DANIEL SIQUIEROLI VILAS BOAS

Expressão gênica dos proteoglicanos sindecans-2 e 4 de superfície celular e decorim e versicam de matriz extracelular no quelóide

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Plástica

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Valéria Marquezini

São Paulo

2007

DANIEL SIQUIEROLI VILAS BOAS

Expressão gênica dos proteoglicanos sindecans-2 e 4 de superfície celular e decorim e versicam de matriz extracelular no quelóide

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Plástica

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Valéria Marquezini

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vilas Boas, Daniel Siquieroli

Expressão gênica dos proteoglicanos sidecans-2 e 4 de superfície celular e decorim e versicam de matriz extracelular no quelóide / Daniel Siquieroli Vilas Boas. -- São Paulo, 2007.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Plástica.

Orientadora: Mônica Valéria Marquezini.

Descritores: 1.Expressão gênica 2.Proteoglicanos 3.Membrana celular
4.Matriz extracelular 5.Quelóide 6.Genética médica

USP/FM/SBD-246/07

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Joaquim** e **Silvia** e ao meu irmão, **Gustavo**:

Vocês foram a minha força quando eu estive fraco

Vocês foram a minha voz quando eu não pude falar

Vocês foram os meus olhos quando eu não pude ver

Vocês viram o melhor que havia em mim

Vocês disseram que nenhuma estrela estava fora de alcance

Vocês me levantaram quando eu não pude alcançar

Vocês me deram fé porque acreditaram em tudo que sou

Vocês me deram asas e me fizeram voar

Eu sou abençoado porque eu sou amado por vocês

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Mônica Valéria Marquezini**, por todas as vezes que você me apoiou, por toda a verdade que você me fez ver, por sua postura que certamente me fortaleceu, por estar sempre ao meu lado em tantos momentos difíceis, enfim, pelo meu sonho que você fez tornar-se real.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Marcus Castro Ferreira**, professor titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina – USP, por nos ter abrigado em seu laboratório e programa de pós-graduação.

À Dr^a. **Célia M. C. Strunz**, diretora do Laboratório Clínico do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina – USP, por nos receber de braços abertos e disponibilizar toda a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

À Prof^a. Dr^a. **Suzana C. O. M. de Sousa**, titular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – USP, pela colaboração plena em todos os momentos em que precisamos de seu auxílio.

À Prof^a. Dr^a. **Odaly Tofolletto** por ter me apresentado o “mundo” celular e molecular, por todo apoio dado durante minha especialização e pelo suporte na análise estatística desse trabalho.

À Dr^a. **Marisa R. Herson**, responsável pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas – FMUSP, pelo apoio e incentivo e pelas amostras de tecido que nos foram doadas para o desenvolvimento deste projeto.

À Dr^a. **Dulce E. Casarini**, do Departamento de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP-EPM, por nos ter recebido em seu laboratório para que fizéssemos as análises de imagens das PCRs.

À minha grande amiga **Monique Matsuda**, cuja paciência, dedicação, conhecimento, companhia e ensinamentos foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e para a realização deste trabalho.

À grande amiga e mentora Prof^a. MsC. **Marilene B. R. Alves**, professora titular da Disciplina de Genética da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, pelo crédito, pela confiança, por deixar-me fazer parte de sua equipe e por estar constantemente me ensinando a fazer “cestas de 3 pontos nos jogos de basquete da vida”.

À amiga Prof^a. MsC. **Inês Esteves**, professora titular da Disciplina de Cálculo e Bioestatística da Universidade Santa Cecília – UNISANTA, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Às amigas **Wanda** e **Rosana Caratin** pelos momentos de conforto e suporte profissional nos momentos mais críticos e emotivos desse projeto.

Às meninas **Cristina, Marilza, Adriana e Marli**, do Laboratório de Análises Clínicas do INCOR, que estiveram sempre ao nosso lado nos dando suporte nos experimentos laboratoriais.

À colega **Silvana**, do Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica da FM-USP, pelo apoio dado na coleta e processamento das amostras.

À **Elisa dos Santos e Edna Todai** (*in memoriam*), do Laboratório de Patologia Bucal da FOUSP, pela importante cooperação em nossos estudos anátomo-patológicos e imunohistoquímicos.

Agradeço especialmente aos **pacientes voluntários** desse projeto que se dispuseram a colaborar com nosso estudo nos permitindo buscar incessantemente respostas para nossos questionamentos, contribuindo para o progresso científico e tecnológico e cujo dia-a-dia expressa a verdadeira busca pela vida em harmonia.

Agradeço à Família Teixeira, no nome da Prof^a. Dr^a. **Silvia Ângela Teixeira Penteado**, Magnífica Reitora da Universidade Santa Cecília - UNISANTA e da Prof^a. Dr^a. **Lucia Maria Teixeira Furlani**, Exma. Presidente do Instituto Superior de Educação Santa Cecília - ISESC pelo auxílio que me foi concedido para a realização desse projeto. Como disse Chico Xavier: “teu ambiente de trabalho é o que elegeste espontaneamente para a tua realização”. Estou certo de que elegi o local correto pois cada dia de trabalho nessa instituição representa uma nova realização para mim.

Agradecemos também à **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo apoio financeiro dado ao nosso projeto, processo nº. 01/00392-9.

Daquilo que eu sei
Nem tudo me deu clareza
Nem tudo foi permitido
Nem tudo me deu certeza

Daquilo que eu sei
Nem tudo foi proibido
Nem tudo me foi possível
Nem tudo foi concebido

Não fechei os olhos
Não tapei os ouvidos
Cheirei, toquei, provei
Ah! Eu usei todos os sentidos

Só não lavei as mãos
E é por isso que eu me sinto
Cada vez mais limpo
Cada vez mais limpo
Cada vez mais...

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

P

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	06
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	08
4. MÉTODOS.....	43
5. RESULTADOS.....	60
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÕES.....	97
8. ANEXOS.....	99
9. REFERÊNCIAS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

bFGF	fator de crescimento de fibroblasto-2
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CS	condroitim sulfato
CSPG	proteocondroitim sulfato
DAB	diaminobenzidina
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DCN	decorim
dCTP	desoxicitidina trifosfato
DEPC	dietilpirocarbonato
dGTP	desoxiguanosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DMSO	dimetilsulfóxido
DS	dermatam sulfato
DSPG	proteodermatam sulfato
DTT	ditiotreitól
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EGF	fator de crescimento de epiderme
ELISA	ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FISH	hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FGFR1	receptor do fator de crescimento do fibroblasto

GAG	glicosaminoglicano
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPI	glicosil-fosfatidil-inositol
°C	graus Celsius
HE	hematoxilina-eosina
HS	heparam sulfato
HSPG	proteoheparam sulfato
IFN- γ	interferon-gama
IHQ	imunohistoquímica
IL	interleucina
KGF	fator de crescimento de queratinócito
KS	queratam sulfato
KSPG	proteoqueratam sulfato
mb	megabase
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinase de matriz
N	grupo controle (normal)
ng	nanograma
ng/mL	nanograma por mililitro
oligoDT	oligonucleotídeo
pb	par de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
PG	proteoglicano

Q	grupo de estudo (quelóide)
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	ácido ribonucléico ribossomal
RNA _t	ácido ribonucléico de transferência
RT	transcriptase reversa
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SDC	sindecam
TA	temperatura ambiente
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TGF- β	fator de crescimento transformador-beta
TIMP	inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
μ g	micrograma
μ g/mL	micrograma por mililitro
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VCAN	versicam

LISTA DE FIGURAS

	P
Figura 1 - Representação do mapeamento dos genes: (A) VCAN, (B) SDC2, (C) DCN e (D) SDC4, nos cromossomos humanos.....	30
Figura 2 - Seqüências de referência genômica dos genes dos proteoglicanos de superfície celular.....	31
Figura 3 - Seqüências de referência genômica dos genes dos proteoglicanos de matriz extracelular.....	32
Figura 4 - Aspecto macroscópico da cicatriz quelóideana.....	62
Figura 5 - Aspectos histológicos da pele normal e do tecido derivado de quelóide.....	63
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total.....	65
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras amplificadas por PCR qualitativa para o GAPDH (306pb) obtidos a partir dos cDNAs das amostras do grupo normal (N) e do grupo quelóide (Q).....	65
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR qualitativa obtidos a partir dos <i>pools</i> de cDNAs das amostras do grupo N (colunas ímpares) e do grupo Q (colunas pares) para os PGs estudados.....	67
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% representativa dos produtos de amplificação submetidos à ação das enzimas de restrição.....	67

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do <i>pool</i> de amostras do grupo N para o GAPDH (306pb).....	72
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do <i>pool</i> de amostras do grupo N para o SDC2 (395pb).....	73
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do <i>pool</i> de amostras do grupo N para o SDC4 (531pb).....	74
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do <i>pool</i> de amostras do grupo N para o DCN (303pb).....	75
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do <i>pool</i> de amostras do grupo N para o VCAN (304pb).....	76
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR semiquantitativa obtidos a partir dos <i>pools</i> de cDNAs das amostras do grupo N e do grupo Q para os PGs estudados.....	78
Figura 16 - Resultados da densitometria dos produtos da RT-PCR semiquantitativa para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q.....	80
Figura 17 - Controles da reação imunohistoquímica.....	82
Figura 18 - Reações imunohistoquímicas.....	83

LISTA DE TABELAS

	P
Tabela 1 - Códigos de identificação e descrição dos genes SDC2, SDC4, DCN e VCAN.....	29
Tabela 2 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados nas PCRs.....	52
Tabela 3 - Descrição das enzimas de restrição utilizadas.....	54
Tabela 4 - Mapas de restrição dos genes estudados.....	68
Tabela 5 - Estatística descritiva dos resultados do RT-PCR para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q.....	79
Tabela 6 - Resultados da densitometria dos produtos da RT-PCR semiquantitativa para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q.....	79

RESUMO

Siquieroli, DVB. Expressão gênica dos proteoglicanos sindecans-2 e 4 de superfície celular e decorim e versicam de matriz extracelular no quelóide [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 135p.

O quelóide é um processo cicatricial, com frequência aumentada em regiões com maior tensão na pele ou onde a pele é mais espessa, caracterizado por exceder-se além dos limites da lesão que o originou e pela tendência à recidiva após sua ressecção. Ambos os sexos são acometidos, com maior incidência entre a primeira e a terceira década de vida e em indivíduos de etnia negra. A relação familiar é sugerida como herança autossômica dominante. O quelóide apresenta características moleculares distintas da pele normal envolvendo uma variedade de sinalizações ainda pouco compreendidas e um aumento da expressão de componentes da matriz extracelular, como o colágeno, os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos. Este estudo analisou a expressão gênica dos proteoglicanos de superfície celular sindecam-2 e sindecam-4 e dos de matriz extracelular decorim e versicam no tecido derivado de quelóide de indivíduos não tratados em comparação com a pele clinicamente normal. Participaram desse estudo 10 indivíduos portadores de quelóides (grupo Q) e 10 indivíduos não portadores dessa cicatriz (grupo N). A expressão gênica dos proteoglicanos foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa e analisada através de eletroforese em gel de agarose. Foi realizada a localização dos proteoglicanos nos tecidos através de reação imunohistoquímica com anticorpos para os sindecans-2 e 4. Os grupos foram comparados pelo teste t de *Student*. Os proteoglicanos de superfície celular mostraram-se aumentados no grupo Q (93% para o sindecam-2 e 152,5% para o sindecam-4) em comparação com o grupo N ($P < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas para os proteoglicanos de matriz extracelular entre os dois grupos. A análise imunohistoquímica mostrou uma distribuição marcante dos sindecans-2 e 4 no componente epitelial, conectivo, vascular e nervoso de toda a casuística. Concluímos que o quelóide apresenta aumento significativo da expressão gênica de sindecam-2 e sindecam-4, mas não apresenta aumento significativo da expressão gênica de decorim e versicam, em relação à pele normal.

Descritores: 1.Expressão gênica 2.Proteoglicanos 3.Membrana celular 4.Matriz extracelular 5.Quelóide 6.Genética médica

SUMMARY

Siquieroli, DVB. Gene expression of proteoglycans syndecans-2 and 4 of cell surface and decorin and versican of extracellular matrix in keloid [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 135p.

Keloid is a cicatricial process, with frequency increased in regions with bigger tension in the skin or where the skin is thicker, characterized for exceeding beyond the limits of the injury that originated it and for the tendency to relapse after its resection. Its occurs in both genders, with bigger incidence between the first and the third decade of life and in individuals of black ethnica. The familial relation is consistent with an autosomal dominant inheritance. The keloid presents distinct molecular characteristics of the normal skin involving a variety of still little understood signalling and an increase of the expression of components of the extracellular matrix, as the collagen, the glicosaminoglycans and the proteoglycans. This study analyzed the gene expression of the proteoglycans of cell surface syndecan-2 and syndecan-4 and the ones of extracellular matrix decorin and versican in the keloid tissue from not treated individuals in comparison with the normal skin. Tissue samples was obtained from 10 individuals with keloid (Q group) and 10 individuals with normal skin (N group). The gene expression of the proteoglycans was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction and analyzed through agarose gel electrophoresis. The localization of the proteoglycans in the tissues was performed through immunohistochemical reaction using panels of antibodies for syndecans-2 and 4. The groups was compared by the Student's t test. The proteoglycans of cell surface revealed increased in Q group (93% for sydecan-2 and 152,5% for syndecan-4) in comparison with N group ($P < 0,01$). Significant differences for the proteoglycans of extracellular matrix between the two groups was not observed. The immunohistochemical analysis showed a major distribution of syndecans-2 and 4 in epithelial, connective, vascular and neural components in both groups. We conclude that keloid reveal significant increase of the gene expression of syndecan-2 and syndecan-4, but does not present significant increase of the gene expression of decorin and versican, in relation to the normal skin.

Descriptors: 1.Gene expression 2.Proteoglycans 3.Cell membrane
4.Extracellular matrix 5.Keloid 6.Medical genetics

Introdução

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

1. INTRODUÇÃO

O quelóide é um processo cicatricial imperfeito, claramente elevado, de forma irregular, caracterizado por exceder-se além dos limites da lesão que o originou e pela tendência à recidiva após sua ressecção, devido à formação excessiva de matriz extracelular durante o reparo patológico de lesões do tecido conectivo (English e Shenefeldt, 1999).

Os quelóides são geralmente assintomáticos, mas, algumas vezes, podem tornar-se pruriginosos e/ou dolorosos, espontaneamente ou através de palpação.

Na cicatriz normal madura, há um equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno. Nos quelóides ocorre, por fatores desconhecidos, aumento da síntese de colágeno ou deficiência da collagenólise (Urioste et al., 1999).

O quelóide é um fenômeno que ocorre exclusivamente em humanos, portanto não há um modelo experimental descrito, fato que dificulta seu estudo (Rockwell et al., 1989; Niessen et al., 1999).

Ambos os gêneros são acometidos, de forma igual, dentro de um mesmo grupo populacional e mesma faixa etária (Carrino et al., 2000). O quelóide ocorre em todos os grupos étnicos, sendo prevalente em indivíduos

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

de etnia negra e amarela (Marneros et al., 2001) e é mais incidente entre a primeira e a terceira década de vida (Alster e Tanzi, 2003).

Os locais de maior incidência de quelóide no corpo são aqueles que têm maior concentração de melanócitos, região anterior do tórax, lóbulos auriculares, ombros, dorso, queixo e porção inferior das pernas (Urioste et al., 1999).

Fatores imunológicos têm sido relacionados à predisposição pelo desenvolvimento do quelóide, como por exemplo, os haplótipos dos antígenos leucocitários humanos (Laurentaci et al., 1977; Castagnoli et al., 1990).

Há evidências de fatores genéticos envolvidos na gênese do quelóide. Há muitas décadas estudos e relatos de casos vêm sendo publicados (Bloom, 1956; Dorn, 1957; Marneros et al., 2001; Chen et al., 2006) e descrevem o quelóide como tendo herança autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável.

Histologicamente, o quelóide diferencia-se da pele normal por apresentar um grande número de vasos sanguíneos, alta densidade de células mesenquimais, espessa camada de células epiteliais e grande deposição de componentes da matriz extracelular (Matsuoka et al., 1988).

A matriz extracelular é um complexo supramolecular que constitui um veículo para a passagem de células, moléculas hidrossolúveis e íons diversos e é uma barreira à penetração de microorganismos. Essa matriz é formada principalmente por glicosaminoglicanos, proteoglicanos,

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

glicoproteínas adesivas e por fibras colágenas e elásticas (Bosman e Stamenkovic, 2003).

Os proteoglicanos são compostos macromoleculares, constituídos por glicosaminoglicanos sulfatados ligados covalentemente ao seu corpo protéico. Por sua hidratação, as moléculas de proteoglicanos ocupam enorme espaço, tornando-se muito eficientes para resistir a forças de compressão. Os proteoglicanos, ainda, servem como pontos de ancoragem e concentração de fatores de crescimentos e para outras proteínas que estimulam a proliferação celular e ainda, têm papel importante como moléculas reguladoras do processo de reparo tecidual (Delehedde et al., 2001).

A pele é um órgão de reparação lenta, ao contrário dos demais órgãos. Quando uma célula sofre agressão focal, as partes perdidas são reconstituídas. Quando a lesão causar perda tecidual, o reparo é mais complexo. O processo de cicatrização pode ser considerado um seguimento do processo inflamatório originado pela lesão e se faz fundamentalmente à custa de tecido conectivo, em que o tecido preexistente fica substituído por uma cicatriz fibrosa (Penc et al., 1998). Sua forma antiestética causa grande dissabor para os pacientes, afetando significativamente sua qualidade de vida e, por isso, tem frustrado os cirurgiões por séculos.

Não se conhecendo suas causas, ainda não é possível o tratamento, ou desenvolvimento de estratégias terapêuticas, dos quelóides e das

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

cicatrizes hipertróficas, segundo bases biológicas sólidas. Vários métodos e combinações de métodos são usados, com resultados variáveis.

O melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da formação do quelóide ao nível molecular e sua regulação pelos proteoglicanos de superfície celular e de matriz extracelular, poderá oferecer novas ferramentas de intervenção terapêutica, uma vez que as alternativas atualmente disponíveis, mesmo utilizadas em associação, são ainda pouco eficazes.

Objetivos

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa teve como objetivo geral o estudo da expressão dos genes de proteoglicanos de superfície celular e de matriz extracelular no quelóide.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Investigar a expressão semiquantitativa dos genes SDC2, SDC4, DCN e VCAN no tecido derivado de quelóide de indivíduos não-tratados em comparação com a pele normal de indivíduos sem história clínica de formação de quelóide;
- b) Confirmar a presença (tradução) dos proteoglicanos SDC2 e SDC4 nos tecidos de nossa casuística através de imunolocalização histoquímica.

ATGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGATTGGCAATATAGCTCGATCGTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

3. REVISÃO DA LITERATURA

A descrição do quelóide data de séculos, sendo citada pela primeira vez no “papiro cirúrgico de Edwin Smith”, em 1700 a.C. Foi também observado em esculturas do século XIII da região oeste da Nigéria (Peacock et al., 1970).

Posteriormente, esta cicatriz foi citada por Retz e Alibert no final do século XVIII, quando passou a ter denominação própria, diferenciando-o do crescimento canceroso (Rockwell et al., 1989; 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).

3.1. Aspectos Clínicos e Fisiopatológicos do Quelóide

Os quelóides são geralmente assintomáticos, mas, algumas vezes, podem tornar-se pruriginosos e/ou dolorosos, espontaneamente ou através de palpação. Esse quadro inicia-se como placas rosadas ou vermelhas, de consistência firme e elástica, seguido de crescimento excessivo e

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

descontrolado que faz com que a cicatriz cresça além dos limites da lesão original, tornando-se lisa, rígida, irregular, hiperpigmentada e sintomática (Alster e West, 1997).

Os locais de maior incidência de quelóide no corpo são aqueles que têm maior concentração de melanócitos, região anterior do tórax, lóbulos auriculares, ombros, dorso, queixo e porção inferior das pernas. É raro nas pálpebras, órgãos genitais, na palmas das mãos e plantas dos pés, onde a concentração de melanócitos é mínima (Urioste et al., 1999).

Crockett (1964) propôs uma ordem para suscetibilidade:

- a) Primeira ordem: em indivíduos susceptíveis, todas as cicatrizes em certas áreas desenvolverão um quelóide (pré-esternal, dorso, deltóideas);
- b) 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);
- c) Terceira ordem: em certas áreas é incomum e, se presente, em menor proporção (região lombar, abdome, região central da face, genitália).

Entretanto é comum a coexistência, numa mesma região, de cicatrizes finas e quelóides. A mesma cicatriz pode apresentar segmentos normais e queloidianos intercalados.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Durante as fases de desenvolvimento, como puberdade e gravidez, a incidência de quelóide pode aumentar, pois durante essas fases há maior atividade hipofisária e esta se relaciona com aumento na pigmentação. Esses casos geralmente respondem ao uso de corticóides que são inibidores da liberação do hormônio estimulante de melanócito.

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 a da acne, pústulas e picadas de inseto podem se complicar promovendo a formação de uma cicatriz queloidiana (Datubo-Brown, 1990).

São fatores importantes para a formação do quelóide, além da tensão entre as bordas da ferida, a ocorrência ou não de cicatrização por primeira intenção, a ocorrência ou não de infecção, a orientação da ferida em relação às linhas de tensão da pele e a correta síntese da ferida (sem espaços mortos, corpos estranhos e áreas de necrose por pontos muito apertados).

Merece registro o fato de que a pele do quelóide pode servir como enxerto, os quelóides tendem a recidivar em seus sítios primitivos, mas as áreas receptoras podem não apresentar essa propensão.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

3.2. Aspectos Étnicos

O quelóide ocorre em todos os grupos étnicos, sendo prevalente em indivíduos de etnia negra e amarela (Marneros et al., 2001). Cosman et al. (1961) encontraram incidência de quelóides em 4,5 a 16% dos indivíduos de etnia negra e hispânica de sua casuística em cicatriz provocada por vacinação.

Koonin (1964) correlacionou a maior incidência de quelóide em grupos étnicos de pele mais pigmentada com a alteração no metabolismo do hormônio estimulante de melanócito. Oluwasanmi (1974) relatou a incidência de quelóides em 6,2% de uma comunidade rural africana que foi objeto de seu estudo.

Estes achados estão apoiados em vários estudos relatados por Ketchum et al. (1974) cujos resultados mostraram que os melanócitos de indivíduos com pele mais pigmentada são mais reativos ao hormônio estimulante de melanócito, fato que pode explicar a maior prevalência do quelóide nesses grupos étnicos.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

3.3. Aspectos Etários

Com relação à idade, o quelóide é mais incidente entre a primeira e a terceira década de vida, sendo mais raro nas lesões em indivíduos nos extremos da vida (Alster e Tanzi, 2003).

Ketchum et al. (1974) propõe algumas hipóteses para explicar este fato:

- a) Jovens são mais expostos a traumatismos;
- b) A pele dos jovens tem maior tensão que a pele do idoso, que é mais flácida;
- c) A síntese de colágeno é maior em jovens e diminuída em idosos.

3.4. 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

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

epiteliais (Matsuoka et al., 1988). São observados alguns macrófagos e em maior quantidade linfócitos e eosinófilos.

As fibras colágenas estão dispostas em rodadoiro com abundância de substância basal mucinosa entre elas configurando nódulos (Kischer e Brody, 1981). 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 apresentando orientação com a superfície epitelial (Clark, 1993).

Kischer et al. (1983) 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.

3.5. Aspectos Bioquímicos

Placik et al. (1992) relataram diferenças na composição bioquímica do tecido queloideano comparando com pele normal:

- a) Quantidades aumentadas de água, cálcio, histamina, fosfatase ácida, alanina transaminase, desidrogenase láctica, α -globulinas (α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina), fibronectina e RNAm de fibronectina, elastina,

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

glicosaminoglicanos (sulfato de condroitina-4), proteoglicanos, galactosil-hidroxilisil-glucosil transferase, prolina-hidroxilase, sendo a excessiva deposição de colágeno, um dos achados mais marcantes do quelóide;

- b) Quantidade aumentada de peptídeo procolágeno devido à diminuída degradação;
- c) Quantidade variada de colágeno tipo III (aumentada, semelhante ou diminuída);
- d) Quantidade aumentada de colágeno tipo I e de RNAm para o procolágeno tipo I;
- e) Quantidade semelhante de RNAm para procolágeno tipo II, III, IV, V.

Neste trabalho foi observado que com esta variedade de resultados se necessita maior estudo para esclarecer a causa precisa do acúmulo de colágeno, porém alguns trabalhos auxiliam no direcionamento para possíveis responsáveis:

- a) O aumento de α -globulinas, apesar de variável, em comparação com pele normal ou cicatriz de padrão normal, pois sabe-se que estas proteínas inibem a collagenase e podem resultar em diminuição da degradação de colágeno (Craig, 1975; Diegelmann et al., 1979; Abergel et al., 1985);
- b) Há quantidade elevada de histamina no quelóide, sendo que estudos prévios demonstraram que esta proteína

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

estimulou a síntese de tecido de granulação, podendo ser um fator de aumento da síntese de colágeno (Bischoff et al., 1991; Atiyeh et al., 2005).

3.6. 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 haplótipos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) B14, BW16, BW35, B21, DR5 e DQW3 (Laurentaci e Dioguardi, 1977; Castagnoli et al., 1990) e indivíduos de 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

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

componentes do 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 (Oluwasamni 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, hidrolase ácida e proteases neutras, 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 e Raimondi, 1981; Nimni, 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, responsáveis pelos 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

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

fibroblastos (Barbul,1990; Koch et al., 1992). 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 (Clark-Lewis et al.,1995; Kadono et al., 1998). As ações efectoras destas células são moduladas através da liberação de substâncias inibidoras e estimuladoras – citocinas ou 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 (Gillitzer e Goebeler, 2001; Strieter et al., 2005).

Foi demonstrado que a produção de interferon- α e interferon- γ está diminuída em células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de quelóide, comparados com controles normais (McCauley et al., 1992). Já a expressão do fator de necrose tumoral TGF- β 1 e TGF- β 2 (Lee et al., 1999) e do fator de crescimento de epiderme (EGF) (Kikuchi et al., 1995) apresentam-se aumentados em fibroblastos derivados de quelóide, mas pode ser inibida por fatores parácrinos liberados pelos queratinócitos dos tecidos cicatriciais (Le Poole e Boyce, 1999).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A histamina, a serotonina e a bradicinina atuam na permeabilidade capilar, a leucotaxina atua na atividade quimiotóxica, as prostaglandinas e as tromboxanas atuam na migração e proliferação de fibroblastos, proliferação endotelial e contração da ferida, as linfocinas atuam provavelmente na fibroplasia e a interleucina 1 estimula a síntese protéica no tecido de granulação (Oriente et al., 2000).

Outras citocinas como a GRO- α , Mig, IP-10, p4, IL-6, IL-13 e IL-8, também mostraram-se alteradas nesses pacientes (Xue et al., 2000; Gillitzer e Goebeler, 2001).

3.7. Aspectos Genéticos

Há evidências de fatores genéticos envolvidos na gênese do quelóide. Há muitas décadas estudos e relatos de casos vêm sendo publicados fundamentando essas evidências. Kunzfeld (1952) e posteriormente Dorn (1957) relataram casos de irmãos gêmeos monozigóticos que desenvolveram quelóides em lesão originada por vacinação.

Bloom (1956) fez um relato de caso de uma família com quelóides múltiplos em cinco gerações sugerindo um componente hereditário para o desenvolvimento dessa cicatriz.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Esse componente hereditário também foi sugerido por O'Toole e Milward (1999) em um relato de um caso de três irmãos europeus que desenvolveram quelóides quando adolescentes: no irmão mais velho, o quelóide foi causado por uma incisão cirúrgica; no segundo irmão, causado por um *piercing* auricular e no mais novo, por feridas devido à catapora.

A relação familiar do quelóide é sugerida por vários autores como herança autossômica dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável (Omo-Dare, 1975; Marneros et al., 2001; Chen et al., 2006).

Algumas síndromes associadas à formação de quelóide já foram descritas desde meados da década de 60, como a síndrome de Goeminne e a de Rubinstein-Taybe (Marneros et al., 2001). Em 1978 McKusic *apud* Zuffardi e Fraccaro (1982) sugere que a mutação causadora da síndrome de Goeminne possui herança dominante incompleta e ligada ao sexo e no mesmo trabalho, em 1982, o grupo identifica o *locus* no Xq28 através da análise cromossômica de duas mulheres portadoras de translocações balanceadas X/autossomo, envolvendo o Xq28, com manifestações fenotípicas parciais da síndrome (quelóide e displasia renal).

Uma das hipóteses sugeridas pela comunidade científica é que a formação de quelóides pode estar possivelmente associada às mutações no gene TGF- β , entretanto Bayat et al. (2005), após o *screening* dos sete exons e da região promotora deste gene, através da técnica de DHPLC, de 95 pacientes portadores de quelóides concluíram não haver qualquer relação

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

da formação de quelóides com mutações nesse gene. Essa relação também não foi encontrada nos estudos de polimorfismos dos receptores I, II e III do TGF- β (Bayat et al., 2002; 2003; 2004).

Archer et al. (2005) descreveram o primeiro caso de um paciente com deleção subtelomérica do 19p13.3-pter, identificado por FISH, associado com formação de quelóide. Entretanto esse dado ainda precisa ser muito pesquisado, pois essa deleção corresponde a um comprimento cromossômico de 1.2mb, cobrindo uma área de aproximadamente 60 genes, dos quais 15 foram considerados genes candidatos para o fenótipo apresentado pelo paciente.

A relação entre polimorfismos genéticos e quelóides também foram estudados por outros grupos. Wang et al. (2005) mostraram em seus experimentos um aumento significativo da prevalência de quelóides em pacientes portadores do polimorfismo do códon 72 do gene p53, que pode codificar arginina ou prolina em comparação com o grupo controle.

Aberrações cromossômicas em quelóides analisadas por hibridização genômica comparativa mostraram que a perda de material genético dos cromossomos 1pter-32.2, 16p13.2-p11.1 e 20q11.1-q13.2 está associada a formação de quelóide, sugerindo que essas bandas podem conter genes inibidores cujas deleções podem estar envolvidas com a formação e progressão da cicatriz.

Marneros et al. (2004) examinaram minuciosamente o genoma de duas famílias, uma japonesa e outra afro-americana. A análise de ligação

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

mostrou suscetibilidade à formação de quelóide no locus 2q23 para a família japonesa e no locus 7p11 para a afro-americana, indicando ser o quelóide uma desordem de heterogeneidade clínica.

Esse estudo conflita com o trabalho de Chen et al. (2006) que fornece evidências genéticas que os *loci* de suscetibilidade ao quelóide não se localizam no cromossomo 7p11.

3.8. Proteoglicanos, a Superfície Celular e a Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é um complexo supramolecular que constitui um veículo para a passagem de células, moléculas hidrossolúveis e íons diversos e é uma barreira à penetração de microorganismos. Essa matriz é formada principalmente por glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos (PGs), glicoproteínas adesivas e por fibras colágenas e elásticas (Bosman e Stamenkovic, 2003).

Os PGs são compostos macromoleculares, constituídos por GAGs sulfatados ligados covalentemente ao seu corpo (*core*) protéico. Os GAGs são heteropolissacarídeos lineares não-ramificados de peso molecular elevado, formado por repetições de unidades dissacarídicas constituídas por um ácido hexurônico (glicurônico ou idurônico) e uma hexosamina N-acetilada (D-glicosamina ou D-galactosamina) ou uma galactose em uma

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

seqüência não ramificada que apresenta substituições de grupamentos sulfato em várias posições da cadeia polissacarídica (Carney e Muir, 1988). Possuindo numerosos grupos carboxila e sulfato em suas moléculas, os GAGs são poliânions, ligando-se por eletrovalência a elevado número de cátions que, por sua vez, atraem numerosas moléculas de água, hidratando-os (Isnard et al., 2002). Por sua hidratação, as moléculas de PG ocupam enorme espaço, tornando-se muito eficientes para resistir a forças de compressão. Os PGs, ainda, servem como pontos de ancoragem e concentração de fatores de crescimentos e para outras proteínas que estimulam a proliferação celular (Delehedde et al., 2001).

Inicialmente os PGs eram classificados com base nos GAGs que os compunham (Poole, 1986), de modo que sua nomenclatura consistia na identificação da cadeia predominante dessa molécula. O avanço das metodologias de biologia molecular permitiu que as seqüências de aminoácidos dos corpos protéicos de diversos PGs fossem conhecidas de maneira que atualmente a classificação dos PGs passou a ser feita baseando-se na composição do seu corpo protéico ou na localização destas macromoléculas no tecido (Hardingham et al., 1999).

Com base neste último aspecto, os PGs são classificados em extracelulares (ou de MEC), de superfície celular e intracelulares. Os PGs extracelulares são organizadores da MEC e subdividem-se em interfibrilares ou hialectanos (versicam, agrecam, neurocam e brevicam), fibrilares (decorim, biglicam, fibromodulim e lumicam) e de membrana basal

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

(perlecam). Os PGs de superfície celular incluem a família dos sindecans e o betaglicam. Além destes, compreendem as famílias dos glipicans, CD44, a serglicina e a trombomodulina. (Iozzo, 1998).

Os PGs interfibrilares localizam-se entre as malhas formadas pelos feixes de fibras colagênicas, configurando agregados de grande massa molecular que promovem pontes entre as células e a MEC. Os PGs fibrilares estão ligados covalentemente às fibras e fibrilas colagênicas, não formando agregados, possuem regiões ricas em leucina e pequena massa molecular. Sua principal função relaciona-se com a fibrillogênese e a organização dos feixes colagênicos. Os PGs de membrana basal além de fornecer suporte estrutural à interface que separa os distintos tecidos, funcionam como um arcabouço estrutural que guia e regula a angiogênese mediante fatores de crescimento como o bFGF (Whitelock, 1996).

O versican (VCAN) isolado originalmente de fibroblastos é expresso, também, por queratinócitos, células musculares lisas de veias, cérebro e células mesangiais dos rins. Apresenta, ligado ao corpo protéico, cadeias de condroitim sulfato (CS) (Krusius et al., 1987). O versican participa da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Yang et al., 1999).

Estudos *in vitro* indicam que o biglicam funciona no metabolismo dos tecidos conectivos pela ligação das fibrilas de colágeno, pela ligação de zinco (Yang et al., 1999), interação com o TGF- β (Hildebrand et al., 1994) e com o componente C1q do complemento e pode ainda promover a sobrevivência neuronal (Krumdieck et al., 1992; Hocking et al., 1996).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O decorim (DCN) interage com o colágeno pelo seu corpo protéico (Svensson et al., 1995) e influencia sua fibrilogênese, diminuindo o diâmetro das fibrilas (Vogel et al., 1984) e parece decorar a superfície da fibra colágena (Scott e Orford, 1981). Além de interagir com os colágenos I, II, III e V (Bidanset et al., 1992; Hedbom e Heinegard, 1993; Whinna et al., 1993) o decorin interage com os colágenos VI, XII e XIV (Font et al., 1993; 1996), com a fibronectina (Schmidt et al., 1987), trombospondina (Winnemoller et al., 1992), com o componente C1q do complemento (Krumdieck et al., 1992), liga-se ao EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Hildebrand et al., 1994), ao TGF- β (Iozzo et al., 1999) e ao zinco (Yang et al., 1999). Vogel e Clark (1989) evidenciaram que o metabolismo tanto do decorin quanto do biglican é alterado por anormalidades na estrutura ou secreção dos colágenos I e III.

Por apresentar ligação de suas cadeias de heparam sulfato (HS) com as proteínas de membrana basal, o perlecan pode ter função importante na arquitetura das mesmas, podendo, também, promover adesão celular (Singer et al., 1987), ser uma molécula importante na concentração de fatores de crescimento, como os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), que são moléculas catiônicas importantes para a regulação de processos como a proliferação e angiogênese (Yanagishita e Hascall, 1992; Olsen, 1999).

A família dos sindecans (SDCs) é constituída de 4 diferentes tipos conhecidos, expressos em uma variedade de células. Apresentam

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

domínios intracelulares, transmembrânicos e extracelulares, sendo que entre estes últimos encontramos sítios de ligação a GAGs sensíveis a diversas proteases (Bernfield et al., 1992). Assim, como o perlecan, são PGs do tipo heparan sulfato e ligam-se com alta afinidade e especificidade ao bFGF (Chernousov e Carey, 1993), ao colágeno, à fibronectina, à trombospondina e à tenascina. São eles: SDC-1, SDC-2 (ou fibroglicam), SDC-3 (ou N-sindecam) e o SDC-4 (riudocam ou anfiglicam). Os GAGs constituintes dos SDCs variam de acordo com o tipo.

3.8.1. Aspectos Moleculares dos Proteoglicanos

Técnicas inovadoras têm tido um impacto dramático em todos os aspectos da biologia celular por permitir que as células e suas macromoléculas possam ser estudadas em modos imaginados. Elas também têm possibilitado o conhecimento atual da organização e história evolucionária de genomas complexos e levado à descoberta de classes inteiras de genes e proteínas. Elas fornecem novos métodos de determinar as funções das proteínas e proporcionam um conjunto de ferramentas importantes para revelar os mecanismos pelos quais a expressão gênica é regulada.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A identificação de um determinado *locus* gênico no genoma é de interesse de todos os pesquisadores, pois a localização genética acurada torna factível proceder a uma análise biológica molecular do gene e finalmente investigar a proteína codificada por tal gene. No genoma humano, os genes SDC2, SDC4, DCN e VCAN estão mapeados, respectivamente, nos seguintes *loci*: 8q22-q24, 20q12-q13, 12q13.2 e 5q12-q14 (figura 1). O mapa e as regiões genômicas, bem como os transcritos e seus produtos desses genes estão representados nas figuras 2 e 3. As principais informações depositadas no NCBI–NLM–NIH (*National Center for Biotechnology Information – National Library of Medicine – National Institutes of Health*) acerca dos genes SDC2, SDC4, DCN e VCAN estão reunidas na tabela 1.

Através de eletroforese em gel de poliacrilamida dos HSPGs associados à superfície celular após tratamento com heparitinase, Lories et al. (1987) demonstraram a presença de corpos protéicos com epítomos semelhantes ao anticorpo monoclonal 6G12, que foi usado por Marynen et al. (1989) no isolamento de cDNA de uma biblioteca genômica de fibroblastos de pulmão humano.

Esse HSPG foi denominado sindecam-2 ou fibroglicam (David et al., 1992). Ele está codificado na mesma região do oncogene MYC e os 4 membros da família dos sindecans mostram semelhanças físicas com os 4 membros da família dos MYCs (Spring et al., 1994).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

O sindecam-4 foi isolado de células endoteliais de ratos, como riudocam, por Kojima, et al. (1992) e de fibroblastos e queratinócitos humanos, como amfiglicam, por David et al. (1992). Yu et al. (1995) clonaram a região promotora do riudocam e a análise dessa sequência revelou a presença de vários sítios de ligação de fatores de transcrição.

Utilizando as técnicas de *Northern blot* e RT-PCR Danielson et al. (1993) detectou duas formas, originadas de *splicing* alternativo, de exon líder do gene para o decorim em uma variedade de RNAm isolados de linhagens celulares e tecidos humanos. Essas seqüências possuem alta homologia (87%) com os exons obtidos de células de aves e bovinos. Este alto grau de conservação entre as espécies sugere funções regulatórias para esses exons. Estudos de hibridização *in situ* em embriões de camundongo sugerem que o DCN pode ter papel importante nas interações epitelial-mesenquimal durante o desenvolvimento dos tecidos e da organogênese (Scholzen et al., 1994).

Zimmermann e Ruoslahti (1989) cloraram e seqüenciaram o corpo protéico do CSPG de fibroblastos. Esse proteoglicano foi designado versicam em reconhecimento de sua estrutura modular versátil. Grandes CSPGs foram inicialmente identificados na cartilagem hialina, onde eles interagem especialmente com hialuronam e formam grandes complexos supramoleculares. Agregados com outras glicoproteínas de matriz extracelular eles promovem um suporte mecânico e uma carga negativa fixa. Tais complexos também existem em uma grande variedade de tecidos

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

moles onde apresentam outros papéis fisiológicos (Kjellen e Lindahl, 1991). Bode-Lesniewska et al. (1996) estudando a distribuição tecidual do VCAM através de marcação com anticorpos monoclonais relataram sua presença no tecido conectivo frouxo de diversos órgãos e freqüentemente associados com redes de fibras elásticas.

Tabela 1- Códigos de identificação e descrição dos genes SDC2, SDC4, DCN e VCAN

	SDC2	SDC4	DCN	VCAN
AN ¹	NM_002998	NM_002999	NM_001920	NM_004385
Versão	.3 (11.03.07)	.2 (25.02.07)	.3 (29.04.07)	.2 (03.06.07)
GI ²	55925658	38201674	47419925	21361115
Tipo de anotação	RNAm	RNAm	RNAm	RNAm
Tipo de molécula	linear	linear	linear	linear
pb ³	3485	2640	2305	11185
CDS ⁴	619-1224	41-637	409-1488	267-10457
Aa ⁵	201	198	359	3396

¹AN: número de acesso

²GI: identificação gênica

³pb: número de pares de bases

⁴CDS: região codificadora

⁵aa: número de aminoácidos

Fonte: NCBI – NLM – NIH, Jun/2007

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 1 – Representação do mapeamento dos genes: (A) VCAN, (B) SDC2, (C) DCN e (D) SDC4, nos cromossomos humanos. Fonte: NCBI – NLM – NIH.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 2 – Sequências de referência genômica dos genes dos proteoglicanos de superfície celular. (A) região genômica e transcrito do SDC2, (B) contexto genômico do SDC2, (C) região genômica e transcrito do SDC4 e (D) contexto genômico do SDC4. Fonte: NCBI – NLM – NIH.

ATCGCCTTAGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGATTACGGCATTACGGCTAGCGGCATAGCGGTAGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 3 – Sequências de referência genômica dos genes dos proteoglicanos de matriz extracelular. (A) região genômica e transcrito do DCN, (B) contexto genômico do DCN, (C) região genômica e transcrito do VCAN e (D) contexto genômico do VCAN. Fonte: NCBI – NLM – NIH.

3.9. Proteoglicanos e o Reparo Tecidual

A pele é um dos maiores órgãos em área superficial e peso; em adultos, ela cobre uma área de cerca de 2 metros quadrados. Estruturalmente, a pele consiste de duas porções principais. A porção externa, mais delgada, que é composta de tecido epitelial, é denominada epiderme e a interna composta de tecido conectivo que é denominada derme. Sob a derme está uma tela subcutânea (hipoderme), que fixa a pele às estruturas adjacentes (Butnaru e Kanitakis, 2002).

Quando uma célula sofre agressão focal, as organelas inviáveis podem ser isoladas, digeridas e eliminadas enquanto as partes perdidas são reconstituídas. Quando, em vez de atingir focalmente a célula, a lesão causar perda de muitas células, o reparo é mais complexo e pode assumir uma de duas possibilidades, na regeneração, o reparo se faz a partir de células do mesmo tipo das que se perderam e na cicatrização, o reparo se faz fundamentalmente à custa de tecido conectivo, em que o tecido preexistente fica substituído por cicatriz fibrosa. Esse processo de reparo é regulado pelos PGs de MEC e de superfície celular presentes no tecido (Penc et al., 1998)

Os fibroblastos são células muito ativas na síntese de componentes da matriz extracelular como fibras colágenas e elásticas, GAGs e PGs.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Apresentam prolongamentos citoplasmáticos irregulares, com núcleo eucromático de forma ovóide. O fibroblasto quiescente, o fibrócito, perde seus prolongamentos citoplasmáticos assumindo característica fusiforme e deficiente em retículo endoplasmático granular e complexo golgiense. Na cicatrização, o fibrócito pode voltar a sintetizar matriz extracelular, reassumindo a estrutura de fibroblasto (Stephens et al., 2003).

O processo de cicatrização pode ser considerado um seguimento do processo inflamatório originado pela lesão. Logo após o ferimento, o tecido lesado libera mediadores químicos, como os EGFs, TGFs e FGFs, seguido de digestão ou remoção dos detritos celulares, bactérias e corpos estranhos.

Estudos realizados por Penc et al. (1998), nos fluídos derivados da lesão, revelaram a presença de PGs de matriz extracelular como decorim, perlecan e versican e que estes, sobretudo os proteodermatam sulfatos (DSPG), liberados após uma injúria do tecido atuam como potentes promotores da função do FGF.

Kainulainen et al. (1998) mostraram que ectodomínios intactos de SDC-1 e 4 estão presentes nos fluídos de ferimentos dérmicos agudos. Este desprendimento é catalisado pela ativação de proteases e receptores de fatores de crescimento (Subramanian et al., 1997). Fitzgerald et al. (2000) demonstraram que este desprendimento dos ectodomínios é regulado pela ação de metaloproteinases sensíveis a inibição específica por TIMP-3 (inibidor tissular de metaloproteinase de matriz-3). Nos fluidos do ferimento o ectodomínio de SDC-1 age como sendo um regulador duplo de atividade do

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

bFGF: o ectodomínio intacto inibe sua ação enquanto que os produtos de sua degradação das cadeias de GAGs pelas heparinases o ativam (Kato et al., 1998).

Na reparação, alguns PGs realizam a função mecânica de adsorção de água e prevenção da compressão tecidual (McGrath e Eady, 1997). Entretanto, os PGs possuem outros papéis na cicatrização incluindo uma influência direta no processo inflamatório, ligação e migração de células e ligação a fatores de crescimento, além de modular outros aspectos da cicatrização através da regulação da permeabilidade da membrana basal (Andriessen et al., 1997), hiperproliferação epidérmica e fibrose dérmica (Gallo et al., 1996).

Em 1956, Abercrombie *apud* Mélega et al. (1992) publicou um trabalho mostrando que o tecido de granulação de cobaias escorbúticas, que não produzem colágeno normalmente, apresentava os mesmos índices de retração de tecido de granulação de cobaias normais. Os autores concluíram que a retração é determinada pelas células e não por fibras colágenas.

A retração é a etapa de grande importância que faz com que 50 a 70% do tamanho do ferimento possa ser reduzido, resultado da ação dos miofibroblastos. Logo após o ferimento, essas células se proliferam e se diferenciam nos tecidos vizinhos e estabelecem junções entre si, formando um eficiente arcabouço contrátil, responsável pela aproximação das bordas da ferida.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Os miofibroblastos já foram identificados em vários tecidos que estejam submetidos à contração: tecido de granulação, fígado cirrótico, tenossinovite estenosante, cápsulas em torno de próteses de silicone etc. Os miofibroblastos respondem farmacologicamente a estimuladores e inibidores da contração de fibras musculares lisas. Tiras de tecido de granulação contraem sob ação de serotonina, prostaglandina $F_{1\alpha}$, hidrocloreto de prometazina e sulfato de morfina. O relaxamento das tiras é provocado por papaverina e prostaglandina E_1 .

Esses fibroblastos fenotipicamente modificados dos tecidos cicatriciais (miofibroblastos) aumentam a expressão de biglicam e versicam parte em função das alterações fenotípicas e parte em função da ação do TGF- β (Hakkinen et al., 1996).

A pesquisa feita por Kahari et al. (1991) sugeriu que o TGF- β possui uma ação diferencial na expressão dos proteoglicanos, pois em culturas de fibroblastos induzidas por esse fator foram observados um aumento na expressão de biglicam e versicam e um decréscimo da expressão de decorim quando comparado ao grupo controle. Brown et al., (1999) induzindo fibroblastos com o mesmo fator de crescimento usado pelo grupo do Kahari detectaram não só o decréscimo da expressão de decorim como também um aumento da expressão de perlecan nas fases iniciais no processo cicatricial, expressão essa que passa a não ser mais influenciada após um longo período de indução, indicando que as alterações na expressão desses proteoglicanos podem substancialmente afetar a resposta

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

celular à injúria tecidual. Já o tripeptídeo glicil-histidil-lisina-Cu⁺², com papel importante na ativação da cicatrização, estimula a expressão de decorin e parece não regular a expressão de biglicam (Simeon et al., 2000).

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 já exposto, 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).

Vasos sangüíneos, elementos celulares, PGs e fibrina contribuem para estabelecer a resistência da ferida à tensão nos primeiros dois a cinco dias após a ocorrência da lesão. A resistência efetiva da cicatriz é fornecida pelas fibras colágenas. Feridas que foram suturadas com fios que sofram degradação, antes que se desenvolva a resistência à tensão ideal, sofrem alargamento ou mesmo deiscência.

Os objetivos da fibroplasia são obliterar espaços mortos, evitar sangramentos e restaurar a resistência física do tecido lesionado.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A pele é um órgão de reparação lenta, ao contrário dos demais órgãos. A quantidade de colágeno alcança nível máximo por volta de 42 dias e a resistência à tensão aumenta até 24 meses, mantendo-se na ferida durante esse período, elevados níveis de enzimas colagenolíticas. Isso promove um remodelamento contínuo do colágeno, cujo resultado é uma cicatriz mais resistente.

A formação do tecido de granulação é o evento mais característico do processo de cicatrização que representa o crescimento de novo tecido para a reposição daquele perdido. Há proliferação de fibroblastos e de capilares, angiogênese, no seio de uma matriz abundante, edemaciada e basófila. Esses novos capilares, durante seu crescimento, se dirigem para a superfície da lesão e aí se encurvam para baixo conferindo um aspecto granuloso à superfície. A matriz vai tornando-se mais densa com o passar dos dias, adquirindo cada vez mais fibras colágenas.

Yeo et al. (1991) estudando a expressão de PGs no tecido de granulação e no estroma de tumores, por apresentarem propriedades em comum, detectou uma expressão aumentada dos DSPGs e sobretudo dos CSPGs em comparação com o tecido normal.

Nesse mesmo tecido, Elenius et al. (1991) estudaram a regulação da expressão de sindecans e verificaram que os queratinócitos que migram das bordas do ferimento demonstram perda de SDC-1. Concomitantemente, a expressão de SDC-1 aumenta nas células endoteliais e a expressão do SDC-4 aumenta nos fibroblastos da derme que formam o tecido de

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

granulação, aparentemente devido à indução ativa de peptídeos antimicrobiais derivados de neutrófilos (Gallo et al., 1994; 1996).

Na fase de maturação, verifica-se a deposição, agrupamento e remodelação do colágeno e a regressão endotelial. Identifica-se um substrato histológico, que caracteriza o tecido conectivo com fibrócitos, fibras colágenas e poucos vasos sangüíneos. À reconstrução da continuidade da pele, associa-se a reepitelização.

A reepitelização, acontecimento terminal no processo de reparo, ocorre precocemente nas bordas da lesão e rapidamente as células crescem e restabelecem a continuidade do revestimento. A princípio a camada epitelial de revestimento é muito fina e deixa ver por transparência o tecido conectivo avermelhado que está abaixo, mas à proporção que o tecido conectivo vai tornando-se mais denso com o passar do tempo, o epitélio de revestimento vai tornando-se mais espesso. Assim, a lesão acaba dando lugar a uma cicatriz fibrosa, densa, esbranquiçada e retraída.

Camundongos transgênicos nos quais o gene do SDC-1 foi inativado (SDC-1 *knockout*) apresentaram deficiências no processo de cicatrização caracterizadas pelo atraso na reepitelização e na inibição da ativação da proliferação celular após o ferimento tanto na córnea quanto na derme (Stepp et al., 2002).

Quelóides com grande tendência de crescimento possui expressão muito aumentada de biglicam e, em menor escala, de decorim quando comparado a aqueles com menor tendência de crescimento ou a tecidos

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

normais. Essa alteração pode estar envolvida na regulação anormal da síntese de matriz extracelular através da ligação de fatores de crescimento ou influenciando a organização tridimensional das fibras colágenas (Hunzelmann et al., 1996).

Tan et al. (1993) estudando a expressão de decorin, versican e biglican em fibroblastos normais e derivados de quelóides induzidos por bFGF, verificou que esse fator apresenta uma regulação diferencial, estimulando a expressão de decorin e inibindo a de biglican e não influenciando a expressão de versican. Entretanto, não foram observadas diferenças entre a expressão dos PGs nos fibroblastos normais e nos derivados de quelóides, demonstrando que a resposta ao bFGF de ambos fibroblastos são similares.

3.10. Aspectos Terapêuticos

Não se conhecendo suas causas, ainda não é possível o tratamento, ou desenvolvimento de estratégias terapêuticas, dos quelóides e das cicatrizes hipertróficas, segundo bases biológicas sólidas. Vários métodos e combinações de métodos são usados, com resultados variáveis.

A cirurgia plástica visa à remoção da cicatriz e o alívio da tensão local. Este relaxamento se consegue com a mudança do trajeto da cicatriz com

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

zetaplastias, com enxertos ou retalhos. Grandes quelóides podem ser tratados com ressecção intracicatricial, mantendo-se intacta a periferia da cicatriz e fazendo-se a exérese da porção central. A área cruenta recebe enxertia cutânea ou é fechada por deslocamento das bordas e aproximação direta.

Os fibroblastos capazes de sintetizar colágeno podem ser destruídos por radiações ionizantes. Teoricamente é possível irradiar uma ferida na medida certa, visando igualar o desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno (Ragoowansi et al., 2003).

Os quelóides podem ser tratados ou prevenidos pela compressão externa. Roupas de malhas elásticas, feitas sob medida, servem a esse propósito. Os quelóides tendem a acumular água nas fases iniciais do desenvolvimento e a compressão pode promover a desidratação do quelóide e a provocação de hipóxia no tecido impedindo a formação da massa queloidiana. A crioterapia (Ansorena et al., 1998; Har-Shai et al., 2003) e a oclusão com placas de silicone (Eishi et al., 2003) suprimem a atividade celular anormal e geralmente são técnicas complementares utilizadas após a remoção cirúrgica da cicatriz.

A injeção intracicatricial de glicocorticóides, seja através de agulhas, seja através de jatos de pressão, tem sido universalmente usada para o tratamento de quelóides. Os corticóides atuam inibindo a síntese protéica, alterando a solubilidade do colágeno tornando-o mais susceptível à

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ação das enzimas colagenolíticas e restauram a microcirculação local (Azad et al., 2002).

Injeções intracicatriciais de enzimas como pepsina, fibrolisina e outras foram utilizadas com resultados insatisfatórios no tratamento de quelóides.

O citrato de tamoxifeno vem sendo utilizado no tratamento de quelóides por sua ação inibidora da proliferação celular (Hu et al., 1998; Mikulec et al., 2001) assim como o ácido retinóico, que é utilizado na clínica como diminuidor da formação de cicatriz excessiva (McCormack et al, 2001).

O acetato de triancinolona tem sido mais comumente utilizada por diminuir a proliferação celular e a produção de colágeno por fibroblastos e por estimular a produção de bFGF e inibir a produção de TGF- β (Carroll et al., 2002).

Os avanços tecnológicos podem propiciar, num futuro próximo, estratégias de terapia gênica para o quelóide. A transferência gênica tem sido uma técnica muito estudada por grandes centros de pesquisa. Ma et al. (2003) avaliaram a habilidade do vetor AAV (adenovirus-associado) em transfectar e expressar genes repórteres em quelóides e obtiveram resultados promissores. A substituição do gene repórter por um gene funcional precisará ser experimentado e poderá possivelmente ser utilizado como estratégia terapêutica do quelóide.

Métodos

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Participaram deste estudo 20 voluntários da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras e do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes voluntários constituíram dois grupos:

Grupo Quelóide (Q): constituídos por 10 indivíduos portadores de quelóides não-tratados, sendo 4 do gênero masculino e 6 do gênero feminino, com idades variando entre 18 e 36 anos (mediana = 20,5).

As amostras de tecido queloidal nunca antes expostos a terapias corretivas, obtidas por biópsia excisional, foram cedidas para análise mediante consentimento pós-informado do doador, no momento da cirurgia corretiva da cicatriz, inserida em seu plano de tratamento, seguindo critérios de assepsia e antisepsia habituais.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Grupo Controle (N): constituídos por 10 indivíduos não portadores de quelóides, do gênero feminino, com idades variando entre 23 e 45 anos (mediana = 36,5).

As amostras de pele normal foram obtidas junto ao Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FM-USP, que foram doadas após procedimentos cirúrgicos estéticos reparadores, como a mamoplastia, por exemplo, por indivíduos sem história clínica de quelóide e mediante consentimento pós-informado do doador.

4.1.1 Critérios de Exclusão

Não foram incluídos nesse estudo indivíduos com história de utilização de injeção intralesional de glicocorticóides como o acetato de triancinolona, citrato de tamoxifeno ou ácido retinóico, reconhecidos por interferirem na composição da matriz extracelular, bem como uso de radioterapia, crioterapia e de técnicas de oclusão da cicatriz. Voluntários com história de remoção total ou parcial da cicatriz também não fizeram parte de nosso estudo.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Não foram incluídos no grupo controle indivíduos com história de formação de quelóides ou cicatrizes hipertróficas em lesões ou em procedimentos cirúrgicos anteriores a esse estudo.

4.2. Aspectos Éticos

Este projeto de pesquisa, o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1) e o termo de doação de amostras para o Banco de Tecidos (Anexo 2) foram submetidos à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 915/04, anexo 3) e à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Conselho Nacional de Saúde (CONEP/CNS) do Ministério da Saúde (folha de rosto nº FR-052587, anexo 4) e somente foi iniciado após ter sido aprovado por ambas instituições.

Este protocolo foi conduzido de acordo com os princípios enunciados na Declaração de Helsinque - ratificada em Edimburgo (2000) (Mandani, 2004), expressos nas Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS/MS – Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Foi declarado pelo pesquisador responsável que as informações contidas neste estudo serão consideradas confidenciais e usadas pelo próprio ou por seus colaboradores, sob sua autorização. Essas informações

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

poderão ser reveladas se, a critério do pesquisador responsável, tal fato se tornar necessário.

O pesquisador responsável informou aos voluntários sobre os objetivos do estudo, os procedimentos adotados, os riscos do protocolo, além da utilização do tecido removido para análise. Os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de serem aceitos para participar do estudo.

4.3. Material e Métodos

Os experimentos foram executados no Laboratório Clínico do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (INCOR-USP), gentilmente concedido pela Dr^a. Célia M. C. Strunz e no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), gentilmente concedido pela Prof^a. Dr^a. Suzana C. O. M. de Souza.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.3.1. Análise Anatomo e histopatológica das Amostras

Os pacientes do grupo Q selecionados para esse estudo foram previamente submetidos a exames clínicos pelos médicos cirurgiões plásticos residentes da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas – FMUSP, que relataram as características macroscópicas das cicatrizes desses pacientes.

Um fragmento representativo (de aproximadamente 0,25mm²) de cada uma das amostras dos pacientes do grupo Q foi submetido para análise de rotina histopatológica para a confirmação diagnóstica. Esses fragmentos foram fixados com formalina 10% tamponada com fosfato, inclusos em parafina, cortados com espessura de 0,3µm, corados pelo método hematoxilina-eosina (HE) e analisados através de microscopia de luz (Zeiss, Germany).

4.3.2. Análise da Expressão Transcricional dos PGs

Estes experimentos utilizaram amostras clínicas de tecido de pele dos indivíduos dos grupos Q e N, que foram congeladas em nitrogênio líquido

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

imediatamente após a remoção cirúrgica dessas amostras, descongeladas em gelo no momento de sua execução e mantidas em gelo durante toda sua manipulação. Todas as determinações foram realizadas em quintuplicata e em condições isentas de RNase.

4.3.2.1. Isolamento do RNA total

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o método do TRIzol (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) conforme instruções do fabricante. As amostras foram suspensas em TRIzol na proporção de 1mL do reagente para 100mg de tecido e a mistura foi homogeneizada em politron (Ultra-Turrax T25, Ika – Labortechnik, Germany) utilizando dois pulsos por segundo a 4°C e em seqüência, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em TA. Em seguida foi adicionado 0,1mL de clorofórmio (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de Trizol utilizado e as amostras foram agitadas por inversão durante 15 segundos e incubadas durante 2 minutos em TA. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 14000rpm, durante 15 minutos a 4°C. À fase aquosa foi adicionado 0,5mL de isopropanol (Merck S.A, SP, Brasil) para cada 1mL de TRIzol, sendo em seguida centrifugada a 14000rpm, durante 10 minutos a 4°C. Ao precipitado obtido (RNA total) foi adicionado 1mL de etanol 75% (Merck S.A, SP, Brasil)

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

para cada 1mL de TRIzol centrifugado a 7500rpm, durante 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi desprezada e o *pellet* foi seco em TA e posteriormente ressuspenso em 20µL de água destilada tratada com dietilpirocarbonato (DePC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na proporção de 1mL de DePC para cada 1L de água.

O conteúdo de RNA total foi quantificado por absorbância em espectrofotômetro (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Consideramos que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40µg/mL de RNA. A relação de absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280nm do RNA total foi calculada para nos certificarmos da ausência de contaminação protéica.

A integridade do RNA de cada amostra foi analisada eletroforéticamente em gel de agarose 1%, em tampão tris-borato-EDTA (TBE; 50mM Tris base, 50mM ácido bórico, 1mM EDTA, pH 8). As amostras cujas bandas ribossomais 28S e 18S estavam íntegras foram armazenadas a -80°C até sua utilização para a síntese da 1ª fita de DNA complementar (cDNA).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.3.2.2. Obtenção da 1ª fita de cDNA

O RNA total serviu de molde para a síntese de cDNA (transcrição reversa), utilizando o kit Superscript II (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA).

A 1ª fita de cDNA foi preparada utilizando-se 5µg do RNA total, 1U da enzima transcriptase reversa, 1µL de oligos dT para um volume final de 20µL. Esta mistura foi incubada sequencialmente a 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 4°C por 1 minuto. O cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

4.3.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa

A reação em cadeia da polimerase foi realizada com cDNA em volume de 1µL, 0,4mM do mix de desoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 0,2µM de cada *primer*, 1,5mM de MgCl₂ e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase em tampão de PCR (kit Superscript II, GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA), em volume final de 25µL. A tabela 2

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

mostra a seqüência dos pares de *primers*, obtidas de publicações do sequenciamento do cDNA humano, para SDC2 (Worapamorn et al., 2001b), SDC4 (Kaneider et al., 2002), DCN (Krusius e Ruoslahti, 1986) e VCAN (Zimmermann e Ruoslahti, 1989), bem como o número de pares de bases (pb) dos produtos de PCR. *Primers* para o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, GAPDH, (Hodges e Chipman, 2002) foram utilizados para a padronização de expressão não-regulada.

Tabela 2 - Descrição dos *primers* utilizados nas PCRs

Molécula	<i>Primers</i>	Nº pb
GAPDH	senso: 5'-AACGGGAAGCTCACTGGCATG-3' anti-senso: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	306
SDC2	senso: 5'-GGGAGCTGATGAGGATGTAG-3' anti-senso: 5'-CACTGGATGGTTTGC GTTCT-3'	395
SDC4	senso: 5'-CGAGAGACTGAGGTCATCGAC-3' anti-senso: 5'-CGCGTAGAACTCATTGGTGG-3'	531
DCN	senso: 5'-CTTACGGAATTACATCTTGA-3' anti-senso: 5'-AGAAGCCTTTTTGGTGTGT-3'	303
VCAN	senso: 5'-AACATTTTTCAGGTGGTGAG-3' anti-senso: 5'-GATGCAGAACTTGGA ACTAT-3'	304

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

A mistura de reação foi amplificada em termociclador de PCR PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA, EUA) utilizando o seguinte programa: desnaturação por 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C (anelamento dos *primers*) e 1 minuto a 72°C (extensão do DNA); extensão final por 10 minutos a 72°C e refrigeração a 4°C.

Após as reações, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE contendo brometo de etídeo (10µg/mL), utilizando padrão de DNA com 100pb (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA). A visualização dos produtos de PCR no gel foi feita por meio do sistema Eagle Eyell (Stratagene, La Jolla, CA, EUA), utilizando luz ultravioleta e a densitometria das bandas pelo programa Quantity One 4.1.0 (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

4.3.2.4. Identificação dos Produtos de PCR

Para a confirmação da identidade, os produtos amplificados por PCR foram submetidos à digestão pelas seguintes enzimas de restrição: *Apa* I [*Acetobacter pasteurianus* sub. *pasteurianus*] (Promega Corp., San Luis Obispo, CA, EUA) para o GAPDH, *Hinc* II [*Haemophilus influenzae* Rc] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para o SDC2 e para o DCN, *Xba* I

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

[*Xanthomonas badrii*] e *Rsa* I [*Rhodopseudomonas sphaeroides*] (GIBCO BRL, Life Technologies, Rockville, MD, EUA) para o SDC4 e para o VCAN, respectivamente. Este procedimento consistiu na fragmentação de alíquotas dos produtos de PCR por enzimas específicas, cujos produtos têm tamanho conhecido.

Os produtos da digestão pelas enzimas foram visualizados em gel de agarose 1% e documentados pelo sistema Eagle Eyell (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). A tabela 3 relaciona as enzimas, os sítios e o tamanho dos fragmentos de restrição.

Tabela 3 - Descrição das enzimas de restrição utilizadas

Molécula	Enzima de Restrição	Sítio de Restrição	Fragmentos de Restrição (pb)
GAPDH	<i>Apa</i> I	GGGCC↓C	133 e 173
SDC2	<i>Hinc</i> II	GTY ¹ ↓R ² AC	66 e 329
SDC4	<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	189 e 342
DCN	<i>Hinc</i> II	GTY↓RAC	114 e 189
VCAN	<i>Rsa</i> I	GT↓AC	44 e 260

¹Y: base pirimídica

²R: base púrica

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.3.2.5. Determinação da Faixa Linear de Amplificação dos Genes

A faixa linear de amplificação dos genes foi determinada utilizando-se um *pool* do cDNA do grupo N. Para cada par de *primers* (tabela 2), realizamos a PCR por 18, 20, 22, 24, 27, 30, 33, 36, 38 e 40 ciclos de amplificação. Os produtos de cada uma das amplificações foram visualizados em gel de agarose 1%.

Após a densitometria das bandas, determinamos a faixa linear de amplificação para cada gene e escolhemos um número de ciclos através da banda de melhor visualização correspondente à região da curva que se situava entre 35 e 65% do valor máximo obtido. A condição assim determinada foi a utilizada para as posteriores amplificações em ambos os grupos de estudo (Q e N).

Um ajuste de qualidade das curvas foi feito em relação aos pontos iniciais para se determinar a melhor função matemática capaz de estimar os valores não encontrados. O índice de correlação também foi determinado para se analisar a tendência dos dados nessas amostras e verificar o nível de significância dessa tendência.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.3.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase Semiquantitativa

Este experimento utilizou amostras representativas de cDNA de cada um dos grupos de estudo, formando-se um *pool* de cDNA (10 indivíduos do grupo Q e 10 indivíduos do grupo N). Essas amostras foram submetidas à amplificação por PCR para cada gene, nas condições padronizadas no item 4.3.1.3 descrito acima, com quantidade fixa de cDNA (1µg), de modo a permitir comparações diretas entre as densidades das bandas amplificadas. Os produtos de PCR (bandas dos géis) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, documentados e submetidos à densitometria. Uma área de tamanho padronizado foi definida para cada conjunto de bandas no cálculo da densitometria. A “densidade de fundo” do gel (*background*) foi registrada em uma área idêntica e descontada dos cálculos e as densidades das amostras amplificadas foram comparadas com a da banda do padrão de DNA de tamanho mais próximo. Os resultados expressos representam a densidade de cada banda relativa à obtida para o GAPDH na mesma amostra. Para este gene (GAPDH) a densidade relativa foi considerada 100% uma vez que ele foi adotado como padrão interno de cada gel (padrão *housekeeping*).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

4.3.3. Imunolocalização dos HSPGs de Superfície Celular

Foi utilizada a imunolocalização, para confirmarmos a presença dos HSPGs SDC2 e SDC4 nos tecidos de nossa casuística. As amostras de tecidos dos indivíduos dos grupos Q e N foram analisadas após reações histoquímicas pela técnica da imunoperoxidase.

As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% tamponada com fosfato por no mínimo 24 horas, processadas e incluídas em parafina. Utilizamos um volume da solução de paraformaldeído equivalente a 10 vezes o volume da amostra para fixá-las.

Cortes de 3µm de espessura foram estendidos em lâminas de vidro previamente silanizadas a 10% (Sigma Chemical Co.). Os cortes foram desparafinizados e rehidratados e imersos em solução de ácido cítrico 10mM, pH 6,0, à 95° por 30 minutos para a recuperação antigênica. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita mediante imersão em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes e metanol na proporção 1:1. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 0,05M adicionado de Tween 20 0,05%, pH 7,6 em todas as reações.

As lâminas contendo os cortes histológicos foram incubadas por 40 minutos com os anticorpos primários anti-SDC2 e anti-SDC4 humanos policlonais produzidos em cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz,

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

CA, EUA), na diluição 1:100. Foram então incubadas com o anticorpo secundário do kit LSAB® + System-HRP (ref. K0690, Dako Co.). Os cortes foram revelados com solução Liquid DAB (ref. K3468, Dako Co.) por 10 minutos e contracolorados com hematoxilina de Meyer por 10 minutos. Estas reações foram realizadas em Auto-stainer (Universal Staining System, Dako Co., Carpinteria, CA, EUA).

Além das amostras de tecido dos grupos Q e N, as reações foram conduzidas com controles negativos na ausência de anticorpos primários e com controles positivos constituídos de reações com amostras de tecido nervoso, estomacal, gengival e muscular de humanos.

4.3.3. Análise dos Resultados

A expressão dos PGs estudados foi testada em relação a sua normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Uma vez constatada a distribuição normal, para a comparação das variáveis entre os grupos N e Q, os resultados foram analisados pelo teste *t* de Student. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa SPSS, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL., EUA). Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

fixou-se em 5% ($P \leq 0,05$) o nível para a rejeição da hipótese de nulidade (nível de significância).

Resultados

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5. RESULTADOS

5.1. Análise Anatomo e Histopatológica das Amostras

O exame macroscópico das cicatrizes estudadas revelou cicatrização imperfeita, irregular e elevada, epiderme de coloração variando de róseo ao castanho e derme de aspecto nodular, de consistência firme e dolorosa através de palpação (figura 4).

O estudo microscópico do tecido revelou epiderme com discreta acantose e derme com alta densidade de células mesenquimais, fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas com disposição concêntrica formando nódulos pequenos (figura 5).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 4 – Aspecto macroscópico da cicatriz queloideana. A, B, C, E e F, quelóide em lóbulo e orelha externa; D e H, quelóide abdominal; G, quelóide localizado no pescoço; I, quelóide localizado na nuca e na lateral posterior da cabeça e J, quelóide em região esternal.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 5 – Aspectos histológicos da pele normal e do tecido derivado de quelóide. A e B, pele normal. Notar derme apresentando poucos fibroblastos e fibras colágenas distribuídas homogeneamente. C a F, tecido de cicatriz quelóideana. Notar derme apresentando grande quantidade de fibroblasto e fibras colágenas concêntricas, formando nódulos. A a D, pequeno aumento; E, médio aumento e F, grande aumento. (coloração HE).

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.2. Análise da Expressão Transcricional dos PGs

5.2.1. Isolamento do RNA Total

O RNA total extraído das amostras dos indivíduos dos grupos Q e N estavam isentas de contaminação protéica, uma vez que a razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm situaram-se entre os valores 1,6 e 1,8.

Através da eletroforese do RNA total em gel de agarose 1%, verificou-se que os RNAs estavam íntegros (figura 6).

5.2.2. Obtenção da 1ª Fita de DNA Complementar

A figura 7 mostra os resultados da eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação da PCR qualitativa para o GAPDH, para se confirmar a integridade dos cDNAs obtidos pela reação de transcrição reversa.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 6 – Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de RNA total. N, grupo normal; Q, grupo quelóide; 28S e 18S bandas correspondentes ao RNA ribossomal das subunidades 28S e 18S.

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% das amostras amplificadas por PCR qualitativa para o GAPDH (306pb) obtidos a partir dos cDNAs das amostras do grupo normal (N) e do grupo quelóide (Q). Marcador de peso molecular (100pb).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase Qualitativa

A figura 8 mostra os resultados das eletroforeses em gel de agarose 1% características dos produtos de amplificação da PCR qualitativa, obtidos a partir de *pools* dos cDNAs das amostras dos grupos N e Q para os PGs estudados, SDC2, SDC4, DCN e VCAN e para o GAPDH.

5.2.4. Identificação dos Produtos de PCR

A figura 9 mostra os resultados da digestão com as enzimas de restrição dos produtos amplificados pela PCR para os PGs estudados, SDC2, SDC4, DCN e VCAN e para o GAPDH e a tabela 4 relaciona os mapas de restrição desses genes.

Os fragmentos dos produtos da digestão, separados por eletroforese em gel de agarose 1%, coincidem com aqueles mostrados nos mapas de restrição e por tanto confirmam a identidade dos genes.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR qualitativa obtidos a partir dos *pools* de cDNAs das amostras do grupo N (colunas ímpares) e do grupo Q (colunas pares) para os PGs estudados. 1 e 2, GAPDH (306pb); 3 e 4, SDC2 (395pb); 5 e 6, SDC4 (531pb); 7 e 8, DCN (303pb) e 9 e 10, VCAN (304pb). Marcador de peso molecular (100pb).

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1% representativa dos produtos de amplificação submetidos à ação das enzimas de restrição. 1, GAPDH (306pb); 2, GAPDH após a digestão com a enzima *Apa* I (133 e 173pb); 3, SDC2 (395pb); 4, SDC2 após a digestão com a enzima *Hinc* II (66 e 329pb); 5, SDC4 (531pb); 6, SDC4 após a digestão com a enzima *Xba* I (189 e 342pb); 7, DCN (303pb); 8, DCN após a digestão com a enzima *Hinc* II (114 e 189pb); 9, VCAN (304pb) e 10, VCAN após a digestão com a enzima *Rsa* I (44 e 260pb). Marcador de peso molecular (100pb).

ATCGGCTTAGGCTATAGTGCATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATTAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

Tabela 4 – Mapas de restrição dos genes estudados

Gene	Mapa de Restrição
GAPDH	<p>5'AACGGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTG TCAGTGGTGGACCTGACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGAC ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCGTCGGAGGGCC↓CCCTCAAGGGCATC CTGGGCTACACTGAGCACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACAC CCACTCCTCCACCTTTGACGCTGGGGCTGGCATTGCCCTCAACGACCACT TTGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGACAACGAATTTGGCTTACAGCAACAGGG TGGTGGAC3'</p>
SDC2	<p>5'GGGAGCTGATGAGGATGTAGAGAGTCCAGAGCTGACAACATCTCGACC ACTTCCAAAGATACTGTT↓GACTAGTGCTGCTCCAAAAGTGAAACCACGA CGCTGAATATACAGAACAAGATACCTGCTCAGACAAAGTCACCTGAAGAAA CTGATAAAGAGAAAAGTTCACCTCTCTGACTCAGAAAGGAAAATGGACCCAG CCGAAGAGGATACAAATGTGTATACTGAGAAACACTCAGACAGTCTGTTTA AACGGACAGAAGTCCTAGCAGCTGTCATTGCTGGTGGAGTTATTGGCTTTC TCTTTGCAATTTTCTTATCCTGCTGTTGGTGTATCGCATGAGAAAGAAGGA TGAAGGAAGCTATGACCTTGGAGAACGCAAACCATCCAGTG3'</p>
SDC4	<p>5'CGAGAGACTGAGGTCATCGACCCCCAGGACCTCCTAGAAGGCCGATAC TTCTCCGGAGCCCTACCAGACGATGAGGATGTAGTGGGGCCCCGGGCAGG AATCTGATGACTTTGAGCTGTCTGGCTCTGGAGATCTGGATGACTTGGAAG ACTCCATGATCGGCCCTGAAGTTGTCCATCCCTTGGTGCCT↓TAGATAAC CATATCCCTGAGAGGGCAGGGTCTGGGAGCCAAGTCCCCACCGAACCCAA GAAACTAGAGGAGAATGAGGTTATCCCCAAGAGAATCTCACCCGTTGAAGA GAGTGAGGATGTGTCCAACAAGGTGTCAATGTCCAGCACTGTGCAGGGCA GCAACATCTTTGAGAGAACGGAGGTCTGGCAGCTCTGATTGTGGGTGGC ATCGTGGGCATCCTCTTTGCCGTCTTCCTGATCCTACTGCTCATGTACCGT ATGAAGAAGAAGGATGAAGGCAGCTATGACCTGGGCAAGAAACCCATCTA CAAGGCCCCCCACCAATGAGTTCTACGCG3'</p>
DCN	<p>5'CTTACGGAATTACATCTTGATGGCAACAAAATCAGCAGAGTTGATGCAG CTAGCCTGAAAGGACTGAATAATTTGGCTAAGTTGGGATTGAGTTTCAACA GCATCTCTGCTGTT↓GACAATGGCTCTCTGGCCAACACGCCTCATCTGAG GGAGCTTCACTTGGACAACAACAAGCTTACCAGAGTACCTGGTGGGCTGG CAGAGCATAAGTACATCCAGGTTGTCTACCTTCATAACAACAATATCTCTGT AGTTGGATCAAGTGACTTCTGCCCACCTGGACACAACACCAAAAAGGCTT CT3'</p>
VCAN	<p>5'AACATTTTTCAGGTGGTGAGCCTGATGTTTTCCCCACAGTCCCATTCCAT GAGGAATTTGAAAGTGGAACAGCCAAAAAAGGGGCAGAATCAGTCACAGA GAGAGATACTGAAGTTGGTCATCAGGCACATGAACATACTGAACCTGTATC TCTGTTTCTGAAGAGTCTTCAGGAGAGATTGCCATTGACCAAGAATCTCA GAAAATAGCCTTTGCAAGGGCTACAGAAGTAACATTTGGTGAAGAGGTAGA AAAAGT↓ACTTTCTGTACATACACTCCCACTATAGTTCCAAGTTCTGCAT C3'</p>

Destaques azuis: sítios de anelamento dos primers senso (5') e antiseno (3').

Destaques vermelhos: sítios de restrição das endonucleases.

Setas: sítios de clivagem dos DNAs.

Fonte das seqüências de bases: *Genebank (NCBI)*

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.2.5. Determinação da Faixa Linear de Amplificação dos Genes

A figura 10 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR do GAPDH do *pool* de amostras do grupo N. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas dos grupos N e Q foi de 27. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 4º grau ($y = 0,002x^4 - 0,344x^3 + 15,61x^2 - 288,9x + 1863$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 96,7%.

A figura 11 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR do SDC2 do *pool* de amostras do grupo N. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas dos grupos N e Q foi de 33. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 4º grau ($y = 0,001x^4 - 0,233x^3 + 11,53x^2 - 236,4x + 1703$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 98,6% e índice de correlação das amostras foi de 67,87%, mostrando correlação positiva e fortemente significativa.

A figura 12 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR do SDC4 do *pool* de amostras do grupo N. O número de ciclos escolhido para as amplificações

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

semiquantitativas dos grupos N e Q foi de 33. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 4º grau ($y = 0,001x^4 - 0,173x^3 + 7,885x^2 - 148,6x + 985,4$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 98,4% e índice de correlação das amostras foi de 84,83%, mostrando correlação positiva e fortemente significativa.

A figura 13 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR do DCN do *pool* de amostras do grupo N. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas dos grupos N e Q foi de 33. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 3º grau ($y = -0,023x^3 + 2,044x^2 - 51,37x + 395,6$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 99,5% e índice de correlação das amostras foi de 77,55%, mostrando correlação positiva e fortemente significativa.

A figura 14 mostra a eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação para os produtos de PCR do VCAN do *pool* de amostras do grupo N. O número de ciclos escolhido para as amplificações semiquantitativas dos grupos N e Q foi de 33. A linha de tendência mostrada pelo gráfico foi ajustada em relação aos pontos iniciais da curva, onde coube uma função polinomial de 4º grau ($y = -0,002x^4 + 0,295x^3 - 10,83x^2 + 168,2x - 945$), sendo que a qualidade deste ajuste (R^2) foi de 99,1% e índice de

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

correlação das amostras foi de 91,77%, mostrando correlação positiva e muito fortemente significativa.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do *pool* de amostras do grupo N para o GAPDH (306pb). As setas mostram no gráfico representado e no gel o número de ciclos escolhidos para o experimento.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do *pool* de amostras do grupo N para o SDC2 (395pb). As setas mostram no gráfico representado e no gel o número de ciclos escolhidos para o experimento.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do *pool* de amostras do grupo N para o SDC4 (531pb). As setas mostram no gráfico representado e no gel o número de ciclos escolhidos para o experimento.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do *pool* de amostras do grupo N para o DCN (303pb). As setas mostram no gráfico representado e no gel o número de ciclos escolhidos para o experimento.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos ciclos crescentes de amplificação pela PCR do *pool* de amostras do grupo N para o VCAN (304pb). As setas mostram no gráfico representado e no gel o número de ciclos escolhidos para o experimento.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.2.6. Reação em Cadeia da Polimerase Semiquantitativa

A figura 15 mostra os resultados das eletroforeses em gel de agarose 1% características dos produtos de amplificação da PCR semiquantitativa, obtidos a partir de *pools* dos cDNAs das amostras dos grupos N e Q para os PGs estudados, SDC2, SDC4, DCN e VCAN e para o GAPDH.

A análise estatística dos resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov ($n=10$) dos nossos dados nos permitiu concluir que a amostra apresenta distribuição normal. A tabela 5 mostra a validação do método de RT-PCR utilizado para os genes estudados, na qual foram avaliados os coeficientes de variação intra e interreações.

A análise estatística do teste de Levene nos permitiu assumir a igualdade das variâncias para os nossos dados. A tabela 6 mostra a descrição dos resultados do teste t de Student para a igualdade das médias. Maiores quantidades de RNAm foram constatadas para o SDC2 (93% ou 2,0 vezes) e para o SDC4 (152,5% ou 2,5 vezes) no grupo Q, quando comparado ao grupo N ($P<0,01$). Entretanto, as quantidades de RNAm para o DCN e para o VCAN no grupo Q não mostraram diferenças significativas em comparação com as do grupo N.

A figura 16 apresenta graficamente a expressão dos PGs estudados, nos dois grupos de estudo N e Q.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados pela PCR semiquantitativa obtidos a partir dos *pools* de cDNAs das amostras do grupo N e do grupo Q para os PGs estudados. As duas primeiras colunas de cada gel indicam um marcador de peso molecular (100pb).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Tabela 5 – Estatística descritiva dos resultados do RT-PCR para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q. Os valores referem-se às densidades relativas das bandas no gel de agarose

	SDC2		SDC4		DCN		VCAN	
	N	Q	N	Q	N	Q	N	Q
n	10	10	10	10	10	10	10	10
Média	0,516	0,996	0,316	0,798	1,020	0,914	0,486	0,600
DP	0,098	0,102	0,223	0,087	0,115	0,143	0,170	0,123
MEP	0,044	0,045	0,100	0,039	0,052	0,064	0,076	0,055
CV	19,0	10,2	70,6	10,9	11,3	15,6	35,0	20,5

DP: Desvio Padrão

MEP: Média do Erro Padrão

CV: Coeficiente de Variação (%)

Tabela 6 – Resultados da densitometria dos produtos da RT-PCR semiquantitativa para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q. Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão das densidades relativas das bandas no gel de agarose. Os grupos foram comparados pelo teste *t* de Student (P)

	Densidade Relativa grupo N	Densidade Relativa grupo Q	Aumento transcricional absoluto no grupo Q	Aumento transcricional relativo no grupo Q	P
SDC2	0,516 $\pm$ 0,986	0,996 $\pm$ 0,102	2,0x	93%	0,000
SDC4	0,316 $\pm$ 0,223	0,798 $\pm$ 0,087	2,5x	152,5%	0,006
DCN	1,020 $\pm$ 0,115	0,914 $\pm$ 0,143	0,9x	(10,4)%	0,233
VCAN	0,486 $\pm$ 0,170	0,600 $\pm$ 0,123	1,3x	23,5%	0,259

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 16 – Resultados da densitometria dos produtos da RT-PCR semiquantitativa para o SDC2, SDC4, DCN e VCAN nos dois grupos de estudo N e Q. Os valores estão expressos em média das densidades relativas das bandas no gel de agarose. *, $p < 0,01$.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

5.3. Imunolocalização dos HSPGs de Superfície Celular

Os controles negativos da reação imunohistoquímica foram obtidos pela incubação dos cortes histológicos de amostras de tecidos do grupo Q com solução tampão ao invés do uso de anticorpo primário. Os controles positivos foram obtidos em quatro tecidos humanos diferentes: cérebro, estômago, músculo e gengiva. Os resultados das reações dos controles negativos e positivos estão mostrados na figura 17.

A imunolocalização do SDC2 e do SDC4 foi marcante nos componentes epiteliais, conectivos e vasculares dos dois grupos de estudo (figura 18). Nas amostras do grupo N nota-se a positividade de marcação tanto do SDC2 quanto do SDC4 mais evidente, nas camadas basais e intermediárias do epitélio de revestimento. No tecido conectivo a imunopositividade é homogênea na matriz que permeia o colágeno frouxo ou em dissociação. As amostras do grupo Q revelam positividade de marcação dos PGs estudados nas camadas basais e suprabasais do epitélio de revestimento, na lâmina própria, vasos e camadas subepiteliais. A marcação é difusa e com padrão granular característico. A imunopositividade também é observada em fibroblastos, células inflamatórias e nos ectodomínios relacionados com o colágeno de feixe fino ou dissociado.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 17 – Controles da reação imunohistoquímica. A, tecido quelóideano corado pela técnica de HE; B, controle negativo da reação imunohistoquímica: reação feita em tecido quelóideano na ausência de anticorpo primário. Controle positivo de marcação do SDC2 em corte histológico de cérebro (C) e de estômago (D). Controle positivo de marcação do SDC4 em corte histológico de músculo cardíaco (E) e de gengiva (F).

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Figura 18 – Reações imunohistoquímicas. A, reação do SDC2 em amostras do grupo N; B, reação do SDC4 em amostras do grupo N. C e D reações do SDC2 em amostras do grupo Q; E e F, reações do SDC4 em amostras do grupo Q. A e B, pequeno aumento; C e E, médio aumento; D e F grande aumento.

Discussão

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGATTCGGCATTTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho, avaliamos a expressão gênica de importantes proteoglicanos predominantes na superfície celular, o sindecam-2 e o sindecam-4 e na matriz extracelular, o decorim e o versicam, no quelóide e em comparação com a pele normal. Até o presente momento, nenhum trabalho havia analisado a expressão gênica desses proteoglicanos no tecido derivado de quelóide.

A avaliação que conduzimos forneceu-nos dados semiquantitativos que, comparados ao grupo controle, permitiram a identificação de um aumento da transcrição do RNAm para o SDC2 e do SDC4. Nossas análises transcricionais avaliaram o RNA total extraído das amostras de pele normal e de quelóide, de modo que vários tipos celulares do tecido conectivo e epitelial foram testados em conjunto. Não há dúvidas que esses tecidos se inter-relacionam e que a expressão de PGs de um tipo celular pode influenciar a homeostase dos tecidos como um conjunto. No quelóide, a expressão expandida do componente vascular e as características do infiltrado inflamatório devem justificar em parte, a maior expressão de SDCs nas amostras desse grupo.

O aumento observado na expressão dos SDCs no grupo Q tem íntima relação com a expressão de bFGF e outros fatores de crescimento. Além

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

disso, os SDCs promovem importantes sinalizações mitogênicas nos tecidos (Worapamorn et al., 2001a). Os SDCs modulam o fenótipo, a adesão, a proliferação, a diferenciação e a migração celular. Podem agir como co-receptores, não só intermediando a ligação, como também modificando a ação de vários fatores de crescimento e citocinas. Estudos da angiogênese já mostraram que o bFGF necessita não só seu receptor FGFR-1, mas também de SDC4 para agir na mitogênese mediada por trombina (Rauch et al., 2005). Whitworth et al. (2005) observaram, nas vizinhanças de adenocarcinomas de ovário, a marcação de neoangiogênese ativa mediada por bFGF com a participação de SDC3.

Os SDCs, na qualidade de HSPGs, funcionam como receptores de bFGF e outros fatores como aFGF, GM-CSF, além das citocinas IL-3, IFN- γ (Ruoslahti e Yamagushi, 1991). Isto permite que a MEC funcione como um grande reservatório de estimuladores do crescimento tecidual. Estes fatores, por sua vez, participam de um conjunto de modulações de síntese de MEC.

Os complexos formados pelos PGs e outros fatores teciduais permanecem ativos até sua liberação se promovida por enzimas como a plasmina, heparitinases e outras MMPs (Saksela e Rifkin, 1990). Vale salientar que existe uma convergência na literatura indicando uma aparente redução da expressão e da atividade de MMPs no quelóide. Um aspecto que merece especial atenção em futuros estudos é a regulação da dinâmica de liberação dos complexos formados pelos PGs com os fatores de crescimento. Um possível mecanismo a ser investigado é a expressão

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

aumentada de fatores de crescimento como uma resposta compensatória à atividade diminuída de MMPs na disponibilização dos fatores de crescimento.

Devemos considerar que existem múltiplos mecanismos de ativação/inibição de mediadores inflamatórios e MMPs envolvidos na polimerização seletiva dos PGs. Pequenas alterações qualitativas ou quantitativas em PGs específicos e fatores de crescimento podem significar grandes mudanças na arquitetura e na função do tecido.

O conhecimento da MEC e suas interações atingidas até o presente momento não nos permite compreender o mecanismo de patogênese do quelóide como um todo, ma desperta a atenção para a investigação de importantes componentes afetados.

Acreditamos que a expressão gênica aumentada dos SDCs que observamos no grupo Q seja acompanhada de mecanismos moduladores de sua tradução. A literatura atual é incapaz de respaldar a real constituição da cicatriz desses indivíduos ou de caracterizar uma maior proporção de PGs *in situ*. É possível que o aumento da matriz não-colagênica no quelóide esteja traduzido, em parte, pelo acúmulo de ácido hialurônico, entre outras substâncias. Entre algumas conseqüências clínicas, haveria aumento da pressão coloidosmótica, retenção hídrica e edema. A matriz expandida e hidratada facilitaria a migração celular e a evolução da lesão, à semelhança do que ocorre na morfogênese e no reparo (Laurent e Fraser, 1986). Esta

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

hipótese é partilhada por Stabellini et al. (2004) e necessita ainda ser testada por diferentes metodologias até sua confirmação.

É importante considerarmos que os fenômenos biológicos *in vivo* envolvem inúmeros mecanismos de sinalizações e retroações que ainda necessitam ser investigados. As células estão expostas às diversas citocinas e fatores de crescimento de maneira combinada e em eventos seqüenciais. Também se acredita que cada gene tenha seu tempo característico de indução a partir da exposição da célula aos seus estimulantes biológicos (Worapamorn et al., 2001b) e, sob esse raciocínio, toda a lesão poderia ser vista dentro de uma análise fragmentária de um determinado momento do fenômeno ou ainda um momento da indução de resposta.

Os PGs estudados sofrem extensa modulação durante a expressão celular. Alterações protéicas e, principalmente, variações estruturais nas cadeias de GAGs são eventos comuns. Essas variações ocorrem com maior frequência no número de cadeias, em seu comprimento e no padrão de sulfatação e resultam em transformações no tipo e na função do PG. Por outro lado, o controle dessas estruturas também existe, mediante mecanismos ainda pouco compreendidos, entretanto as necessidades biológicas de momentos distintos serão determinantes da adequação do PG a uma ou outra forma ou propriedade (Hardingham e Fosang, 1992).

Em nossa investigação observamos que o decorim não mostrou diferenças transcricionais no quelóide em comparação com o grupo controle. O mesmo resultado também foi encontrado por Gnoatto et al. (2003) em

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

seus estudos sobre a expressão desse PG no aumento gengival induzido pela ciclosporina-A. Este PG vem sendo estudado em diversos tecidos conectivos e atribui-se a ele importante papel modulador da fibrilogênese e organização do colágeno (Iozzo, 1998).

O decorim está relacionado com a proporção do colágeno fibrilar sintetizado na matriz extracelular (Bianco et al., 1990). Interações mais abrangentes entre estas macromoléculas e o tecido têm sido identificadas com o estudo aprofundado da fibrilogênese. Ligações cruzadas entre o colágeno, decorim e seus receptores no tecido conectivo já foram observadas. Estas macromoléculas formam um sistema de resposta fibrogênica em que ambas são capazes de responder de maneira similar a uma variedade de sinalizações (Voegel et al., 1997; Shrivastava et al., 1997).

A expressão inalterada dos genes para o decorim em nossas amostras de quelóides reforça a hipótese de que o grande acúmulo de colágeno existente no tecido possivelmente esteja relacionado à deficiência em sua degradação. Se, ao contrário, a síntese do colágeno estivesse aumentada, o PG em questão estaria sendo expresso em maior grau (Iozzo, 1998).

O decorim é um importante bloqueador de TGF- β , inibindo a proliferação celular (Yamaguchi et al., 2004) e a manifestação de lesões fibróticas (Border et al., 1992; Isaka et al., 1996). Em sendo um importante reservatório de TGF- β , o DCN pode disponibilizá-lo em determinadas

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

ocasiões, na dependência de mecanismos sinalizadores e da ação do biglicam, um proteoglicano estimulante da fibrillogênese (Hildebrand et al., 1994; Kresse et al., 1994; Takeuchi et al., 1994). O decorim mostrou-se capaz de inibir a proliferação de células de carcinoma de cólon, independentemente de TGF- β , mediante a inibição da atividade de quinases ciclina-dependentes, sendo identificado como indicador de bom prognóstico nestes tumores (De Luca et al., 1996). O TGF- β , por sua vez, estimula a expressão tanto do decorim quanto do biglicam (Hardingham e Fosang, 1992).

Se o decorim, em determinadas circunstâncias, bloqueia fatores de crescimento, funciona como importante reservatório e biodisponibilizador dos mesmos em ocasiões futuras, assumindo papel fibrillogênico na dependência de mecanismos sinalizadores (Hildebrand et al., 1994).

Isto provavelmente ocorre porque a inibição da atividade de TGF- β pelo decorim é contrabalanceada pelas ações do biglicam, estimulante da fibrillogênese. Este PG disponibiliza TGF- β , antagonizando o bloqueio pelo decorim (Kresse et al., 1994; Takeuchi et al., 1994).

Além de estimular a síntese de biglicam e ser regulado pelo decorim, o TGF- β também induz a síntese de versicam (Kähäri et al., 1991; Iozzo et al., 1997). Estes mecanismos evidenciam importantes interações reguladoras entre os PGs, pouco exploradas nos tecidos cicatriciais.

Não encontramos alteração da expressão de versicam no grupo Q quando comparado com o grupo controle. O aumento desse PG está

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

associado, em muitos casos, a hiper celularidade (Tiedemann et al., 1997; Haase et al., 1998), o que aparentemente não ocorre no quelóide (Urioste et al., 1999). Sob esse aspecto, a inexistência de aumento na expressão do versicam no grupo Q é compatível com o perfil celular atribuído ao tecido analisado.

O versicam estabelece uma eficiente ponte molecular entre a superfície celular e a MEC. Uma das extremidades de sua molécula liga-se a glicoproteínas da superfície celular enquanto a outra se liga ao ácido hialurônico. Uma vez que este também se liga à superfície celular via receptor CD44, a molécula de versicam funciona como um estabilizador do complexo supramolecular em torno da membrana plasmática (Karvinen et al., 2003).

A distribuição deste PG merece ser estudada no quelóide, pois sua molécula deve estar, em parte, comunicando o componente celular com o complexo de ácido hialurônico aparentemente aumentado nessa cicatriz (Matsuoka et al., 1988). Por outro lado, essa comunicação deve estar adaptada às proporções severamente aumentadas de colágeno intersticial, o que também deve modular a expressão deste PG.

Estudos em outros tecidos conectivos verificaram expressão aumentada de versicam por fibroblastos, bem como células do músculo liso, induzidos por TGF- β , PDGF e fatores de crescimento de epiderme (EGF) (Tiedemann et al., 1996). As complexas interações de bloqueio e ativação de

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

TGF- β pelo decorim muito provavelmente repercute na expressão do versicam, hipótese que merece ser estudada na patogênese do quelóide.

É importante ressaltar que toda investigação tem sua credibilidade testada por parâmetros que quase sempre relacionam o tamanho da amostra e os limites de execução. Nosso trabalho, assim como a maioria das investigações analisadas, teve como objeto de estudo, seres humanos submetidos a cirurgias reparadoras com qualidade de vida severamente comprometida. A intenção da pesquisa médica é trabalhar em prol da melhoria dessas condições, porém dentro dos limites clínicos. A obtenção de amostras de quelóides destes pacientes nem sempre garante material biológico suficiente para análises tão extensivas quanto as idealizadas mediante diferentes metodologias. Essa dicotomia certamente é uma das justificativas para o fato da maioria da literatura revisada possuir casuística reduzida. Seus resultados, no entanto, subsidiam o paradigma atualmente proposto da patogênese do quelóide.

Nossa casuística é maior que a que compõe a maioria dos estudos analisados. Entretanto, tal projeto obrigou-nos a distribuir o escasso material clínico obtido, de maneira a viabilizá-lo. A composição de amostras reunidas na forma de *pools* foi a solução encontrada para os ensaios de expressão de RNAm, que representavam uma ameaça de extinção do material já na fase de padronização das reações e validação técnica.

A homogeneidade observada nos produtos de PCR qualitativa e a reprodutibilidade observada rotineiramente nas quintuplicatas de

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

amplificações gênicas foram requisitos determinantes na escolha de nossa metodologia.

Infelizmente, ainda não estamos no tempo de discutir formas alternativas ao tratamento convencional dos quelóides com propriedade, entretanto, algumas perspectivas terapêuticas para esse fim estão surgindo com base nos estudos mais recentes da MEC.

Nossos achados associados com a literatura atual levam-nos a acreditar que a modulação terapêutica efetiva do quelóide esteja vinculada ao controle da ação de fatores de crescimento. Comentamos anteriormente que os SDCs têm íntima relação com o bFGF e em suas funções. O bFGF, por sua vez, necessita a presença de HS para a ligação ao seu receptor. Yayon et al. (1991) verificaram em experimentos com células de hamsters que o receptor de bFGF mostrava maior afinidade pelo fator de crescimento na presença de HS do que na sua ausência. O estudo do controle deste fator *in loco* pode representar uma possibilidade de tratamento do quelóide.

Qiao et al. (2003) observaram em seu estudo imunohistoquímico do tecido nervoso central a necessidade de HS para que o bFGF estimulasse a proliferação das células endoteliais e atribuíram às cadeias de HS do SDC2 e do SDC4 a capacidade de formação de complexos ternários entre as células endoteliais, o bFGF e seu receptor FGFR-1. Estas informações nos chamam atenção à investigação de mecanismos análogos no tecido gengival, bem como de modulações do SDC2 e SDC4, que mostraram expressão aumentada em nosso estudo.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Rapraeger et al. (1991) constataram que o bloqueio das ligações entre os HSPGs e bFGF reduz a ligação do fator de crescimento ao seu receptor, bloqueia suas ações em fibroblastos da linhagem Swiss 3T3 e induz diferenciações celulares normalmente reprimidas por ele. Na pesquisa médica, uma abordagem como essa foi recentemente apontada por Whitworth et al. (2005) como perspectiva terapêutica do adenocarcinoma de ovário e pode ter potencial similar no tratamento local do quelóide. Os autores investigaram a distribuição de uma sonda marcadora de HS ativo (FGFR-1, isoforma c), que ocorreu em sítios vizinhos ao tumor indicando a sinalização da angiogênese nas porções basais do endotélio, onde também se evidenciou a participação do SDC3. Em teoria, o bloqueio desses sítios pode representar uma possibilidade de tratamento dos crescimentos tumorais.

Qualquer modalidade de tratamento dos quelóides representa um desafio à pesquisa, não só de sua eficácia clínica, mas principalmente no que antecede sua aplicação, em ensaios *in vitro*, estudos experimentais e finalmente nos aspectos farmacodinâmicos. Ironicamente, as terapias estudadas até o presente momento para os quelóides partiram de casualidades clínicas e sua aplicação iniciou-se de maneira bastante empírica.

Os estudos de cicatrização de feridas de fetos (Samuels e Tan, 1999; Wilgus, 2007) podem ajudar os pesquisadores a compreender o que é importante para a cicatrização e, talvez mais importante, como pode ser

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

evitada a formação de cicatriz. A descoberta da biologia da regeneração fetal levou a novas estratégias de prevenção e tratamento de cicatrizes e fibrose. As respostas das células e da matriz de cicatrização de feridas de adultos poderiam ser manipuladas de numerosas maneiras para reduzir as cicatrizes: inibição da resposta inflamatória na ferida através do bloqueio de citocinas inflamatórias, adição de tenascina exógena para facilitar a migração de queratinócitos e fibroblastos para a ferida, o transplante de fibroblastos com características fetais para o local da ferida em adultos, proporcionar um arcabouço mais poroso para a ferida através do acréscimo de ácido hialurônico para incrementar a migração de fibroblastos e promover a regeneração de uma organização reticular normal do colágeno da derme ferida.

Embora todas essas estratégias potenciais exijam avaliação científica rigorosa, é possível a modificação da cicatrização de feridas de adultos para um fenótipo semelhante à cicatrização fetal (sem cicatriz) através da modificação de um ou mais componentes que são diferentes no reparo fetal e do adulto (De Buys Roessingh et al., 2006).

Nossos achados corroboram com o atual conhecimento sobre a fisiopatologia do quelóide, trazendo novos indícios de que sua MEC não-colagênica é sede de importantes sinalizações envolvendo fatores de crescimento, GAGs, PGs e fatores inflamatórios. Na medida em que essas vias venham a ser elucidadas, poderemos estabelecer melhor a patogênese do quelóide e aprimorar seu tratamento. A evolução biotecnológica e o

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

crescente acesso ao genoma humano certamente melhoram as perspectivas de aquisição desses conhecimentos.

Os avanços da biologia celular e molecular têm permitido analisar a expressão gênica em diversos eventos biológicos. Isto vem promovendo um grande impacto no estudo da patogênese de importantes doenças e alterações de desenvolvimento, auxiliando o diagnóstico, prognóstico e tratamento. A prática de seqüenciamento de DNA vem permitindo a identificação de genes associados à suscetibilidade genética a determinadas doenças, bem como a detecção de mutações e polimorfismos, propiciando o desenvolvimento de terapias gênicas.

Neste estudo, o acesso ao RNAm das amostras dos indivíduos analisados e a amplificação de seqüências complementares de DNA por PCR, permitiu-nos armazenar uma biblioteca genética para seu futuro seqüenciamento, o que poderá contribuir para novas descobertas.

O estudo da interação dos fármacos no metabolismo intracelular no nível da expressão gênica dos componentes da MEC é a nossa proposta para investigações futuras. Este estudo poderá contribuir para uma melhor compreensão da resposta inflamatória às diferentes estimulações e suas repercussões no complexo supramolecular que constitui a matriz.

Conclusões

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

7. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo nos permitiram concluir que:

1. O quelóide manifestou maior expressão de sindecam-2 e sindecam-4 em comparação com a pele normal de indivíduos que não fazem esse tipo de cicatriz;
2. Os SDCs de expressão gênica aumentada no grupo Q foram detectados *in situ*, com imunolocalização nos tecidos epitelial, conectivo e endotelial;
3. Não houve diferença significativa na expressão de decorim e versicam entre os grupos estudados;
4. Nossos achados complementam o conhecimento atual com novos indícios de que a MEC não-colagênica tem um papel de destaque em importantes sinalizações envolvendo fatores de crescimento, GAGs, PGs e fatores inflamatórios no quelóide.

Anexos

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGATTCGGCATTTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

ANEXO 1

Modelo do termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Protocolo nº 915/04).

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	
1	
ANEXO I	
DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA FMUSP	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de Tecido Epitelial (QUELÓIDE)	
<i>Expressão Gênica de Proteoglicanos de Matriz Extracelular no Quelóide</i>	
1. IDENTIFICAÇÃO DO DOADOR DE TECIDO EPITELIAL (QUELÓIDE)	
Nome: _____	
Identidade nº: _____	Órgão Expedidor: _____ Sexo: ☐ M ☐ F
Data de Nascimento: ____/____/____	Naturalidade: _____
Endereço: _____ Complemento: _____	
CEP: _____	Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: (____) _____
Registro de Identificação do Paciente: _____	
Responsável legal (quando aplicável): _____	
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc) _____	
Identidade nº: _____	Órgão Expedidor: _____ Sexo: ☐ M ☐ F
Data de Nascimento: ____/____/____	Naturalidade: _____
Endereço: _____ Complemento: _____	
CEP: _____	Cidade: _____ Estado: _____ Telefone: (____) _____
2. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA	
2.1. Título do Projeto de Pesquisa	
Expressão Gênica de Proteoglicanos de Matriz Extracelular no Quelóide	
2.2. Médico Responsável:	
Dr. Marcus Castro Ferreira CRM 12926	
2.3. Coordenadora:	
Dra. Mônica Valeria Marquezini CRBM: 2006	
2.4. Alunos de pós-graduação:	
Daniel Siquieroli Vilas Boas CRB: 31669/01-D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

19

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem risco ☐Risco mínimo ☒Risco médio ☐Risco baixo ☐Risco maior ☐TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PARA PARTICIPAR DE UM ESTUDO EXPERIMENTAL

4. INFORMAÇÃO AO DOADOR DE QUELÓIDE

Você está sendo convidado para participar, como doador de tecido (quelóide), de um estudo que tem como objetivo pesquisar a formação de quelóide (cicatriz), em especial as proteínas das células da pele que podem estar envolvidas nesse processo. Este estudo, denominado "Expressão gênica de proteoglicanos de matriz extracelular no quelóide" está sendo realizado sob responsabilidade do Dr. Marcus Castro Ferreira, cirurgião e da Dra. Mônica Valéria Marquezini, coordenadora da pesquisa.

Para decidir se você deve concordar ou não em participar deste estudo, você deverá estar bem informado(a) sobre os riscos e benefícios envolvidos. Pedimos que você leia este termo de consentimento e esclareça qualquer dúvida antes de concordar em participar.

5. OBJETIVO DO ESTUDO

Quelóides são cicatrizes patológicas que excedem as margens originais do ferimento. Existem pessoas que os formam após qualquer tipo de ferimento, corte cirúrgico ou, ainda, espontaneamente.

Você está sendo convidado (a) porque seu médico indicou uma cirurgia plástica onde pedaços de pele (tecido) serão eliminados. Este é um estudo "in vitro", isto é, o tecido removido (que normalmente seria descartado) será estudado em laboratório.

O procedimento na sua cirurgia será o mesmo participando ou não deste estudo. O resultado da pesquisa não lhe trará benefício direto, mas poderá auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de tratamento para amenizar ou mesmo evitar a formação de quelóide.

6. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

O seu médico poderá pedir sua autorização para conseguir seu prontuário médico (histórico) com outros médicos e hospitais onde você já foi tratado. Esses registros sobre sua cicatriz e outros problemas clínicos ajudarão a analisar os resultados obtidos.

Se concordar em participar deste estudo, você, após assinar este termo de consentimento, passará pelos procedimentos descritos a seguir.

6.1. Triagem

- Entrevista para coleta e registro de seus dados pessoais e história clínica.
- Medida e registro de seus sinais vitais (pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura) e medida e registro de seu peso e sua altura.
- Explicação detalhada do protocolo experimental, seus riscos médios e possíveis desconfortos.
- Consulta médica.

Caso a sua história se enquadre dentro dos requisitos do estudo, você poderá participar.

Caso seja selecionado, você deverá seguir todas as orientações do médico responsável pelo seu acompanhamento. Caso seja necessário utilizar algum medicamento diferente do prescrito por seu médico, você deve informar o responsável pelo estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

20

O tecido a ser doado será retirado durante a cirurgia já programada. Não será executado nenhum procedimento extra e o tecido, que normalmente seria descartado, será armazenado para estudo posterior no laboratório de pesquisa.

6.2. Segurança do Voluntário

A sua participação no estudo é voluntária e você terá tempo para decidir se deseja participar. Caso aceite participar, ainda assim, você tem o direito de desistir e interromper sua participação a qualquer momento, sem necessidade de justificar. Solicitamos apenas, que você comunique aos investigadores da decisão de sair do estudo. Independente da sua decisão, o seu tratamento (cirúrgico e pós-cirúrgico) não será prejudicado.

A pesquisa da qual você é voluntário tem risco mínimo para o participante, uma vez que esta doação é feita através de uma intervenção cirúrgica já indicada pelo seu médico. Qualquer incômodo que você venha sentir não será aumentado pelo fato de ter autorizado o uso da pele removida para pesquisa.

Todos os estudos são previamente submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP que somente aprova estudos considerados éticos e seguros, seguindo as exigências da legislação brasileira para a realização de estudos clínicos (Normas de 196 de 10/10/1996 e 25 de 07/08/1997 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde).

6.3. Sigilo

Todas as informações pessoais obtidas durante o estudo são estritamente confidenciais e os registros no seu prontuário estarão disponíveis apenas para a equipe envolvida no estudo. Os dados obtidos poderão ser publicados apenas com fins científicos, sendo que a sua identidade permanecerá em sigilo.

6.4. Em caso de dúvidas

Você deverá guardar este termo de consentimento e toda vez que tiver algum problema ou dúvidas sobre este estudo, entre em contato com o médico responsável pelo seu tratamento – Dr. Marcus Castro Ferreira no telefone (0xx11) 3062-0415 ou com a coordenadora responsável Dra. Mônica Valeria Marquezini no telefone: (0xx11) 3066-7453.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

21

Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido do Doador de Tecido Epitelial (Quelóide)

Leia cuidadosamente as informações e o Formulário de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente. Faça perguntas se algo não estiver claro ou você precisar de mais informações.

Fui informado verbalmente e por escrito pelo médico sobre os objetivos e procedimentos do estudo e que o mesmo não trará problemas para minha saúde.

Li e compreendi as informações e minhas perguntas com relação à participação no estudo clínico foram satisfatoriamente respondidas.

Tive tempo suficiente para decidir se participo ou não do estudo.

Concordo que os dados da pesquisa feita possam ser divulgados para publicações científicas. Compreendo que isto significa que meus dados podem ser enviados para outros países.

Minha participação neste estudo é de minha livre espontânea vontade. Posso retirar meu consentimento em participar a qualquer momento e sem dar motivos. Isto não resultará em nenhuma desvantagem para meu posterior tratamento médico.

Estou ciente de que informarei ao investigador sobre quaisquer medicações concomitantes tomadas tanto prescritas por um médico quanto compradas sem prescrição.

Recebi uma cópia de meu formulário de consentimento do paciente.

Concordo que meus dados da pesquisa sejam usados para estudos futuros.

Sua assinatura indica que você leu e entendeu as informações descritas acima, que você teve a oportunidade de tirar as suas dúvidas e que concorda espontaneamente em participar deste estudo

Nome do Paciente do Estudo em Letra de Forma

Data

Assinatura do Paciente do Estudo

Nome do Responsável ou Representante Legal em Letra de Forma (quando aplicável)

Data

Assinatura do Responsável ou Representante Legal

Nome do Investigador Clínico ou de seu representante que obteve o Termo de consentimento

Data

Assinatura do Investigador Clínico ou de seu representante

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

ANEXO 2

Modelo do termo de doação de tecidos / células – *in vivo* do Banco de Tecidos Instituto Central do Hospital das Clínicas.

DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA E QUEIMADURAS BANCO DE TECIDOS ICHC	
Laboratório de Investigação Médica – LIM 04 – FMUSP	
TERMO DE DOAÇÃO DE TECIDOS / CÉLULAS – IN VIVO	
Eu _____ nascido em ____/____/____ portador (a) de cédula de identidade no. _____, CIC no. _____, residente e domiciliado (a) à Rua _____, Cidade _____ Estado: _____ CEP: _____ Telefone: () _____, estando no juízo de minhas atribuições, APÓS ESCLARECIMENTO feito pela equipe médica acerca da necessidade da retirada de _____ como parte integrante do ato cirúrgico ao qual serei submetido (a) e do destino dado normalmente a este tecido, ACEITO doar, gratuitamente, este tecido e/ou seus componentes para finalidade de pesquisa de novas técnicas em ciências da saúde e biotecnologia, cultivo e criopreservação de células, transplante homólogo (todo ou partes) a receptor, ou outro destino que o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas venha a considerar de interesse público.	
São Paulo, ____ de _____ de _____	
ASSINATURA DO DOADOR: _____	
1ª Testemunha: Nome: _____	
Ass: _____	
2ª Testemunha: Nome: _____	
Ass: _____	
<div style="border: 1px solid black; height: 60px; width: 100%;"></div> <div style="text-align: center;">COLAR ETIQUETA DO DOADOR</div>	
BTICHC/ M. Herson/

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

ANEXO 3

Aprovação do Protocolo de Pesquisa (nº 915/04), inclusive do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

RECEBIDO SPG 15.12.04
ASS:

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 25.11.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **915/04**, intitulado: **"Expressão gênica de proteoglicanos de matriz extracelular no quelóide"** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Orientador: *Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira*
Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Mônica Valeria Marquezini**
Pesquisador(a) Executante: **Sr. Daniel Siquieroli Vilas Boas**

Ciente, CAPPesq, 25 de Novembro de 2004.

PROF. DR. MARCUS CASTRO FERREIRA
Professor Titular da Disciplina
de Cirurgia Plástica - FMUSP

PROF. DR. CLAUDIO LEONE
Vice - Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 255. 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGCTATTAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGGCTAGAGTCGATCG

ANEXO 4

Folha de Rosto (FR – 052587) para pesquisa envolvendo seres humanos, Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP			
FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS			FR-052587
Projeto de Pesquisa			
Expressão gênica de proteoglicanos de matriz extracelular no quelóide			
Área de Conhecimento		Grupo	Nível
4.01 - Medicina		Grupo I	Não se Aplica
Área(s) Temática(s) Especial(s)		Fase	
1.1-Genética Humana		Fase I	
Unitermos			
Expressão de proteoglicanos, proteoglicanos de matriz extracelular, quelóide, cicatrização			
Sujeitos na Pesquisa			
Nº de Sujeitos no Centro	Total Brasil	Nº de Sujeitos Total	Grupos Especiais
20	20	20	
Placebo	HIV / AIDS	Wash-out	Sem Tratamento Específico
NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Banco de Materiais Biológicos			
NÃO			
Pesquisador Responsável			
Pesquisador Responsável		CPF	Identidade
Daniel Siqueira Vilas Boas		270.42.8.7-88	25845469-8
Área de Especialização		Mayor Titulação	Nacionalidade
Ciências Biológicas		Especialista	Brasileira
Endereço		Bairro	Cidade
Rua Pernambuco 35 apto 72		Gonzaga	Santos - SP
Código Postal	Telefone	Fax	Email
11065-050	(13)3286-1966 /		biodsvb@uol.com.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.			
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.			
Data: 30 / 06 / 2004			
Assinatura			
Instituição Onde Será Realizado			
Nome		CNPJ	Nacional/Internacional
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo		56.577.059/0001-00	Nacional
Unidade/Órgão		Participação Estrangeira	Projeto Multicêntrico
Disciplina de Cirurgia Plástica		NÃO	NÃO
Endereço		Bairro	Cidade
Doutor Arnaldo, 455		Pinheiros	São Paulo - SP
Código Postal	Telefone	Fax	Email
01245-9	11 30667364		edna@plastica.fm.usp.br
Termo de Compromisso			
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Nome: _____			
Data: ____/____/____ Assinatura			
Patrocinador			
Nome		CNPJ	
NÃO SE APLICA		-	
Endereço		Bairro	Cidade
-		-	-
Código Postal	Telefone	Fax	Email
-	-	-	-
Responsável		Cargo / Função	
-		-	
O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 22/06/2004. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.

Referências

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTGGAATCGGCATTATAGCTGATCGCTAGCTCTAGCTGCAATACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGGTAGCGGCTAGAGTGGATCG

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

9. REFERÊNCIAS

Abergel RP, Pizzurro D, Meeker CA, Lask G, Matsuoka LY, Minor RR, et al. Biochemical composition of the connective tissue in keloids and analysis of collagen metabolism in keloid fibroblast cultures. *J Invest Dermatol.* 1985;84(5):384-90.

Alster TS, Tanzi EL. Hypertrophic scars and keloids: etiology and management. *Am J Clin Dermatol.* 2003;4(4):235-43.

Alster TS, West TB. Treatment of scars: a review. *Ann Plast Surg.* 1997;39(4):418-32.

Andriessen MP, van den Born J, Latijnhouwers MA, Bergers M, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J. Basal membrane heparan sulphate proteoglycan expression during wound healing in human skin. *J Pathol.* 1997;183(3):264-71.

Ansorena R, Zubiri L, Merino R, Cano J, Urdanoz M, Cia A, et al. Use of cryotherapy in the Rochapea Health Centre. *An Sist Sanit Navar.* 1998;21(2):217-21.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Atiyeh BS, Costagliola M, Hayek SN. Keloid and hypertrophic scar: the controversy: review of the literature. *Ann Plast Surg.* 2005;54(6):676-80.

Archer HL, Gupta S, Enoch S, Thompson P, Rowbottom A, Chua I, et al. Distinct phenotype associated with a cryptic subtelomeric deletion of 19p13.3-pter. *Am J Med Genet A.* 2005;136(1):38-44.

Azad S, Mendoza B, Sacks L. A technical modification for effective fenestration of small split-skin grafts. *Br J Plast Surg.* 2002;55(6):539.

Barbul A. Immune aspects of wound repair. *Clin Plast Surg.* 1990;17(3):433-42.

Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease and transforming growth factor beta 2 polymorphisms. *Br J Plast Surg.* 2002;55(4):283-6.

Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease and hypertrophic scarring: transforming growth factor beta1 common polymorphisms and plasma levels. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(2):535-43.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Bayat A, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease: transforming growth factor beta receptor gene polymorphisms are not associated with keloid disease. *Exp Dermatol*. 2004;13(2):120-4.

Bayat A, Walter JM, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease: mutation screening of the TGFbeta3 gene. *Br J Plast Surg*. 2005;58(7):914-21.

Berman B, Bieleley H. Keloids. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(1):117-23.

Bernfield M, kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, et al. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:365-93.

Bianco P, Fischer LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem*. 1990;38(11):1549-63.

Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem*. 1992;267(8):5250-6.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Bischoff SC, Baggiolini M, De Weck AI, Dahinden CA. Interleukin 8-inhibitor and inducer of histamine and leukotriene release in human basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179(1):628-33.

Bloch EF, Hall MG, Denson MJ, Slay-Solomon V. General immune reactivity in keloid patients. *Plast Reconstr Surg.* 1984;73(3):448-51.

Bloom D. Heredity of keloids: A review of the literature and report family with multiple keloids in Five generations. *N Y State J Med.* 1956;56(4):511-9.

Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi YU, Mann DM, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature.* 1992;346(6402):381-4.

Bosman FT, Stamenkovic I. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol.* 2003;200(4):426-8.

Boxman IL, Ruwhof C, Boerman OC, Löwik CW, Ponc M. Role of fibroblasts in the regulation of proinflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch Dermatol Res.* 1996;288(7):391-8.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Brown CT, Nugent MA, Lau FW, Trinkaus-randall V. Characterization of proteoglycans synthesized by cultured corneal fibroblasts in response to transforming growth factor beta and fetal calf serum. *J Biol Chem.* 1999;274(11):7111-9.

Buffoni F, Raimondi L. A lysyl oxidase with histaminase activity in the pig aorta. *Agents Actions.* 1981;11(1-2):38-41.

Butnaru CA, Kanitakis J. Structure of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(6):II-IV.

Carney SL, Muir H. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev.* 1988;68(3):858-910.

Carrino DA, Sorrell JM, Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycan of human skin. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373(1):91-101.

Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ. Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF-beta1 production by human dermal fibroblasts. *Dermatol Surg.* 2002;28(8):704-9.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Castagnoli C, Peruccio D, Stella M, D'Alfonso S, Momigliano PR, Magliacani G, et al. The HLA-DR beta 16 allo genotype constitutes a risk factor for hypertrophic scarring. *Hum Immunol.* 1990;29(3):229-32.

Chen Y, Gao JH, Liu XJ, Yan X, Song M. Linkage analysis of keloid susceptibility loci on chromosome 7p11 in a Chinese pedigree. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Bao.* 2006;26(5):623-5.

Chernousov MA, Carey DJ. N-syndecan (syndecan 3) from neonatal rat brain binds basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 1993;268(22):16810-4.

Clark-Lewis I, Kim K, Rajarathnam K, Gong J, Dewald B, Moser B, et al. Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol.* 1995;57(5):703-11.

Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci.* 1993;306(1):42-8.

Cohen IK, McCoy BJ, Mohanakumar T, Diegelmann RF. Immunoglobulin, complement and histocompatibility antigen studies in keloid patients. *Plast Reconstr Surg.* 1979;63(5):689-95.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Cosman B, Crikelair GF, Ju DMC, Lattes R. Surgical management of keloids. *Plast Reconstr Surg*. 1961;27:335-45.

Craig RD. Collagen biosynthesis in normal human skin, normal and hypertrophic scar and keloid. *Eur J Clin Invest*. 1975;5(1):69-74.

Crockett DJ. Regional keloid susceptibility. *Br J Plast Surg*. 1964;17:245-53.

Datubo-Brown DD. Keloids: a review of the literature. *Br J Plast Surg*. 1990;43(1):70-7.

De Buys Roessingh AS, Hohlfeld J, Scaletta C, Hirt-Burri N, Gerber S, Hohlfeld P, et al. Development, characterization, and use of a fetal skin cell bank for tissue engineering in wound healing. *Cell Transplant*. 2006;15(8-9):823-34.

Delehedde M, Lyon M, Sergeant N, Rahmoune H, Fernig DG. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001;6(3):253-73.

De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(31):18961-5.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Diegelmann RF, Cohen IK, McCoy BJ. Growth kinetics na collagen synthesis of normal skin, normal scar and keloid fibroblasts in vitro. *J Cell Physiol.* 1979;98(2):341-6.

Dorn H. Keloid formation after revaccination of uniovular twins. *Z Haut Geschlechtskr.* 1957;23(3):78-82.

Eishi K, Bae SJ, Ogawa F, Hamasaki Y, Shimizu K, Katayama I. Silicone gel sheets relieve pain and pruritus with clinical improvement of keloid: possible target of mast cells. *J Dermatolog Treat.* 2003;14(4):248-52.

Elenius K, Vainio S, Laato M, Salmivirta M, Thesleff I, Jalkanen M. Induced expression of syndecan in healing wounds. *J Cell Biol.* 1991;114(3):585-95.

English RS, Shenefeldt PD. Keloids and Hypertrophic scars. *Dermatol Surg.* 1999;25(8):631-8.

Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol.* 2000;148(4):811-24.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Font B, Aubert-Foucher E, Goldschmidt D, Eichenberger D van der Rest M. Binding of collagen XIV with the dermatan sulfate side chain of decorin. *J Biol Chem.* 1993;268(33):25015-8.

Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, van der Rest M. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* 1996;15(5):341-8.

Gallo R, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS, Bernfield M. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol.* 1996;107(5):676-83.

Gallo R, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(23):11035-9.

Garner WL, Rodriguez JL, Miller CG, Till GO, Rees RS, Smith DJ, et al. Acute skin injury releases neutrophil chemoattractants. *Surgery.* 1994; 116(11):42-8.

Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 2001;69(4):513-21.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Gnoatto N, Lotufo RF, Toffoletto O, Marquezini MV. Gene expression of extracellular matrix proteoglycans in human cyclosporin-induced gingival overgrowth. *J Periodonthol.* 2003;74(12):1747-53.

Haase HR, Clarkson RW, Waters MJ, Bartold PM. Growth factor modulation of mitogenic responses and proteoglycan syntesis by human periodonthal fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1998;174(3):353-61.

Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM, Larjava H. Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res.* 1996;75(10):1767-78.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6(3):861-70.

Hardingham T, Heng B, Gribbon P. New approaches to the investigation of hyaluronan networks. *Biochem Soc Trans.* 1999;27(2):124-7.

Har-Shai Y, Amar M, Sabo E. Intralesional cryotherapy for enhancing the involution of hypertrophic scars and keloids. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(6):1841-52.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Hedbom E, Heinegard D. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 1993;268(36):27307-12.

Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twadzik DR, Border WA, et al. interaction of the small interstitial proteoglycan biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302(pt.2):527-34.

Hocking AM, Strugnell RA, Ramamurthy P, McQuillan DJ. Eukaryotic expression of recombinant biglycan. Post-translational processing and the importance of secondary structure for biological activity. *J Biol Chem.* 1996;271(32):19571-7.

Hodges NJ, Chipman JK. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine DNA glycosylase 1 (hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2002;23(1):55-60.

Hu D, Hughes MA, Cherry GW. Topical tamoxifen--a potential therapeutic regime in treating excessive dermal scarring? *Br J Plast Surg.* 1998;51(6):462-9.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Hunzelmann N, Anders S, Sollberg S, Schonherr E, Krieg T. Co-ordinate induction of collagen type I and biglycan expression in keloids. *Br J Dermatol.* 1996;135(3):394-9.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-652.

Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4489-92.

Iozzo RV, Pillarisetti J, Sharma B, Murdoch AD, Danielson KG, Uitto J, et al. Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem.* 1997;272(8):5219-28.

Isnard N, Fodil I, Robert L, Renard G. Modulation of cell-phenotype during in vitro aging. Glycosaminoglycan biosynthesis by skin fibroblasts and corneal keratocytes. *Exp Gerontol.* 2002;37(12):1379-87.

Izaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, et al. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med.* 1996;2(4):418-23.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Jimbow K, Kobayashi H, Ishii M, Oyanagi A, Ooshima A. Scar and keloid-like in progeria. An electron-microscopy and immunohistochemical study. *Arch Dermatol.* 1988;124(8):1261-6.

Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol.* 1998;25(2):296-301.

Kähäri VM, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI) and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1991;266(16):10608-15.

Kainulainen V, Wang H, Schick C, Bernfield M. Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11563-9.

Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S, Romisch J, Wiedermann CJ. Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 1):227-36.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Karvinen S, Kosma VM, Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumors. *Br J Dermatol.* 2003;148(1):86-94.

Kato M, Wang H, Kainulainen V, Fitzgerald M, Ledbetter S, Ornitz DM, et al. Physiological degradation converts the soluble syndecan-1 ectodomain from an inhibitor to a potent activator of FGF-2. *Nat Med.* 1998;4(6):691-7.

Kazeem AA. The immunological aspects of keloid tumor formation. *J Surg Oncol.* 1988;38(1):16-8.

Ketchum LD, Cohen IK, Masters FW. Hypertrophic scars and keloids. A collective review. *Plast Reconstr Surg.* 1974;53(2):140-54.

Kikuchi K, Kadono T, Takehara K. Effects of various growth factors and histamine on cultured keloid fibroblasts. *Dermatology.* 1995;190(1):4-8.

Kischer CW, Brody GS. Structure of collagen nodule from hypertrophic scars and keloids. *Scan Electron Microsc.* 1981;(Pt 3):371-6.

Kischer CW, Shetlar MR, Shetlar CL, Chvapil M. Immunoglobulins in hypertrophic scars and keloids. *Plast Reconstr Surg.* 1983;71(6):821-25.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner SG, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 1992;258(5089):1798-801.

Kooning AJ. The aetiologu of keloids: a review of the literature and a new hypothesis. *S Afr Med J*. 1964;38:913-6.

Kresse H, Hausser H, Schonherr E, Bittner K. Biosynthesis and interactions of small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycans. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994;32(4):259-64.

Krumdieck R, Hook M, Rosenberg LC, Volanakis JE. The proteoglycan decorin binds C1q and inhibits the activity of the C1 complex. *J Immunol*. 1992;149(11):3695-701.

Krusius T, Gehlsen KR, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycan core protein contains lectin-like and growth factor-like sequences. *J Biol Chem*. 1987;262(27):13120-5.

Krusius T, Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986;83(20):7683-7.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Kunzfeld M. Keloids in vaccination and revaccination. *Z Haut Geschlechtskr.* 1952;12(12):501-3.

Laurent TC, Fraser JR. The properties and turnover of hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 1986;124:9-29.

Laurentaci G, Dioguardi D. HLA antigens in keloids and hypertrophic scars. *Arch Dermatol.* 1977;113(12):1726-31.

Lee TY, Chin GS, Kim WJ, Chau D, Gittes GK, Longaker MT. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann Plast Surg.* 1999;43(2):179-84.

Le Poole IC, Boyce ST. Keratinocytes suppress transforming growth factor-beta1 expression by fibroblasts in cultured skin substitutes. *Br J Dermatol.* 1999;140(3):409-16.

Ma H, Xu R, Cheng H, Kuo HS, During M, Fang RH. Gene transfer into human keloid tissue with adeno-associated virus vector. *J Trauma.* 2003;54(3):569-73.

Mandani B. The Helsinki Declaration, 2000, and ethics of human research in developing countries. *Indian J Med Ethics.* 2004;1(3):94-5.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Marneros AG, Norris JE, Olsen BR, Reichenberger E. Clinical genetics of familial keloids. *Arch Dermatol*. 2001;137(11):1429-34.

Marneros AG, Norris JE, Watanabe S, Reichenberger E, Olsen BR. Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11. *J Invest Dermatol*. 2004;122(5):1126-32.

Matsuoka LY, Uitto J, Wortsman J, Abergel RP, Dietrich J. Ultrastructural characteristics of keloids fibroblasts. *Am J Dermatopathol*. 1988;10(6):505-8.

McCauley RL, Chopra V, Li YY, Herndon DN, Robson MC. Altered cytokine production in black patients with keloids. *J Clin Immunol*. 1992;12(4):300-8.

McCormack AG, Nowak KC, Koch RJ. The effect of copper tripeptide and tretinoin on growth factor production in a serum-free fibroblast model. *Arch Facial Plast Surg*. 2001;3(1):28-32.

McGrath JA, Eady RA. Heparan sulphate proteoglycan and wound healing in skin. *J Pathol*. 1997;183(3):251-2.

Mélega JM, Zanini SA, Psillakis JM. Cirurgia Plástica Reparadora e Estética. MEDSI – Ed. médica e científica: Rio de Janeiro, RJ. 1992;1078p.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Meyer LJ, Russell SB, Russell JD, Trupin JS, Egbert BM, Shuster S, et al. Reduced hyaluronan in keloid tissue and cultured keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2000;114(5):953-9.

Mikulec AA, Hanasono MM, Lum J, Kadleck JM, Kita M, Koch RJ. Effect of tamoxifen on transforming growth factor beta1 production by keloid and fetal fibroblasts. *Arch Facial Plast Surg.* 2001;3(2):111-4.

NCBI-National Center for Biotechnology Information, NLM-National Library of Medicine, NIH-National Institute of Health: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Niessen FB, Spauwen PH, Schalkwijk J, Kon M. On the nature of hypertrophic scars and keloids: a review. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(5):1435-58.

Nimni ME. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Semin Arthritis Rheum.* 1983;13(1):1-86.

Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, et al. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2000;8(5):371-82.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Olsen BR. Life without perlecan has its problems. *J Cell Biol.* 1999;147(5):909-12.

Oluwasanmi JO. Keloids in the african. *Clin Plast Surg.* 1974;1(1):179-95.

Oluwasanmi JO, Lucas DO, Chvapil M. Effect of a concurrent immune response on the collagen synthesis around implanted Ivalon sponges in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1976;58(5):601-7.

Omo-Dare P. Genetic studies on keloid. *J Natl Med Assoc.* 1975;67(6):428-32.

Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang S, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292(3):988-94.

O'Toole GA, Milward TM. Fraternal keloid. *Br J Plast Surg.* 1999;52(5):408-10.

Peacock EE, Madden JW, Trier WC. Biologic basis for the treatment of keloids and hypertrophic scars. *South Med J.* 1970;63(7):755-60.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Penc SF, Pomahac B, Winkler T, Dorschner RA, Eriksson E, Herdon M, et al. Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28116-21.

Placik OJ, Lewis VL. Immunologic associations of keloids. *Surg Gynecol Obstet*. 1992;175(2):185-93.

Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structures and functions. *Biochem J*. 1986;236(1):1-14.

Qiao D, Meyer K, Mundhenke C, Drew AS, Friedl A. Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signalling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278(18):16045-53.

Ragoowansi R, Cornes PG, Moss AL, Glees JP. Treatment of keloids by surgical excision and immediate postoperative single-fraction radiotherapy. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(6):1853-9.

Ramakrishnan KM, Thomas KP, Sundararajan CR. Study of 1,000 patients with keloid in south India. *Plast Reconstr Surg*. 1974;53(3):276-80.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*. 1991;252(5013):1705-8.

Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Fischer JW, Clowes AW. Syndecan-4 is required for trombin-induced migration and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2005;280(17):17507-11.

Rockwell WB, Cohen IK, Ehrlich HP. Keloids and Hypertrophic scars: a comprehensive review. *Plast Reconstr Surg*. 1989;84(5):827-37.

Ruoslahti E, Yamaguchi, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991;64(5):867-9.

Saksela O, Rifkin DB. Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity. *J Cell Biol*. 1990;110(3):767-75.

Samuels P, Tan AK. Fetal scarless wound healing. *J Otolaryngol*. 1999;28(5):296-302.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGGTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Schmidt G, Robenek H, Harrach B, Glossl J, Nolte V, Hormann H, et al. Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin. *J Cell Biol.* 1987;104(6):1683-91.

Schwartz LB, Riedel C, Caulfield JP, Wasserman SI, Austen KF. Cell associations of complex chymase, heparin proteoglycan and protein after degranulation by rat mast cells. *J Immunol.* 1981;126(6):2071-8.

Scott JE, Orford CR. Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J.* 1981;197(1):213-6.

Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE. et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell.* 1997;1(1):25-34.

Simeon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):962-8.

Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341(10):738-46.

ATCGGCTTAGGCTATAGTGC GTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Singer II, Scott S, Kawka DW, Hassell JR. Extracellular matrix fibers containing fibronectin and basement membrane heparan sulfate proteoglycan coalign with focal contacts and microfilament bundles in stationary fibroblasts. *Exp Cell Res.* 1987;173(2):558-71.

Stabellini G, Calastrini C, Mariani G, Gioia M, Caramelli E, Gagliano M, et al. Extracellular glycosaminoglycan changes in healthy and overgrown gingiva fibroblasts after ciclosporin A and cytokine treatments. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(6):346-53.

Stephens P, Cook H, Hilton J, Jones CJ, Haughton MF, Wyllie FS, et al. An analysis of replicative senescence in dermal fibroblasts derived from chronic leg wounds predicts that telomerase therapy would fail to reverse their disease-specific cellular and proteolytic phenotype. *Exp Cell Res.* 2003;283(1):22-35.

Stepp MA, Gibson HE, Gala PH, Iglesia DD, Pajooohesh-Ganji A, Pal-Ghosh S, et al. Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse. *J Cell Sci.* 2002;115(Pt 23):4517-31.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):593-609.

Strieter RM, Standiford TJ, Huffnagle GB, Colletti LM, Lukacs NW, Kunkel SL. "The good, the bad, and the ugly." The role of chemokines in models of human disease. *J Immunol.* 1996;156(10):3583-6.

Subramanian SV, Fitzgerald ML, Bernfield M. Regulated shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains by thrombin and growth factor receptor activation. *J Biol Chem.* 1997;272(23):14713-20.

Svensson L, Heinegard D, Oldberg A. Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20712-6.

Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem.* 1994;269(51):32634-8.

Tan EM, Hoffren J, Rouda S, Greenbaum S, Fox JW, Moore JH, et al. Decorin, versican, and biglycan gene expression by keloid and normal

ATCGGCTTAGGCTATAGTGCCTATTTCGATTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

dermal fibroblasts: differential regulation by basic fibroblast growth factor. *Exp Cell Res.* 1993;209(2):200-7.

Tiedemann K, Malmstrom A, Westergren-Thorsson G. Cytokine regulation of proteoglycan production in fibroblasts: separated and synergistic effects. *Matrix Biol.* 1997;15(7):469-78.

UriosteSS, Arndt KA, Dover JS. Keloids and hypertrophic scars: review and treatment strategies. *Semin Cutan Med Surg.* 1999;18(2):159-71.

Vogel KG, Clark PE. Small proteoglycan synthesis by skin fibroblasts cultured from elderly donors and patients with defined defects in types I and III collagen metabolism. *Eur J Cell Biol.* 1989;49(2):236-43.

Vogel KG, Paulsson M, Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 1984;223(3):587-97.

Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson, T. The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen. *Mol Cell.* 1997;1(1):13-23.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGGCTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Wang CM, Hiko H, Nakazawa N. Investigation of p53 polymorphism for genetic predisposition of keloid and hypertrophic scar. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2005;21(1):32-5.

Whinna HC, Choi HU, Rosenberg LC, Church FC. Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin. *J Biol Chem*. 1993;268(6):3920-4.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*. 1996;271(17):10079-86.

Whitworth MK, Backen AC, Clamp AR, Wilson G, McVey R, Friedl A, et al. Regulation of fibroblast growth factor-2 activity by human ovarian cancer tumor endothelium. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4282-8.

Wilgus TA. Regenerative healing in fetal skin: a review of the literature. *Ostomy Wound Manage*. 2007;53(6):16-31.

Winnewmoller M, Schon P, Vischer P, Kresse H. Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol*. 1992;59(1):47-55.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTCGATTCCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycan in human periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2001a;186(3):448-56.

Worapamorn W, Li H, Young WG, Bartold PM. Differential expression and distribution of syndecan-1 and -2 in the developing periodontum of the rat. *Connect Tissue Res.* 2001b;42(1):39-48.

Xue H, McCauley RL, Zhang W. Elevated interleukin-6 expression in keloid fibroblasts. *J Surg Res.* 2000;89(1):74-7.

Yamaguchi M, Naruishi K, Yamada-Naruishi H, Omori K, Nishimura F, Takashiba S. Long-term cyclosporin A exposure suppresses cathepsin-B and -L activity in gingival fibroblasts. *J Periodontol Res.* 2004;39(5):320-6.

Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 1992;267(14):9451-4.

Yang BL, Zhang Y, Cao L, Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem.* 1999;72(2):210-20.

ATCGGCTTAGGCTATAGTCGCTATTTTCGATTTCGGCATTATAGCTCGATCGCTAGCTCTAGCTGCATTACGGCATAGCGGCTAGCGGCATAGCGTAGGCGTAGCGCGCTAGAGTCGATCG

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell*. 1991;64(4):841-8.

Yeo TK, Brown L, Dvorak HF. Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors. *Am J Pathol*. 1991;138(6):1437-50.

Zimmermann DR, Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J*. 1989;8(10):2975-81.

Zuffardi O, Fraccaro M. Gene mapping and serendipity. The locus for torticollis, keloids, cryptorchidism and renal dysplasia (31430, Mckusick) is at Xq28, distal to the G6PD locus. *Hum Genet*. 1982;62(3):280-1.