução de morte celular por apoptose (Bergers et al., 1997). A indução de apoptose, seja através de mecanismos imunológicos ou por outros mecanismos homeostáticos específicos, como os modulados por fatores de crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias, parece ser extremamente importante no processo de

eliminação de tipos celulares específicos. Danos não reparáveis no DNA causados por mutações, infecções virais, metabólitos intermediários, radicais livres, mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento, aparentemente iniciam ou interferem em uma das etapas do processo de apoptose. É importante salientar que muitos dos genes que condicionam a proliferação celular, oncogenes e os genes supressores de tumores, estão também envolvidos na iniciação do processo de apoptose e que a inibição por si só do processo fisiológico da apoptose leva à sobrevivência prolongada e a manutenção das células. Assim, a apoptose representa um dos mecanismos de eliminação seletiva de células cuja sobrevivência poderia prejudicar o bem estar do organismo.

Appleton et al., em 1996, demonstraram por técnicas imunohistoquímicas e pela marcação fluorescente do DNA uma progressiva degeneração celular no quelóide, caracterizada por núcleos celulares com aspecto apoptótico, em relação ao fibroblasto dérmico normal. Na região central da cicatriz quelóideana não observaram células em fase proliferativa pela marcação dos núcleos pelo PCNA. Seus resultados sugerem que na cicatriz quelóideana ocorre simultaneamente proliferação, apoptose e necrose de formas distintas nas porções central e periférica. Nossos resultados também são concordantes uma vez que observamos maior porcentagem de apoptose na porção central e maior capacidade replicativa na porção periférica.

Akasaka et al. (2005) encontraram baixos níveis de apoptose em fibroblastos de cicatriz quelóideana em fase precoce da cicatrização,

comparando com outros padrões cicatriciais. Entretanto, estes níveis persistiam além da fase de maturação e remodelagem cicatricial, estendendo a fase proliferativa, e conseqüentemente resultando em excesso tecidual no quelóide.

A expressão diferencial de genes pela técnica de “cDNA microarray” entre os tecidos da pele normal e de quelóide foi estudada por Chen et al. (2003), que demonstraram no tecido queloideano a elevação da expressão das vias de transcrição NF κ B que supostamente controlam a apoptose e a inflamação, que são importantes fatores envolvidos no reparo e remodelagem tecidual. Dentre estes genes incluem-se citocinas pró-inflamatórias com a IL-1, TNF α , IL-6 e genes anti-apoptóticos (TRAF-1 e 2, IAP-1 e 2 e XIAP).

A reparação de uma ferida, qualquer que seja o agente determinante, é a finalidade primária do processo inflamatório. A seqüência das alterações vasculares e celulares que ocorrem, visam devolver a região às mesmas condições existentes antes da agressão. De uma forma geral, a resposta inflamatória imediata à lesão caracteriza-se pelo influxo local de leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, liberando citocinas pró-inflamatórias, vários outros fatores de crescimento e mediadores quimiotáticos.

Nesta etapa, diversos mediadores são sintetizados e liberados, os fatores de crescimento produzidos durante a reparação e regeneração, como o fator de crescimento transformante β (TGF- β) exercem diversas atividades que possivelmente estão implicadas, por exemplo, na quimiotaxia,

na mitogênese de precursores celulares, além de estimular a deposição de matriz de colágeno no processo de cicatrização (Shah et al., 1992; Szulgit et al., 2002; Lebrin et al., 2005).

Os fatores de crescimento são polipeptídeos promotores da proliferação celular, que interagem com receptores específicos de membrana, induzindo a mudanças intracelulares, que preparam a célula para a síntese de DNA, multiplicação, migração e quimiotaxia (McGrath, 1990). O TGF- β é considerado uma molécula multifuncional, capaz de estimular ou inibir a proliferação, diferenciação e outros processos de várias linhagens celulares. É produzido e liberado por fibroblastos, plaquetas, macrófagos, linfócitos, células ósseas, renais e da placenta, entre outras. Durante o processo inflamatório, o TGF- β tem ação anabólica induzindo a síntese de componentes da matriz extracelular (MEC), fibrose e a angiogênese. O TGF- β aumenta a síntese de outras proteínas da MEC, como a fibronectina e proteoglicanos, inibe a produção de collagenase, bem como estimula a produção dos inibidores de metaloproteinases teciduais, TIMP I e TIMP II (Overal et al., 1989).

Durante o processo de cicatrização fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias estimulam os fibroblastos a migrarem numa matriz provisória, onde eles proliferam e reconstituem a matriz extracelular rica em colágeno (Martin, 1997). O aumento gradual da resistência tecidual pelas forças de tração dos fibroblastos é essencial para sua evolução em miofibroblastos, que ativa o fechamento da ferida por contração. Assim que o epitélio recobre a ferida, os miofibroblastos normalmente desaparecem por

apoptose e o tecido de granulação se transforma em cicatriz contendo poucas células. Os miofibroblastos tem papel chave na fisiologia da cicatrização e nas condições patológicas como nas diferentes formas de fibrose e desmoplasia (Gabbiani 2003). O primeiro fator que atua na transformação de fibroblastos para miofibroblasto é o TGF- β 1, atuando tanto por via parácrina, liberado por células inflamatórias ou epiteliais, como por via autócrina (Werner and Grose 2003). Outros fatores, como as forças mecânicas de resistência tecidual, exercem forças de tensão sobre o citoesqueleto do fibroblasto, modulando a diferenciação do mesmo.

Younai et al. (1994) demonstraram haver maior sensibilidade do fibroblasto quelóideano ao TGF- β , gerando neste tecido maior razão de proliferação e síntese de colágeno, comparativamente ao fibroblasto da pele normal. Estes autores creditaram esta resposta pelo estímulo do TGF- β a diferenças nos receptores de membrana específicos, em sua interação e possivelmente na via de sinalização intracelular. Bettinger et al., em 1993, haviam descrito não somente o efeito do TGF- β sobre a síntese de colágeno, mas também sua ação sobre a proliferação do fibroblasto.

Assim, a cicatrização do tecido conjuntivo e a diferenciação do fibroblasto em miofibroblasto são moduladas localmente pelo microambiente, incluindo importantes interações entre citocinas da cicatrização e forças mecânicas. Ping Ng et al. (2005) sugeriram que o microambiente biofísico, que frequentemente precede a fibrose, como edema, permeabilidade vascular e drenagem linfática aumentadas, fatores envolvidos no fluxo de fluido intersticial, podem por si só ter importante papel na fibrogenese.

Boxman et al (1996) relataram que os fibroblastos da derme regulam os níveis de IL-6 e IL-8, induzidos por IL-1 dos queratinócitos, através da internalização e degradação intracelular dos receptores de IL-1. A quantidade de citocinas produzidas pelo fibroblastos é 2 a 3 vezes maior do que produzida pelos queratinócitos, sugerindo um importante papel dos fibroblastos na geração da resposta inflamatória. Assim, os fibroblastos podem estar envolvidos na redução da resposta inflamatória por reduzir os níveis de IL-1, principalmente por mediação do receptor de IL-1.

A IL-8 é super-expressa pelos fibroblastos durante o desenvolvimento do tecido de granulação, estimulando a deposição precoce de tenascina e colágeno I, acelerando assim o processo de cicatrização (Feugate et al., 2002). A IL-8 age na função e recrutamento das células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos. A IL-8 aumenta as junções tipo fenda ("gap") entre os fibroblastos no tecido de granulação, aumentando assim a velocidade de maturação tecidual (Moyer et al., 2002). A IL-8 reduz significativamente a replicação dos queratinócitos, não alterando a replicação dos fibroblastos. Níveis elevados de IL-8 podem ser encontrados durante cicatrização retardada, contribuindo diretamente para o retardo do fechamento da lesão (Iocono et al., 2000).

Os alvos moleculares para as quimiocinas são seus receptores de superfície celular. Em neutrófilos foram identificados dois receptores para a IL-8, sendo um denominado CXCR1, que tem alta afinidade apenas para a IL-8, e um segundo receptor, denominado CXCR2, que tem afinidade para a IL-8 e outras CXC (Murphy et al., 2000). Vários estudos demonstraram que

outras quimiocinas também se ligam a eles de forma competitiva com a IL-8 (Fator estimulante de crescimento de melanoma – MGSA e proteína ativadora de neutrófilo 2 – NAP-2) (Moser et al., 1991).

Em nosso estudo constatamos expressão muito reduzida dos receptores para a IL-8, tanto CXCR1 como CXCR2, em fibroblastos de cicatriz quelóideana, comparando-se com os fibroblastos da pele normal. Entretanto, essa diferença só foi significativa para o receptor CXCR2. Esse achado poderia ser decorrente da atividade de várias classes de metaloproteinases e serinoproteinases, que regulam a expressão de proteínas da superfície celular, através de clivagem enzimática. Khandaker et al (1999) observaram a liberação de fragmentos clivados da região carboxi-terminal do receptor CXCR1 por essas proteinases em neutrófilos.

A internalização e a reciclagem de receptores da IL-8 mostrou importante função reguladora no curso da resposta inflamatória aguda, conforme demonstrado em neutrófilos em estudo por Zaslaver et al. (2001). Schmidt e Hall (1998) descreveram que a integridade funcional da membrana plasmática é mantida por filamentos de actina em seu citoesqueleto. O tráfico de vesículas através da membrana necessita do rearranjo ativo destes filamentos de actina, permitindo a redistribuição de receptores na membrana celular. Durante um processo normal de inflamação/cicatrização a habilidade para a internalização e reciclagem dos receptores CXCR1 e CXCR2 está relacionada diretamente à concentração da IL-8. No sítio da inflamação onde há elevada concentração da IL-8, ocorre maior expressão do receptor CXCR1 induzindo quimiotaxia (Wolf et

al., 1998). O receptor CXCR2 é ativado no início do processo inflamatório, na fase de migração do neutrófilo, e necessita menor concentração de interleucina-8, em torno picomoles, distante do foco da inflamação (Chuntharapai e Kim, 1995).

Em células de linhagens renais embrionárias humanas (HEK 293) e linhagens de linfócitos pré-B (300-19), foi demonstrada importante função dos filamentos de actina na regulação e reciclagem na membrana plasmática dos receptores CXCR1 e CXCR2. Estes processos são decorrentes da afinidade entre os receptores e os filamentos de actina, localizada no domínio carboxi-terminal destes receptores (Zaslaver et al., 2001).

Os dados acima relatados e o fato dos fibroblastos de cicatriz quelóideana apresentarem baixa expressão de actina músculo liso (Lee et al., 2004) poderiam ser responsáveis em parte pela baixa expressão dos receptores da IL-8 na cicatriz quelóideana. Ainda, não podemos esquecer que a matriz extracelular teria importante ação sobre os fibroblastos, como relatado por Arora et al. (1999). Esses autores verificaram que o aumento de actina músculo liso no fibroblasto induzida pelo TGF- β 1 é dependente da resistência do substrato em deformar e que a geração de tensão intracelular é um determinante central para a expressão gênica do citoesqueleto contrátil.

Comparando os níveis de expressão dos receptores da IL-8 na superfície celular de fibroblastos de pele normal e de cicatriz quelóideana, nossos resultados mostraram que a redução diferencial dos tipos de

receptores possivelmente pode ser determinada pelo tipo, aguda ou crônica, e intensidade da resposta inflamatória, bem como pela variação na regulação e reciclagem (“turn over”) destes receptores na superfície da membrana celular ou mesmo pela remodelagem celular que ocorre durante o processo de cicatrização.

Finalizando, podemos concluir que a cicatriz quelóideana apresenta duas populações de fibroblastos, distintas quanto à distribuição nas fases do ciclo celular, com maior proliferação na periferia e maior proporção de apoptose na porção central, provavelmente decorrente da redução dos receptores de IL-8 nos fibroblastos, bem como da alteração de suas interações com fatores solúveis e com a matriz extracelular.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1. A análise por citometria de fluxo dos receptores de membrana celular da IL-8 de fibroblastos cultivados mostrou expressão diminuída do receptor CXCR2 na cicatriz quelóideana, em comparação à pele normal.

6.2. A análise das fases do ciclo celular dos fibroblastos cultivados mostrou diminuição da proporção de células nas fases quiescente e de divisão celular dos fibroblastos da cicatriz quelóideana.

6.3. A análise das fases do ciclo celular dos fibroblastos *ex vivo* mostrou maior capacidade replicativa das células da periferia e maior proporção de apoptose das células da porção central da cicatriz quelóideana, em relação à pele normal.

6.4. Em relação às diferentes condições experimentais dos fibroblastos analisados, verificamos que as amostras *ex vivo* melhor traduziram a distribuição nas fases do ciclo celular, representando o comportamento biológico da cicatriz quelóideana, com resposta proliferativa na periferia e apoptótica na porção central.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE ACORDO COM:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirement for Manuscripts Submitted Biomedical Journals (The Vancouver Style) JAMA 1997; 277: 927-34.

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus, 2001.

Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi

www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html

ABERGEL, R.P.; PIZURRO, D.; MEEKER, C.A.; LASK, G.; MATSUOKA, L.Y.; MINOR, R.R.; CHU, M.; UITTO, J. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. **The Journal of Investigative Dermatology**, 84:384-90, 1985.

AKASAKA, Y.; FUJITA, K.; ISHIKAWA, Y.; ASUWA, N.; INUZUKA, K.; ISHIHARA, M.; ITO, M.; MASUDA, T.; AKISHIMA, Y.; ZHANG, L.; ITO, K.; ISHII, T. Detection of apoptosis in keloids and a comparative study on apoptosis between keloids, hypertrophic scars, normal healed flat scars, and dermatofibroma. **Wound Repair and Regeneration**, 9:501-6, 2001.

AKASAKA, Y.; ITO, K.; FUJITA, K.; KOMIYAMA, K.; ONO, I.; ISHIKAMA, Y.; SATO, H.; ISHII, T. Activated caspase expression and apoptosis increase in keloids: cytochrome c release and caspase-9 activation during the apoptosis of keloid fibroblast lines. **Wound Repair and Regeneration**, 13:373-82, 2005.

ANTTILA, H.S.I.; REITAMO, S.; CESKA, M.; HURME, M. Signal transduction pathways leading to the production of IL-8 by human monocytes are differentially regulated by dexamethasone. **Clinics in Experimental Immunology**, 89, 509-12, 1992.

APPLETON, I.; BROWN, N.J.; WILLOUGHBY, D.A. Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids. **American Journal of Pathology**, 149:1441-47, 1996.

ARORA, P.D.; NARANI, N. AND MCCULLOCH. The compliance of collagen gels regulates TGF β induction of α -SMA in fibroblasts. **Am J Pathol** 154:871-882, 1999.

ATIYEH, BS.; COSTAGLIOLA, M.; HAYEK, SN. Keloid or Hypertrophic Scar: The Controversy: Review of the Literature. **Ann Plast Surg** 54:676-680, 2005.

BABU, M.; DIEGELMANN, R.; OLIVER, N. Keloid fibroblasts exhibit and altered response to TGF- β . **Journal of Investigative Dermatology**, 99:650-55, 1992.

BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. **Journal of Clinical Investigation**, 84:1045-49, 1989.

BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clinics in Plastic Surgery**, 17: 433-42, 1990.

BERGERS, E.; BAAK, J.P.A.; VAN DIEST, P.J.; VAN GORP, L.H.M.; KWEE, W.S.; LOS, J.; PETERSE, H.L.; RUITTENBERG, H.M.; SCHAPERS, R.F.M.; SOMSEN, J.G.; VAN BEEK, M.W.P.M.; BELLOT, S.M.; FUNHEER, J. Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1,301 breast cancer patients: results from the multicenter morphometric mammary carcinoma project (MMMCP). **International Journal of Cancer**, 74:260-69, 1997.

BERMAN, B. & BIELEY, H. Keloids. **Journal of American Academy of Dermatology**, 33: 117-23, 1995.

BETTINGER, D.A.; YAGER, D.R.; DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K. The effects of transforming growth factor beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. **Surgical Forum**, 44:717-19, 1993.

BISCHOFF, S.C.; BAGGIOLINI, M.; DE WECK, A.L.; DAHINDEN, C.A. Interleukin-8 -inhibitor and inducer of histamine and leukotriene release in human basophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 179:628-33, 1991.

BLOCH, EF.; HALL, MG JR.; DENSON, MJ.; SLAY-SOLOMON, V. General immune reactivity in keloid patients. **Plast Reconstr Surg**. 73: 48-51, 1984.

BLOOM, D. Heredity of keloides: A review of the literature and report of a family with multiple keloids in five generations. **New York State Journal of Medicine**, 56:511-19, 1956.

BOXMAN, I.L.A.; RUWHOF, C.; BOERMAN, O.C.; LÖWIK, C.W.G.M.; PONEC, M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6, IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. **Archives of Dermatological Research**, 288:391-98, 1996.

BUFFONI, F. & RAIMONDI, L. A lysyl oxidase with histaminase activity in the pig aorta. **Agents Actions**, 11:38-41, 1981.

CALDERON, M.; LAWRENCE, W.T.; BANES, A.J. Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. **Journal of Surgical Research**, 61:343-47, 1996.

CASTAGNOLI, C.; PERVECCIO, D.; STELLA, M. The HLA-DR beta 16 allotype constitutes a risk factor for hypertrophic scarring. **Human Immunology**, 29:229-32, 1990.

CHUNTHARAPAI, A.; KIM, KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: Possible functions of each receptor. **The Journal of Immunology**, 155:2587-2594, 1995.

CLARK, R.A.F. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **The American Journal of The Medical Sciences**, 306:42-8, 1993.

CLARK, R.A.F.; NIELSEN, L.D.; WELCH, M.P.; McPHERSON, J.M. Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- β . **Journal of Cell Science**, 108:1251-61, 1995.

CLARK-LEWIS, I.; KIM, K.; RAJARATHNAM, K.; GONG, J.; DEWALD, B.; MOSER, B.; BAGGIOLINI, M.; SYKES, B. Structure-activity relationships of chemokines. **Journal of Leukocyte Biology**, 57:703-11, 1995.

COHEN, I.K. & PEACOCK Jr.,E.E. Keloids and hypertrophic scars. In: **Plastic Surgery**, .1:732-47, 1990.

COHEN, I.K.; KEISER, H.R.; SJOERDSMA, A. Collagen synthesis in human keloid and hypertrophic scar. **Surgical Forum**, 22:488-89, 1971.

COHEN, I.K.; McCOY, B.J.; MOHANAKUMAR, T.; DIEGELMANN, R.F. Immunoglobulin, complement and histocompatibility antigen studies in keloid patients. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 63:689, 1979.

CONWAY, H.; GILLETTE, R.; FINDLEY, A. Observations on the behavior of human keloids in vitro. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 24:229-37, 1959.

CONWAY, H.; GILLETTE, R.; SMITH, J.W.; FINDLEY, A. Differential diagnosis of keloids and hypertrophic scars by tissue culture technique, with notes on therapy of keloids by surgical excision and decadron. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 25:117-32, 1960.

COSMAN, B.; CRIKELAIR, G.F.; JU, D.M.C.; LATTES, R. Surgical management of keloids. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 27:335-45. 1961.

CRAIG, R.D.P.; SCHOFIELD, J.D.; JACKSON, S.S. Collagen biosynthesis in normal human skin, normal and hypertrophic scar and keloid. **European Journal of Clinical Investigation**, 5:69-74, 1975.

CROCKETT, D.J. Regional keloid susceptibility. **British Journal of Plastic Surgery**, 17:253, 1964.

DATUBO-BROWN, D.D. Keloids: a review of the literature. **British Journal of Plastic Surgery**, 43:70-7, 1990.

DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K.; MCCOY, B.J. Growth kinetics and collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, 98:341-46, 1979.

FEUGATE JE, WONG L, LI QJ, MARTINS-GREEN M. The CXC chemokine cCAF stimulates precocious depositin molecules by wound fibroblasts, acceleranting development of granulation tissue. **BMC Cell Biol** 3:13-32, 2002.

GABBIANI G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol** 200:500-503, 2003.

GARNER, W.L.; RODRIGUEZ, J.L.; MILLER, C.G.; TILL, G.O.; REES, R.S. SMITH, D.J.; RETNICK, D.G. Acute skin injury releases neutrophil chemoattractants. **Surgery**, 116:42-8, 1994.

GARNER,W.L. Epidermal regulation of dermal fibroblast activity. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 102:135-9, 1998.

GILLITZER, R. & GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing **Journal of Leukocyte Biology**, 69:513-21, 2001.

IOCONO JA, COLLERAN KR, REMICK DG, GILLESPIE BW, EHRLICH HP, GARNER WL. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. **Wound Repair Regen** 8:216-225, 2000.

JIMBOW, K.; KOBAYASHI, H.; ISHII, M.; Scar and keloidlike lesions in progeria. An electron-microscopic and immunohistochemical study. **Archives in Dermatology**, 124:1261-6, 1988.

KADONO, T.; KIKUCHI, K.; IHN, H.; TAKEHARA, K.; TAMAKI, K. Increased production of interleukin-6 e interleukin-8 in scleroderma fibroblasts. **The Journal of Rheumatology**, 25:296-301, 1998.

KAZEEM, A.A. The immunological aspects of keloid tumor formation. **Journal of Surgical Oncology**, 38:16-8, 1988.

KETCHUM, L. D.; COHEN, I.K.; MASTERS, F.W. Hypertrophic scars and keloids – A collective review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 53:140-54, 1974.

KHANDAKER, MH.; MITCHELL, G.; XU, L.; ANDREWS, JD.; SINGH, R.; LEUNG, H.; MADRENAS, J.; FERGUSON, SS.; FELDMAN, RD.; KELVIN, DJ. Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide-and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. **Blood**, 93:2173-85, 1999.

KISCHER, C.W. & BRODY, G.S. Structure of the collagen nodule from hypertrophic scars and keloids. **Scanning Electron Microscopy**, 3:371, 1981.

KISCHER, C.W.; SHETLAR, M.R.; SHETLAR, C.L.; CHVAPIL, M. Immunoglobulins in hypertrophic scars and keloids. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 71:821-25, 1983.

KISCHER, CW. Comparative ultrastructure of hypertrophic scars and keloids. **Scan Electron Micro sc**, 423-31, 1984.

KISCHER, CW. The microvessels in hypertrophic scars, keloids and related lesions: a review. **J Submicrosc Cytol Pathol**, 24:281-96, 1992.

KOCH, A.E.; POLVERINI, P.J.; KUNKEL, S.L.; Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, 258:1798-801, 1992.

KOCH, AE.; KRONFELD-HARRINGTON, LB.; SZEKANECZ, Z.; CHO, MM.; HAINES, GK.; HARLOW, LA.; STRIETER, RM.; KUNKEL, SL.; MASSA, MC.; BARR, WG.; et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease. **Pathobiology**, 61:239-46, 1993.

KOCH, R.J.; GOODE, R.L.; SIMPSON, G.T. Serum-free keloid fibroblast cell culture: an in vitro model for the study of aberrant wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 99:1094-8, 1997.

KOONIN, A.J. The aetiology of keloids: A review of the literature and a new hypothesis. **South Africa Medical Journal**, 38:913-16, 1964.

LAROSA G.J.; THOMAS, K.M.; KAUFMANN, M.E.; MARK, R.; WHITE, M.; TAYLOR, L.; GRAY, G.; WITT, D.; NAVARRO, J. Amino terminus of the interleukin-8 receptor is a major determinant of receptor subtype specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, 25:402-6, 1992.

LAURENTACI, G & DIGUARDI, D. HLA antigens in keloids and hypertrophic scars. **Archives in Dermatology**, 113: 1726, 1977.

LEE JY, YANG CC, CHAO SC, WONG TW. Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar. **Am J Dermatopathol** 26:379-384, 2004.

LEE, J.; HORUK, R.; RICE, G.C.; BENNETT, G.L.; CAMERATO, T.; WOOD, W.I. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, 267:16283-87, 1992.

LEBRIN, F.; DECKERS, M.; BERTOLINO, P.; TEN DIJKE, P. TGF- β receptor function in the endothelium. **Cardiovasc Res**, 65:59-608, 2005.

LONGAKER, M.T. Open Discussion. **Annals of Plastic Surgery**, 42:519-20, 1999.

LUSTER, A.D. Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, 338:436-45, 1998.

MARTIN P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science** 276:75-81, 1997.

MATSUOKA, LY.; UITTO, J.; WORTSMAN, J.; ABERGEL, RP.; DIETRICH, J. Ultrastructural characteristics of keloid fibroblasts. **AM J Dermatopathol**, 10: 505-8, 1988.

MEYER, L.J.M.; RUSSELL, S.B.; RUSSELL, J.D., TRUPIN, J.S.; EGBERT, B.M.; SHUSTER, S.; STERN, R. Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. **The Journal of Investigative Dermatology**, 114:953-59, 2000.

MOSER, B.; SCHUNACHER, C.; VON TSCHARNER, V.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M. **Journal of Biological Chemistry**, 266:10666, 1991.

MOYER, K.E.; SAGGERS, G.C.; ALLISON, G.M.; MACKAY, D.R.; EHRLICH, H.P. **Journal of Cellular Physiology**, 193:173-79, 2002.

MUKAIDA, N.; GUSSELLA, G.L.; KASAHARA, T.; KO, Y.; ZACHARIAE, C.O.C., KAWAI, T.; MATSUSHIMA, K. Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line. **Immunology**, 75:674-79, 1992.

MUKAIDA, N.; SHIROO, M.; MATSUSHIMA, K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. **The Journal of Immunology**, 143:1366-71, 1989.

MURDOCH, C. & FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, 95:3032-43, 2000.

MURPHY, C.; MCGURK, M.; PETTIGREW, J.; SANTINELLI, A.; MAZZUCCHELLI, R.; JOHNSTON, PG.; MONTIRONI, R.; WAUGH, DJ. Nonapical and cytoplasmatic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 11:4117-27, 2005.

MURPHY, PM. Neutrophil receptors for interleukin-8 and related CXC chemokines. **Semin Hematol**, 34:311-8, 1997.

MYLES, M.E. Keloid fibroblasts are refractory to inhibition of DNA synthesis by phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, 267:9014-20, 1992.

NAKAOKA, H.; MIYAUCHI, S.; MIKI, Y. Proliferating activity of dermal fibroblasts in keloids and hypertrophic scars. **Acta of Dermatological Venereology**, 75:102-4, 1995.

NANNEY, L.B.; MUELLER,S.G.;BUENO,R.; PEIPER,S.C.; RICHMOND, A. Distributions of melanoma growth stimulatory activity or growth-regulated gene and the interleukin-8 receptor B in human wound repair. **American Journal of Pathology**, 147:1248-60, 1995.

NEOTE, K.; DIGREGORIO, D.; MAK, J>Y.; HORUK, R.; SCHALL, T.J. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. **Cell**, 72:415-25, 1993.

NIMNI, M.E. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 13:1-86, 1983.

NIRODI, C.S.; DEVALARAJA, R.; NANNEY, L.B.; ARRINDELL, S.; RUSSELL, S.; TRUPIN, J.; RICHMOND, A. Chemokine and chemokine receptor in keloid and normal fibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, 8:371-82, 2000.

OLUWASANMI, J.O. Keloids in the african. **Clinics in Plastic Surgery**, 1:179, 1974.

OLUWASANMI, J.O.; LUCAS, D.O.; CHVAPRIL, M. Effect of a concurrent immune response on the collagen synthesis around implanted Ivalon sponges in rats. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 58:601-7, 1976.

OMO-DARE, P. Genetic studies on keloids. **Journal of the National Medical Association**, 67:428-32, 1975.

ORIENTE, A.; FEDARKO, N.S.; PACOCHA, S.E.; HUANG, S.; LICHTENSTEIN, L.M.; ESSAYAN, D.M. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 292:988-94, 2000.

OVERAL, C.M.; WRANA, J.L.; SODEK, J. Independent regulation of collagenase, 72 kd-progelatinase, and metalloproteinase inhibitor (TIMP) expression in human fibroblasts by transforming growth factor- β . **Journal of Biological Chemistry**, 264:1860-69, 1989.

PEACOCK, E. E.; MADDEN, J.W.; TRIER, W.C. Biologic basis for the treatment of keloids and hypertrophic scars. **South Medical Journal**, 63:755-60, 1970.

PING NG C, HINZ B AND SWARTZ M. Interstitial fluid flow induces myofibroblast differentiation and collagen alignment in vitro. **J Cell Science** 118:4731-4739, 2005.

PLACIK, O.J. E LEWIS, V.L. Immunologic associations of keloids. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, 175:185-93, 1992.

RAMAKRISHNAN, K.M.; THOMAS, K.P.; SUNDARARAJAN, C.R. Study of 1,000 patients with keloids in South India. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 53:276-80, 1974.

RENNEKAMPFF, H.; HANSBROUGH, J.F.; KIESSIG, V.; DORÉ, C.; STICHERLING, M.; SCHRÖDER, J. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. **Journal of Surgical Research**, 43:41-54, 2000.

ROCKWELL, W. B.; COHEN, I.K.; EHRLICH, H.P. Keloids and hypertrophic scars: a comprehensive review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 84:827-37, 1988.

RUSSELL, J.P. & WITT, W.S. Cell size and growth characteristics of cultured fibroblasts isolated from normal and keloid tissue. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 57:207-12, 1976.

RUSSELL, S.B. Glucocorticoid regulation of elastin synthesis in human fibroblasts: Down-regulation in fibroblasts from normal dermis but not from keloids. **Journal of Investigative Dermatology**, 104:241-45, 1995.

SATO, M.; ISHIKAWA, O.; MIYACHI, Y. Distinct patterns of collagen gene expression are seen in normal and keloid fibroblasts grown in three-dimensional culture. **British Journal of Dermatology**, 138:938-941, 1998.

SCHMIDT, A.; HALL, M.N. Signaling to the actin cytoskeleton. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 14:305-38, 1998.

SCHRODER, J.M.; KAMEYOSHI, Y.; CHRISTOPHERS, E. Platelets secrete an eosinophil-chemotactic cytokine which is a member of the C-C-chemokine family. **Adv Exp Med Biol**, 351:119-28, 1993.

SCHWARTZ, L.B.; RIEDEL, C.; CAULFIELD, J.P. Cell associations of complexes of chymase, heparin proteoglycan, and protein after degranulation by rat mast cells. **Journal of Immunology**, 126:2071-8, 1981.

SHAH, M.; FOREMAN, D.M.; FERGUSON, M.W. Control of scarring in adult by neutralising antibody to transforming growth factor b. **The Lancet**, 339:213-14, 1992.

SINGER, A.J. & CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, 341:738-46, 1999.

STANDIFORD, T.J.; STRIETER, R.M.; KASAHARA, K.; KUNKEL, S.L. Disparate regulation of interleukin-8 gene expression from blood monocytes, endothelial cells, and fibroblasts by interleukin-4. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 171:531-36, 1990.

STICHERLING, M.; HETZEL, F.; SCHRODER, J.M.; CHRISTOPHERS, E. Time and stimulus-dependent secretion of NAP-1 / IL-8 by human fibroblasts and endothelial cells. **J Invest Dermatol**, 101:573-6, 1993.

STRIETER, R.M.; POLVERINI, P.J.; ARENBERG, D.A. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. **Journal of Leucocyte Biology**, 57:752-62, 1995.

STRIETER, R.M.; STANDIFORD, T.J.; HUFFNAGLE, G.B.; COLLETTI, L.M.; LUKACS, N.W.; KUNKEL, S.L. "The good, the bad, and the ugly" – the role of chemokines in models of human disease. **The Journal of Immunology**, 3584-586, 1996.

STRIETER, RM.; BURDICK,MD.; GOMPERTS, BN.; BELPERIO, JA.; KEANE, MP. CXC chemokines in angiogenesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 362:1-17, 2005.

SZULGIT, G.; RUDOLPH, R.; WANDEL, A.; TENENHAUS, M.; PANOS, R.; GARDNER, H. Alterations in fibroblast $\alpha 1\beta 1$ integrin collagen receptor expression in keloids and hypertrophic scars. **The Journal of Investigative Dermatology**, 118, 409-15, 2002.

THOMAS, K.M.; TAYLOR, L.; NAVARRO, J. The interleukin-8 receptor is a encoded by a neutrophil-specific cDNA clone, F3R. **The Journal of Biological Chemistry**, 266:14839-41, 1991.

TUAN, T. E NICHTER, L.S. The molecular basis of keloid and hypertrophic scar formation. **Molecular Medicine Today**, January, 19-24, 1998.

TUAN, T.L.; Di CESARE, P.; CHEUNG, D.; NIMNI, M.E. Keloids and hypertrophic scars. **Collagen: Pathobiochemistry**, 125-36, 1991.

UEDA, K.; FURUYA, E.; YASUDA, Y.; OBA, S.; TAJIMA, S. Keloids have continuous high metabolic activity. **Plastic and Reconstructive Surgery**, 104: 694-98, 1999.

VINDELOV, L.I.; CHRISTENSEN, I.J. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. **Cytometry**, 11:753-70, 1990.

WANG, J.F.; OLSON, M.E.; MA, L.; BRISTOCK, D.R.; HART, D.A. Connective tissue growth factor siRNA modulates mRNA levels for a subset of molecules in normal and TGF- β 1-stimulated porcine skin fibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**, 12:205-16, 2004.

WERNER S AND GROSE R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**, 83:835-870, 2003.

WOLF, M.; DELGADO, M.B.; JONES, S.A.; DEWALD, B.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M. Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. **European Journal of Immunology**, 28:164-70, 1998.

XU, J. & CLARK, R.A.F. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **Journal of Cell Biology**, 132, 239-49, 1996.

XUE, H.; MCCAULEY, R.L.; ZHANG, B.S. Elevated interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. **Journal of Surgical Research**, 89:74-7, 2000.

YOUNAI, S.; NICHTER, L.S.; WELLISZ, T.; REINISCH, J.; NIMNI, M.E.; TUAN, T. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor- β in keloid and hypertrophic scars fibroblasts. **Annals of Plastic Surgery**, 33:148-51, 1994.

ZASLAVER, A.; FENINGER-BARISH, R.; BEN-BARRUCH, A. Actin filaments are involved in the regulation of trafficking of two closely related chemokine receptors, CXCR1 and CXCR2. **The Journal of Immunology**, 166:1272-1284, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 - Tabela 1. Lista de pacientes.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Local da lesão	Tempo de Evolução (meses)
D.S.O.	F	20	Lóbulo de orelha	15
A.O.P.	F	25	Ombro	20
I.S.L.C.	F	26	Dorso	22
D.S.	M	15	Lóbulo de orelha	15
B.M.	M	17	Lóbulo de orelha	13
E.S.	F	24	Lóbulo de orelha	12
R.G.P.	M	29	Região escapular	15
A.M.S.	F	24	Lóbulo de orelha	14
R.O.S.	M	17	Lóbulo de orelha	14
A.L.S.	F	23	Abdome	24
K.S.M.	F	19	Lóbulo de orelha	13
T.S.F.	M	18	Lóbulo de orelha	12
M.L.F.S.	F	34	Abdome	18
M.S.A.	F	22	Lóbulo de orelha	20
M.A.A.E.A.	F	40	Região esternal	10
S.R.F.	F	23	Lóbulo de orelha	22
I.P.S.	F	22	Lóbulo de orelha	14
P.S.D.D.	F	17	Lóbulo de orelha	18
A.C.S.	F	19	Região esternal	20
A.C.O.Q.	F	22	Lóbulo de orelha	18
J.S.B.	M	40	Braço	24

Anexo 2 – Certificado Comissão de Ética.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.05.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 213/03, intitulado: "Estudo comparativo das moléculas de adesão e do citoesqueleto de fibroblastos cultivados de quelóide e pele normal" apresentado pelo Departamento de CIRURGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: PROFA. DRA. CONSUELO JUNQUEIRA RODRIGUES

Pesquisador(a) Executante: DR. DECIO ABDO FILHO

CAPPesq, 14 de Maio de 2003.

hente
23/05/03
Prof. Dr. Euclides Ayres de Castilho
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - DCCP

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo 3 - Tabela 2. Expressão dos receptores de superfície de membrana da IL-8 tipo CXCR1 e anti-fibroblastos humanos em amostras de fibroblastos cultivados de quelóide e de pele normal, analisados por citometria de fluxo.

Paciente	Pele Normal IL-8 CXCR1	Quelóide IL-8 CXCR1	Pele Normal (controle positivo)	Quelóide (controle positivo)
1	60,3	34,2	97,9	96,9
2	66,2	53,4	98,7	97,8
3	53,6	38,7	98,1	96,3
4	48,3	48,3	99,1	97,4
5	41,7	45,5	97,8	95,2
6	33,3	35,7	96,2	96,8
7	97,8	33,6	98,4	91,9
8	82,1	32,5	97,4	95,9
9	16,7	14,2	97,6	93,0
10	48,2	37,8	99,5	99,8
11	32,6	24,5	91,6	95,8
12	38,5	41,7	96,2	94,3
13	39,2	37,7	96,6	91,9
14	69,0	62,8	91,1	97,6
15	51,6	23,4	91,5	84,1
16	46,8	36,8	95,1	94,8
17	35,0	33,5	98,3	97,8
18	27,5	20,2	99,0	94,4
19	21,3	25,3	94,4	94,8
20	40,6	41,0	93,6	99,2
21	25,8	28,7	98,5	98,9

*Valores expressos em (%)

Anexo 4 - Tabela 3. Expressão dos receptores de superfície de membrana da IL-8 tipo CXCR2 e de anti-fibroblasto humano em amostras de fibroblastos cultivados de quelóide e de pele normal, analisados por citometria de fluxo.

Paciente	Pele Normal IL-8 CXCR2	Quelóide IL-8 CXCR2	Pele Normal (controle positivo)	Quelóide (controle positivo)
1	51,4	25,7	97,9	96,9
2	62,6	46,1	98,7	97,8
3	47,1	28,9	98,1	96,3
4	50,6	22,0	99,1	97,4
5	34,4	36,5	97,8	95,2
6	27,1	31,6	96,2	96,8
7	97,4	20,2	98,4	91,9
8	95,0	26,6	97,4	95,9
9	83,2	19,4	97,6	93,0
10	15,8	14,8	99,5	99,8
11	27,1	24,4	91,6	95,8
12	39,2	45,0	96,2	94,3
13	41,7	45,6	96,6	91,9
14	68,3	31,7	91,1	97,6
15	63,6	40,0	91,5	84,1
16	80,8	42,9	95,1	94,8
17	22,8	15,3	98,3	97,8
18	14,3	13,1	99,0	94,4
19	19,4	13,2	94,4	94,8
20	11,1	14,1	93,6	99,2
21	19,3	26,2	98,5	98,9

* Valores expressos (%)

Anexo 5 - Tabela 4. Cicatriz Queloideana. Distribuição da população de fibroblastos mantidos em cultura nas fases do ciclo celular obtida por citometria de fluxo.

Paciente	Apoptose	Fase - G0/G1	Fase - S	Fase - G2/M
1	5,2	36,9	13,8	29,9
2	12,8	45,5	14,6	8,3
3	7,4	42,5	8,9	23,2
4	7,2	56,0	12,6	12,9
5	5,6	25,4	10,7	13,1
6	3,8	39,3	9,5	19,5
7	7,5	37,8	11,7	15,7
8	5,8	35,7	13,8	17,9
9	6,4	40,2	10,3	20,8
10	3,1	45,8	9,3	17,7
11	19,6	28,4	3,5	1,4
12	12,4	50,3	8,0	14,7
13	2,8	8,7	3,1	5,3
14	23,0	31,8	10,4	16,0
15	18,2	29,4	6,3	62,0
16	4,9	54,4	7,8	31,5
17	2,4	45,0	7,5	44,3
18	2,6	44,4	8,6	43,9
19	3,2	55,2	7,6	32,6
20	8,6	39,4	9,8	34,8
21	18,8	42,8	11,2	47,2

*Valores expressos em (%)

Anexo 6 - Tabela 5. Pele Normal. Distribuição da população de fibroblastos mantidos em cultura nas fases do ciclo celular obtida por citometria de fluxo.

Paciente	Apoptose	Fase - G0/G1	Fase - S	Fase - G2/M
1	1,0	69,5	2,1	28,3
2	2,4	60,0	2,7	37,2
3	2,0	71,6	1,9	26,4
4	1,3	66,5	2,7	33,5
5	1,6	64,9	3,0	31,9
6	3,0	40,6	12,2	42,1
7	1,5	69,7	7,6	22,6
8	1,5	44,8	11,3	43,8
9	3,8	41,2	13,2	28,5
10	2,1	63,8	12,2	28,7
11	3,0	14,5	14,2	22,6
12	2,3	52,3	10,2	11,5
13	6,3	43,8	6,9	14,9
14	25,6	34,3	8,9	8,2
15	2,6	35,5	6,2	54,7
16	3,2	44,4	9,9	41,4
17	2,9	48,6	7,6	40,0
18	2,4	48,5	6,6	41,7
19	3,8	56,8	9,1	29,4
20	4,6	38,8	8,7	24,3
21	9,8	28,7	7,9	29,6

- Valores expressos em (%)

Anexo 7 - Tabela 7. Porção Central do Quelóide. Valores individuais da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular nas amostras *ex vivo* obtidas por citometria de fluxo.

Paciente	Apoptose	Fase - G0/G1	Fase - S	Fase - G2/M
1	7,0	75,9	0,5	23,6
2	6,3	71,5	2,9	25,6
3	11,3	54,7	1,6	43,7
4	5,5	59,8	1,9	38,3
5	8,4	53,4	4,1	42,5
6	7,8	50,3	7,7	42,0
7	3,2	60,4	8,6	31,0
8	6,9	59,7	6,9	33,3
9	6,9	53,3	8,2	38,5
10	6,7	58,3	5,4	37,4

---

* Valores expressos em (%)

Anexo 8 - Tabela 8. Porção Periférica. Dados individuais da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos fibroblastos *ex vivo* da porção periférica da cicatriz quelóideana, obtida por citometria de fluxo.

Paciente	Apoptose	Fase G0/G1	Fase - S	Fase G2/M
1	4,4	67,5	23,8	4,3
2	8,1	58,3	11,8	21,8
3	6,8	45,1	30,6	17,5
4	7,1	51,1	7,2	34,3
5	3,7	31,1	37,7	27,5
6	2,8	67,7	16,5	13,0
7	2,2	58,3	6,4	33,1
8	4,4	55,8	33,6	6,2
9	4,2	60,7	33,4	1,7
10	5,3	39,7	28,3	26,7

*Valores expressos em (%)

Anexo 9 - Tabela 10. Pele Normal. Valores individuais da distribuição das populações celulares nas fases do ciclo celular dos fibroblastos *ex vivo*, obtidos por citometria de fluxo.

Paciente	Apoptose	Fase G0/G1	Fase - S	Fase - G2/M
1	1,0	69,4	2,1	28,3
2	2,4	60,0	2,7	37,2
3	2,0	71,6	1,9	26,3
4	1,2	66,5	2,7	33,4
5	1,5	64,9	3,0	31,9
6	3,0	40,6	12,2	42,1
7	1,5	69,7	7,6	22,6
8	1,5	44,8	11,3	43,8
9	3,8	41,2	13,2	28,5
10	2,0	63,8	12,2	28,7

---

*Valores expressos em (%)