

**FABIO KAMAMOTO**

**Contração de feridas:  
revisão bibliográfica e estudo da  
contração gerada por fibroblastos  
normais e de quelóides**

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: Dra. Marisa Roma Herson**

**São Paulo**

**2007**



# Errata

# **Dedicatória**

Para as minhas “meninas”: Jaqueline, Sofia e Paloma

# **Agradecimentos**

Agradeço imensamente ao Professor Marcus Castro Ferreira pela confiança sempre em mim depositada.

As minhas “madrinhas” na ciência, Dra Marisa Roma Herson e Dra. Mônica Beatriz Mathor a quem devo toda minha formação acadêmica e com quem aprendi a valorizar o rigor científico.

Ao meu “sócio” no Laboratório de Microcirurgia, André Paggiaro que sempre acreditou no valor das pesquisas.

Ao apoio das senhoras Viviane Carvalho, Edna Maria Rodrigues dos Santos, Maria Aparecida de Oliveira, Silvana Altram e Roqueline Alves Lago.

Aos meus pais, a quem devo tudo que sou.

# Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

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, Valeria Vilhena. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação:2004

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

# Índice:

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

Introdução

1. Classificação da Reparação Tecidual .....	23
2. O Processo de Cicatrização .....	27
2.1. Fase de Hemostasia:	
2.1.1. O papel das Plaquetas.....	29
2.1.2. A cascata de coagulação.....	31
2.2. Fase Inflamatória:	
2.2.1 Neutrofilos.....	35

2.2.2	Macrofagos.....	36
2.2.3	Linfocitos.....	38
2.3.	Fase Proliferativa:	
2.3.1	Proliferação das Células Epiteliais.....	40
2.3.2	Proliferação Vascular.....	43
2.3.3	Fibroplasia.....	44
2.4.	Fase de Remodelação.....	47
	Objetivo.....	49
	Revisão da Literatura.....	50
1.	Contração das Feridas.....	50
2.	Contração mediada por miofibroblastos .....	53
3.	Contração gerada pela remodelação do colágeno .....	57
4.	Teoria de Murray-Oster.....	59
5.	Modulação pelo TGF $\beta$ .....	59
	Material e Método.....	62
1.	Culturas Primárias – Fibroblastos Humanos.....	63
2.	Gel de Colágeno e Fibroblastos.....	68
2.1.	Preparo da solução de colágeno.....	68
2.2.	Determinação da concentração de colágeno da solução .....	70



2.3. Protocolo para polimerização da solução de colágeno e confecção do gel.....	72
2.4. Influência do numero de fibroblastos sobre a contração do gel...	73
2.5. Inclusão de fibroblastos na matriz de colágeno e polimerização do gel.....	73
2.6. Avaliação macroscópica da contração dos géis povoados por fibroblastos.....	75
3. Estudo da Contração com fibroblastos normais e de quelóides...	76
4. Efeito do TGF $\beta$ sobre a contração do gel povoado por fibroblastos de pele normal .....	76
5. Método de Análise Estatística.....	77
Resultados.....	78
1. Estabelecimento do Modelo.....	78
2. Estudo da Contração com fibroblastos normais e de quelóides...	82
3. Estudo da Contração com fibroblastos normais modificado por TGF $\beta$ .....	88
4. Comparação entre a contração gerada por fibroblastos normais sob o efeito de TGF $\beta$ e a gerada por fibroblastos de quelóides.....	92

Discussão.....	93
Conclusões .....	103
Referencias Bibliográficas.....	104

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via Intrínseca e Extrínseca convergindo para Via Comum.....	26
Figura 2 – Banho de Etanol a 70% e Solução Salina.....	51
Figura 3 – Cultura de Fibroblastos por Explante.....	52
Figura 4. Garrafa de Cultura de 25 cm <sup>2</sup> na estufa de CO <sup>2</sup> .....	52
Figura 5. Amplificação de Culturas Celulares.....	54
Figura 6. Dissecção da cauda do Rato.....	55
Figura 7. Exposição dos tendões a solução de ácido acético 1:1000.....	56
Figura 8. Sobrenadante após dissolução da fração ácido-solúvel (colágeno tipo I).....	56
Figura 9. Géis com fibroblastos.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mecanismo de resolução da ferida em função da extensão da ferida.....	20
Tabela 2: estatística descritiva para a porcentagem de contração do grupo normal.....	67
Tabela 3: estatística descritiva para a porcentagem de contração do grupo Quelóide.....	68
Tabela 4. Dados de porcentagem de contração do grupo controle X TGF $\beta$ disponíveis para análise.....	70

## LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Porcentagem de contração média por instante de tempo de observação do grupo normal X quelóide.....69

Gráfico 2. Perfis médios da variável porcentagem de contração por instante de tempo de observação nos grupos normal X  $TGF\beta$ .....72

Gráfico 3: Comparação entre a contração gerada por fibroblastos de pele normal modificado por  $TGF\beta$  X fibroblastos de quelóides.....73

## LISTA DE ABREVIATURAS:

et cols.	e colaboradores
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de Sódio
HOP	Hidroxi prolina
HCl	Ácido Clorídrico
LiOH	Hidróxido de Sódio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Solução Salina Fosfato Tamponada
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> – Fator de Crescimento de Fibroblastos
TGF $\alpha$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> – Fator Transformador de Crescimento Alfa

TGF $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i> – Fator Transformador de Crescimento Beta
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle's Medium</i> – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
SFB	Soro Fetal Bovino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias para granulocitos e macrófagos
VEGF	Fator de Crescimento de Endotélio Vascular
ADP	Adenosina Di-Fosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
DMSO	dimetil-sulfóxido
RPM	rotações por minuto
V.	volume

P. página

N. número

ED. edição

FMLP metil, leucil fenilalanina

SB431542 Substancia SB431542 (inibidor seletivo de TGF $\beta$ )

SFB Soro Fetal Bovino

HCl Acido Clorídrico

LiOH Hidróxido de Litio



## LISTA DE SÍMBOLOS

M	molar
mg	miligramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
l	litro
ml	mililitro
μl	microlitro
%	por ciento
mm	milímetro

## **RESUMO:**

**Kamamoto F. Contração de Feridas: revisão bibliográfica e estudo da contração gerada por fibroblastos normais e de quelóides (tese). São Paulo:Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo;2006 124p.**

A organização e a contração de fibras de colágeno no leito de uma ferida é componente importante da cicatrização, determinando em última instância a qualidade final da cicatriz. Neste estudo realizamos uma revisão bibliográfica sobre a contração de feridas e a implantação e utilização de modelo de biotecnologia constituído de géis de colágeno povoados por fibroblastos humanos, como instrumento para a melhor compreensão desses fenômenos ainda pouco elucidados.

Utilizando fibroblastos de diferentes procedências de pele normal ou quelóides, observou-se maior contração dos géis povoados por fibroblastos oriundos de quelóides

O modelo foi avaliado como eficiente para o teste de moduladores da fase de remodelação da cicatriz tais como o Fator de Crescimento Transformador Beta ( $TGF\beta$ ).

Finalmente, realizou-se uma comparação entre a curva de contração gerada por fibroblastos normais sob o efeito do  $TGF\beta$  e a contração gerada por fibroblastos de quelóides, verificando-se que as mesmas apresentam comportamento igual do ponto de estatístico.

O modelo demonstrou ser adequado para a melhor compreensão dos mecanismos responsáveis pela contração de feridas e para a avaliação de novas drogas capazes de modular este fenômeno.

## **DESCRITORES:**

1. fibroblastos
2. colágeno
3. cicatrização de feridas
4. quelóide
5. Fator Transformador do Crescimento Beta

## **SUMMARY**

**Kamamoto F. Wound Contraction: Literature review and experimental model for the study of the contraction generated by normal and keloid fibroblasts (thesis). ). São Paulo:Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo;2006 123p.**

An important component of tissue healing and wound contraction is the re-arrangement of ground collagen fibers, which can ultimately influence the final quality of scars. In this study we made a review about the wound contraction and used an experimental model with contracting collagen gels seeded with human fibroblasts in order to better understand these phenomena.

We compared the contraction of the collagen gels using fibroblasts from normal skin and from keloids.

We also used the model to test new drugs with the potential to modulate the wound contraction, through the test with TGF $\beta$ .

The analysis of the changing macroscopic gel areas comparing the contraction generated by the normal fibroblasts after the treatment with TGF $\beta$  with the contraction in the gels with keloid's fibroblasts showed that they have the same behavior.

The experimental model proved to be an useful tool to better understand the wound contraction and to test new drugs to modulate this phenomenon.

## **DESCRIPTORS:**

1. fibroblast
2. collagen
3. wound healing
4. keloid
5. Transforming Growth Factor  $\beta$

## INTRODUÇÃO

Os seres vivos são constantemente expostos a agressões, que levam ao surgimento de feridas. As feridas podem ser definidas como “quebras da solução de continuidade das estruturas do corpo” (1) ou a “ruptura das estruturas e funções normais dos tecidos” (2) e podem ser causadas por traumatismo que tenham origem interna ou externa ao tecido afetado. Elas podem variar desde uma lesão aguda e controlada como a incisão realizada por um bisturi de um cirurgião, até um trauma generalizado como em uma queimadura.

O surgimento de uma ferida em um organismo expõe o mesmo à perdas sangüíneas, à infecções e pode, quando extensa, leva-lo à morte.

A agressão ao tecido portanto, desencadeia uma cascata de reações celulares e bioquímicas que tentam impedir os danos ao organismo. Esse processo de reparação tecidual tem grande importância para a sobrevivência de todos os seres vivos, e é conhecido como processo de cicatrização.

Mesmo as espécies mais simples como os peixes e anfíbios apresentam mecanismos de cicatrização. Devido a importância da integridade da pele para a sobrevivência dessas espécies, elas possuem uma rápida proliferação das células epiteliais, o que permite seu fechamento em um curto espaço de tempo (3). Diferentemente dos seres humanos, nos anfíbios o tempo de resposta para essa proliferação depende da temperatura do ambiente, ao passo que nos peixes essa

reação independe de sua temperatura (4). Como resultado desses processos, os ferimentos em anfíbios e peixes curam-se sem a formação de crostas.

A espécie humana deve sua existência aos mecanismos de reparação tecidual. Graças a essa capacidade o homem pôde resolver seus ferimentos e perpetuar a espécie, mesmo antes do surgimento de antibióticos, curativos ou cirurgias. Estudos recentes permitem uma compreensão cada vez melhor da fisiologia da cicatrização, e têm possibilitado o avanço tecnológico no tratamento das feridas.

A cicatrização de uma ferida é dividida em etapas, sendo a mais longa e mais importante a etapa final: a de remodelação. Durante a fase de remodelação ocorrem dois fenômenos principais: a redistribuição das fibras de colágeno e a contração da ferida. Esta fase determinará o aspecto final da cicatriz e sua melhor compreensão pode permitir tratamentos mais sofisticados para as feridas.

Modalidades de tratamento mais sofisticadas serão cada vez mais necessárias, uma vez que a expectativa de vida das pessoas é cada vez maior. O aumento do tempo médio de vida da população eleva concomitantemente as doenças que acompanham o envelhecimento, e conseqüentemente a incidência e a complexidade das feridas. O diabetes melitus, a hipertensão arterial e as cardiopatias, por exemplo, retardam a resolução de feridas. Nesses pacientes as perdas do revestimento cutâneo podem evoluir como lesões crônicas, de solução

difícil, e freqüentemente exigirão a adoção de soluções mais sofisticadas que os métodos convencionais.

Neste contexto, estudos experimentais que objetivam compreender melhor os processos de cicatrização e modulá-los com o intuito de torná-los mais eficientes, podem contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas, e portanto tem grande interesse para a Medicina.

## 1. CLASSIFICAÇÃO DA REPARAÇÃO TECIDUAL

A palavra cicatrização muitas vezes é utilizada como sinônimo para a cura de uma ferida. Entretanto cicatrização é o ato ou efeito de fazer com que se forme cicatriz, a marca deixada na pele ou em outro órgão, pelo tecido fibroso que recompõe as partes lesadas. Ou seja, cicatrização é o processo biológico de reparação tecidual que resulta na formação de tecido específico, a cicatriz, com propriedades funcionais diferentes do tecido lesado. Em lesão tipo escoriação, entretanto, o comprometimento pode ser exclusivamente da epiderme. Neste caso, a reparação é promovida pela reposição das células epiteliais perdidas. Como tal processo não envolve a formação de tecido cicatricial, não seria correto dizer que, neste caso, a ferida “cicatrizou” (5).

Da mesma forma, algumas vezes vemos a palavra cicatrização empregada inadequadamente como tradução do termo inglês “*wound healing*”. Acreditamos que “reparação tecidual” representaria a tradução mais precisa, uma vez que este fenômeno, como vimos, pode ocorrer através de outro mecanismo que não envolva a formação de cicatriz. Reparação é o ato ou efeito de reparar-se, ou realizar-se reparo, reforma, conserto. Portanto, reparação tecidual diz respeito aos mecanismos que possibilitam o “conserto” da lesão, ou ainda, o “fechamento” da ferida. Tais mecanismos (que serão explicados mais adiante) podem ser naturais, ou melhor, ocorrer de maneira natural, ou podem ser promovidos através da intervenção do terapeuta.

Assim sendo, “resolução”, definido como um termo médico empregado para descrever o “desaparecimento de estado mórbido”, seria a palavra que melhor define o propósito da atuação do profissional envolvido com os cuidados de feridas. Para alcançar a “resolução”, o terapeuta deve promover os mecanismos de reparação tecidual, preocupando-se com, não somente obter o fechamento da ferida, mas também controlar os efeitos patológicos da formação de tecido cicatricial (tais como contraturas, bridas e sinéquias), de modo mais confortável, rápido e eficaz para o paciente.

Vários profissionais de saúde atuam na promoção da reparação tecidual, A partir da intervenção desses terapeutas sobre as feridas, pode-se classificar os processos de reparação tecidual em (6):

- a. **Por Primeira Intenção:** Quando as bordas da ferida são aproximadas logo após o surgimento da ferida, como por exemplo, através de suturas. Neste caso, a produção de colágeno pelos fibroblastos gera uma cicatriz resistente, e a sua posterior remodelação através de metaloproteinases geralmente culmina em uma cicatriz de linhas finas. A epitelização cobre a ferida, gerando uma barreira contra a atmosfera. Portanto uma ferida cicatrizada por primeira intenção se vale muito mais dos processos de deposição de tecido conjuntivo e epitelização do que de contração.
- b. **Por Segunda Intenção:** Quando a ferida de espessura total da pele é deixada fechar-se sem coarctação das bordas. A cicatrização ocorre



principalmente por contração e deposição de colágeno ao invés de reepitelização.

- c. **Por Terceira Intenção ( ou Primeira Intenção Retardada):** Quando uma lesão contaminada, ou cuja extensão ainda está mal delimitada, é deixada aberta e, após um período de tratamento , é suturada. No período em que a pele e o subcutâneo não estão coaptados, ocorre o desbridamento da lesão através de mecanismos de fagocitose ou intervenções cirúrgicas. Após um período de 3 a 4 dias, inicia-se a neoangiogênese, condição esta que permite suturar o ferimento. Neste caso não ocorre alteração na metabolização do colágeno e a cicatrização ocorre de forma semelhante à de primeira intenção.
- d. **Cura da ferida de espessura parcial:** são ferimentos onde há lesão apenas da epiderme e uma parte superficial da derme. Exemplos deste tipo de ferimento são as áreas doadoras de enxerto de pele de espessura parcial ou as áreas que sofreram abrasão superficial. Neste tipo de ferimento a cura da ferida ocorre principalmente por reepitelização, sendo que as principais fontes de queratinócitos são as células tronco adultas localizadas na borda da ferida, ou dos pêlos e glândulas sebáceas.

Em todas essas situações os mesmos mecanismos de cicatrização (deposição de matriz extracelular, reepitelização, contração da ferida) estão envolvidos, porém com maior ou menor intensidade dependendo da profundidade da lesão e do tipo de tratamento adotado. (vide tabela1). Esses mecanismos serão melhor detalhados durante a revisão de literatura

TABELA 1:

<i>Maior extensão da ferida</i>	<i>Profundidade da Lesão ou Tempo de Reepitelização</i>	<i>Epitelização</i>	<i>Deposição de Tecido Conjuntivo</i>	<i>Contração da Ferida</i>	<i>Formação de Cicatriz</i>
Vertical	Independente	+++	+	+	+
Horizontal	Apenas Epiderme	+++	0	0	0
	Derme Superficial (c/ preservação de anexos) ou epitelização até 14 dias	+++	+	+	+
	Epitelização entre 14 a 21 dias	+++	++	++	++
	Epitelização em mais de 21 dias ou lesão de espessura total de pele	+++	+++	+++	+++

Observamos de acordo com a Tabela 1, que os mecanismos responsáveis pela formação de cicatriz (deposição de tecido conjuntivo, contração da ferida) são mais intensos quando a resolução da ferida é mais tardia e a ferida é mais profunda e extensa.

## **2. O processo de cicatrização:**

A cicatrização cutânea se caracteriza por uma série complexa de fenômenos celulares e bioquímicos, que são desencadeados a partir de uma lesão na pele. Esses processos são inter-relacionados e muitas vezes ocorrem em paralelo. Eles se mantêm durante meses, mesmo após a integridade da pele estar refeita.

Entretanto para fins descritivos, o processo de cicatrização será aqui dividido em fases: a fase de hemostasia, a inflamatória, a proliferativa e a de remodelação.

### **2.1.1. Fase de Hemostasia**

Quando ocorre um ferimento, seja ele causado por uma incisão planejada de um cirurgião, seja devido a um trauma, há rompimento de epiderme, derme e vasos sanguíneos, com exposição de colágeno da matriz extracelular.

O contato das proteínas plasmáticas com a matriz extracelular leva à ativação da cascata de coagulação, que em última instância provoca a polimerização da protrombina em trombina, e a formação de rede de fibrina (coágulo) que auxilia a agregação plaquetária(7).

A associação entre plaquetas e fibrina é clinicamente chamada de trombo. A formação do trombo somada à contração do vaso lesado promove a interrupção do sangramento, ou seja, a hemostasia. O trombo também atua como uma barreira mecânica que impede contaminações e perdas de fluidos.

Simultaneamente a formação do trombo, ocorre a deposição de matriz extracelular provisória, com a deposição na ferida de fibrina, fibronectina e ácido hialurônico que facilitam a migração celular para a ferida (7).

Destacaremos portanto os principais efetores dessa reação: as plaquetas e as proteínas da cascata de coagulação.

### 2.1.1 O papel das plaquetas

As plaquetas, além de sua função hemostática, atuam também como moduladoras da reparação tecidual. Elas são as primeiras células a atingir a ferida liberando citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação celular e a produção de proteínas específicas.

Essas substâncias são liberadas quando as plaquetas são “ativadas”. Quando ocorre a lesão, o contato entre as plaquetas e as proteínas da matriz subendotelial exposta dos vasos sanguíneos, principalmente o colágeno, promove a liberação de produtos dos  $\alpha$ -grânulos que desencadeiam o processo de coagulação.

As plaquetas contém no seu citoplasma três tipos de organelas envolvidas na hemostasia e início da reação inflamatória (8):

- $\alpha$ -Grânulos, que contém glicoproteínas de adesão como o fibrinogênio, fator de Von Willebrand e também fatores de crescimento: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Transformador Alfa e Beta (TGF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ) e Fator Plaquetário 4.
- Os "corpos densos" são o principal estoque de serotonina e também contém adenina, cálcio e pirofosfatos.
- Lisossomos, que contém hidrosilases neutras e ácidas, elastase, colagenase, anti-tripsina e  $\alpha$ 2-macroglobulina.

A ativação de plaquetas é aumentada por alguns fatores da “cascata do complemento” (como veremos a seguir) e por lipopolissacárides bacterianos liberados na ferida ao ocorrer a sua contaminação. A presença de bactérias produz um aumento de 50 vezes na quantidade de serotonina liberada (8).

As plaquetas “ativadas” tornam-se aderentes e agregam entre si e com a parede dos vasos lesados para formar o trombo que finalmente os oclui. O trombo é portanto o resultado da agregação das plaquetas juntamente com a formação de uma rede de fibrina. A conversão de fibrinogênio em fibrina é estimulada tanto pelas plaquetas quanto pelos tecidos lesados; esses liberam tromboquinase, que convertem pro-trombina em trombina e que por sua vez converte o fibrinogênio (solúvel) em fibrina, que é insolúvel. A liberação de serotonina e adenina dos grânulos densos induzem ainda mais a agregação plaquetária as quais interagem novamente com a rede de fibrina e formam um trombo que é mais resistente e durável que o inicial. Ao desidratar-se esse trombo, forma-se uma escara seca que cobre a ferida.

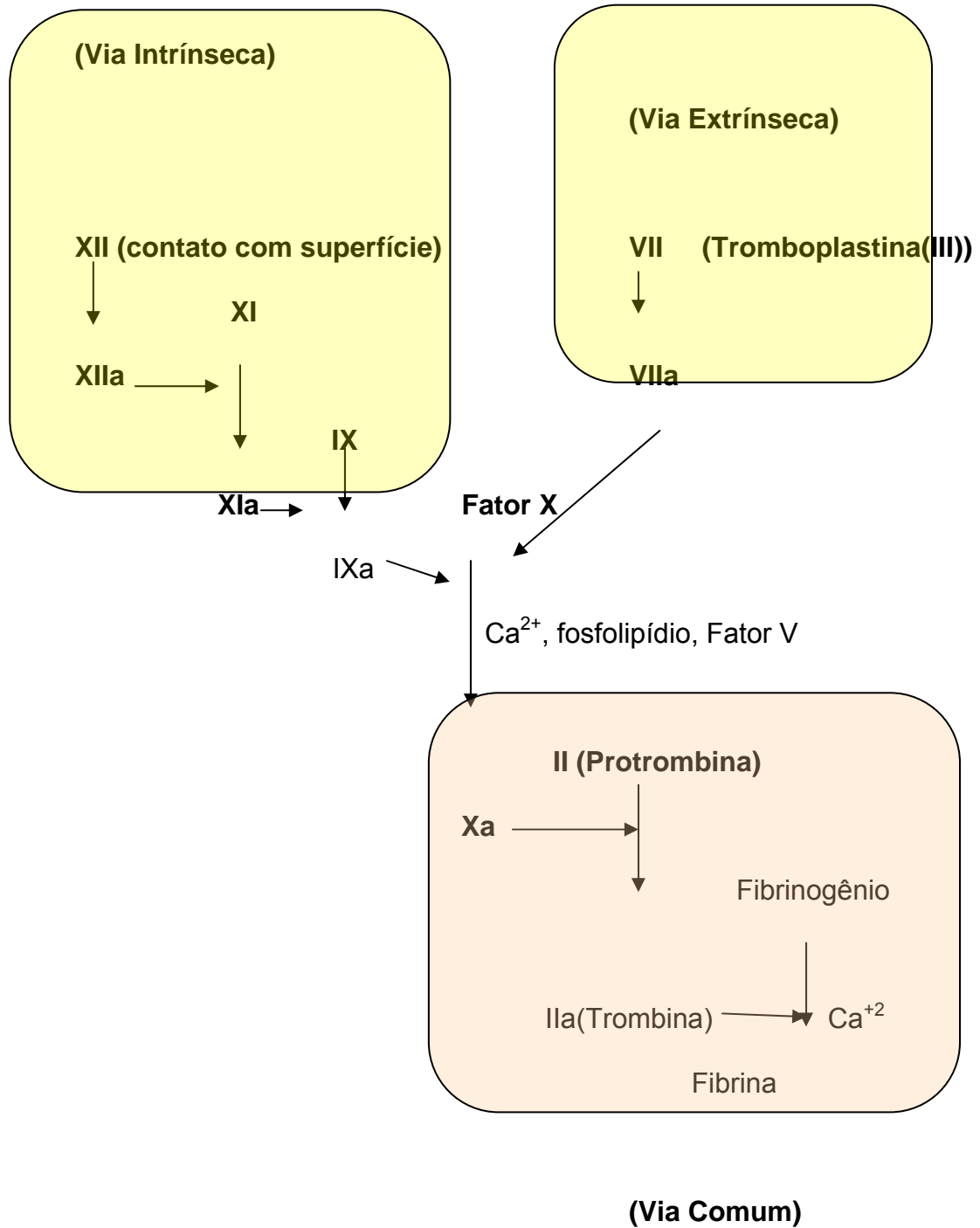
### **2.1.2. A Cascata de Coagulação**

A Cascata de Coagulação consiste em uma série de reações envolvendo a conversão de enzimas precursoras inativas em enzimas proteolíticas ativas (9) que transformam uma proteína solúvel da circulação (o fibrinogênio) em uma proteína insolúvel (a fibrina) e dessa forma permite a interrupção do sangramento.

Didaticamente a cascata é dividida em duas vias: uma via intrínseca (em que os elementos necessários à coagulação já estão presentes no plasma) e uma outra extrínseca (em que há necessidade de um elemento externo ao sangue para que se ocorra - a Tromboplastina ou fator III)(Figura 1). Ambas convergem para uma via comum a partir do momento em que o fator X é ativado.

Essa via comum é o degrau final do sistema de coagulação sanguíneo. Nesse momento, a Pro-trombina (Fator II) é convertida em Trombina (Fator IIa) na presença do Fator V, cálcio e fosfolípide. A conversão de pro-trombina em trombina com a presença de fosfolípidos é acelerada com o contato nas superfícies plaquetárias. A Trombina, que é um potente agonista plaquetário induz a agregação plaquetária em associação com ADP e Tromboxano A<sub>2</sub>. Em seguida, a Trombina gerada converte o Fibrinogênio em Fibrina, estabilizando ainda mais o tampão plaquetário.

Figura 1. Cascata de Coagulação:





O sistema de coagulação é composto por 20 proteínas que interagem entre si, e que podem ser ativadas pela adesão entre os anticorpos IgM e IgG com antígenos da superfície de microorganismos ou lipopolissacarídeos de bactérias. Grandes quantidades de IgM e IgG, levam a ativação da coagulação pela via intrínseca.

A liberação de endotoxinas pelas bactérias e pequenas quantidades de IgG estimulam a ativação da coagulação pela via extrínseca. O IgM e o IgG são os responsáveis pelo início da segunda fase de cicatrização: a fase inflamatória.

## 2.2. A fase inflamatória

Uma vez obtida a hemostasia, os fatores de crescimento PDGF,  $TGF\alpha$  e  $TGF\beta$  liberados nesta etapa propiciam vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e extravasamento de conteúdo plasmático(9). Estes são clinicamente traduzidos por eritema e edema. Além disso, esses mediadores são quimiotáticos para células inflamatórias, desencadeando portanto a fase de inflamação. Além dos mediadores citados outros destacam-se, como: as imunoglobulinas IgM e IgG, a fração C5e C9 do complemento, o leucotrieno B4 e o peptídeo N-formil, metil, leucil fenilalanina (FMLP), uma proteína bacteriana que também é quimiotática e estimula a aderência de neutrófilos a parede endotelial.

O IgM pode lisar bactérias gram-negativas e neutralizar vírus. Os fatores C5 a C9 combinam-se entre si para formar um grande complexo protéico que leva à lise da parede bacteriana. Os fatores complementares também opsonizam microorganismos, fazendo com que se tornem reconhecíveis a células fagocitárias. O fator C5a também é quimiotático, atraindo os polimorfonucleares e os neutrófilos para a lesão. Os fatores do complemento C3b se ligam a receptores específicos de células fagocitárias e de parede celular de micróbios, aumentando a capacidade dos fagócitos de se ingerir e destruir esses microorganismos.

A secreção das proteínas gera uma quimiotaxia das células inflamatórias para o sítio da lesão. Essa migração celular para a ferida é feita algumas vezes de forma concomitante pelos diferentes tipos celulares, mas em geral ela respeita a seguinte seqüência: primeiro os Neutrófilos, seguidos pelos macrófagos juntamente com os linfócitos.

Como resultado da quimiotaxia gerada pela deposição dessas proteínas e da destruição dos microorganismos, forma-se sobre a superfície do ferimento o exsudato inflamatório. Tal exsudato é parte importante do sistema de defesa contra infecções e consiste em uma secreção que inclui anticorpos, fragmentos do complemento, neutrófilos e macrófagos. Macroscopicamente pode ser visto como uma mancha amarelada que fica nos curativos e que será produzida até a epitelização se completar.

### **2.2.1. Neutrófilos**

Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a migrar para a ferida, atraídos pelos fatores quimiotáticos liberados no local(10). O pico de infiltração de neutrófilos ocorre nas primeiras 24 horas e, uma vez presentes no leito da ferida, tais células desempenham as seguintes funções: amplificam a resposta inflamatória; auxiliam no controle da infecção, através da fagocitose de bactérias e produção de substâncias bactericidas; auxiliam no desbridamento dos tecidos desvitalizados, através da produção de elastases e colagenases.

Aproximadamente após 72 horas, quando todas as partículas contaminantes já foram eliminadas, cessa a migração de neutrófilos, e os macrófagos passam a se acumular no local do ferimento, tornando-se o tipo dominante de célula. Além disso, o neutrófilo atua na permeabilidade vascular através da liberação de bradicinina, que causa uma abertura reversível das junções entre as células endoteliais e permite a passagem de Neutrófilos e macrófagos (9)

### **2.2.2 Macrófagos**

Os Macrófagos parecem ser o tipo celular individualmente mais importante na reparação tecidual: respondem especificamente à substâncias quimiotáticas tais como: fragmentos de colágeno, elastina e fibronectina, trombina, fator transformador beta, etc., e são responsáveis pela produção de fatores de crescimento e mediação da transição da fase inflamatória para a fase de neoformação tecidual.

Os Monócitos diferenciam-se em macrófagos no local da lesão. Um dos sinais que promovem essa diferenciação é a ligação de fibronectina à superfície dos receptores dos monócitos, o que induz a ativação dos receptores para fagocitose. Os macrófagos desenvolvem receptores complementares que os permitem desempenhar funções similares as dos neutrófilos. (10).

O macrófago libera fatores de crescimento como interleucina I, fator transformador alfa e beta, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outros, essenciais à iniciação e propagação da deposição de tecido conjuntivo neoformado, que deverá se seguir. Por exemplo, o fator transformador alfa e Fator de Crescimento para Fibroblastos Básico (bFGF) produzidos pelos macrófagos estimulam a migração de queratinócitos acelerando a reepitelização da ferida, estimulam a produção de matriz pelos fibroblastos e a neoangiogênese pelas células endoteliais.

O macrófago ativado é o principal efetor da degradação de tecido conjuntivo desvitalizado. O colágeno e outros fragmentos de glicosaminoglicanas são ingeridos e degradados pelas enzimas catepsinas e outros peptídeos. Além do seu papel no desbridamento, os macrófagos secretam fatores quimiotáticos que aumentam a reação inflamatória no local de lesão.

Os macrófagos produzem prostaglandinas, que provocam vasodilatação e afetam a permeabilidade da microcirculação. As prostaglandinas também aumentam a atividade da adenil ciclase nos linfócitos T e aceleram a mitose dessas células.

A queda da população de neutrófilos acompanhada do predomínio da presença de macrófagos no local do ferimento, o que geralmente ocorre após as primeiras 72 horas da lesão, marca o fim do fenômeno da inflamação. No

entanto, a presença de bactérias, de corpos estranhos e de tecido desvitalizado no ferimento podem levar a ativação da via alternativa do complemento continuamente, gerando mais C3a e C5a, perpetuando a fase inflamatória. Dessa forma, os macrófagos são os responsáveis pela transição da fase inicial da resposta inflamatória para as fases seguintes da reação de reparação tecidual.

### **2.2.3. Linfócitos**

A resposta inflamatória é auxiliada pelos linfócitos T *helper* que são ativados logo após a lesão. Eles então passam a identificar os antígenos de superfície dos corpos estranhos a partir da apresentação das células apresentadoras de antígenos, tais como as células de Langerhans da pele e alguns tipos de macrófagos.

Os linfócitos T migram para o local da ferida juntamente com os macrófagos, embora os linfócitos se encontrem em menor número. Tanto os macrófagos quanto os linfócitos desaparecem das lesões maduras através de mecanismos desconhecidos. Sabe-se porém que em cicatrizes anômalas os linfócitos e macrófagos permanecem por um período mais longo que o normal. Em cicatrizes hipertróficas o nível de linfócitos e macrófagos permanece alto durante 4 a 5 meses depois da lesão. Tem sido estudado se o controle dos linfócitos pode ser útil no

tratamento das cicatrizes anômalas. Por exemplo, em estudos *in vitro* com a droga minoxidil observou-se a inibição da contração de géis de colágeno e a diminuição da síntese de DNA, além da produção de fator inibidor da migração de leucócitos pelos linfócitos T.

## **2.3. A fase proliferativa**

Após a fase inflamatória. Segue-se uma intensa proliferação de células epiteliais, de células endoteliais (neoangiogênese) e de fibroblastos, o que marca a chamada fase proliferativa.

### **2.3.1. A proliferação das células epiteliais**

As células epiteliais são importantes tanto no final da fase inflamatória, quanto nas fases mais tardias da reparação tecidual. Nos ferimentos de espessura parcial (onde é acometida apenas a epiderme e parte da derme) as células epiteliais proliferam e migram a partir das bordas da ferida e dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, e começam a se proliferar. Nos ferimentos de espessura total (com lesão de epiderme e toda espessura da derme) somente as células epiteliais das bordas da ferida estão disponíveis devido a destruição dos anexos, e portanto a reepitelização é mais demorada. Em incisões cirúrgicas a migração se inicia nas primeiras 24 horas da lesão e pode estar completa em até 72 horas em indivíduos saudáveis.

O fechamento da lesão não é a única função dos queratinócitos nessa fase. Estudos em biologia molecular mostram a produção de Fator Estimulador de Colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF), bem como TGF- $\alpha$ , Fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento de endotélio (VEGF). Eles também produzem Interleucinas 1, 3 e 6. A Interleucina 1



estimula a proliferação de fibroblastos e aumenta a produção de colágeno tipo I e III. Portanto essas células ajudam a preparar e promover as fases seguintes da reparação tecidual. A Interleucina-6 leva a síntese de proteínas, algumas das quais levam ao término da fase inflamatória.

Por definição as úlceras crônicas apresentam déficit de reepitelização. Isso pode se dever à proliferação celular reduzida, ou a um aumento na morte de queratinocitos. Estudos mostram que não há diferenças no índice de mitose entre aquelas úlceras que fecharam através de tratamento daquelas em que permaneceram abertas. É possível portanto que a matriz extracelular influencie o processo de fechamento da ferida através da criação de um ambiente que possa favorecer ou impedir a migração e adesão de células epiteliais (10). A natureza dessas interações permanecem inexplicadas.

Por reepitelização define-se “a reconstituição da células epiteliais em um epitélio estratificado, escamoso que cobre permanentemente o ferimento e restaura sua função” (12). As células epiteliais da borda livre da ferida migram através da matriz extracelular provisória do tecido de granulação em direção ao centro da lesão. O avanço destes queratinocitos se interrompe e as células acima e de trás delas migram sobre elas até a matriz provisória – um tipo de movimento chamado de “epibolia”. As células epiteliais que permaneceram atrás das células que migraram, começam a se proliferar e fornecer novas células para a

cobertura da lesão e para a estratificação do epitélio, formando as camadas epiteliais supra basais.

A migração continua mantendo uma espessura de uma a duas células até que haja contato com o outro *front* de células epiteliais (inibição por contato). Há, então, um processo de diferenciação das células e estratificação do epitélio(11). Simultaneamente, os queratinócitos começam a reconstituir a membrana basal, que consiste em um grande número de complexos de adesão ligados em forma de rede. As células originam a membrana basal através da formação de hemidesmosomos e o depósito de proteínas como o colágeno tipo IV e a laminina V. Posteriormente elas secretam colágeno tipo VII, necessário para a ancoragem de fibras.

A integridade da membrana basal é essencial para a associação estável entre a epiderme e a derme. Até que membrana basal esteja totalmente refeita, a adesão entre a nova epiderme e a matriz se mantém frágil e o novo epitélio pode ser facilmente destacado pelo atrito. Outros fatores que tem sido identificados como empecilhos para a reepitelização que favorecem o surgimento de feridas crônicas são as enzimas proteolíticas produzidas por bactérias colonizantes ou a presença prolongada de neutrófilos que geram uma reação inflamatória crônica.

### **2.3.2. A Proliferação Vascular (ou neoangiogênese)**

A proliferação de vasos sanguíneos, também chamada de neoangiogênese, é fundamental para o restauro da circulação sanguínea do tecido lesado. O principal estímulo para essa angiogênese é a hipóxia relativa que surge logo após a lesão. Juntamente com a proliferação dos fibroblastos, a neovascularização ajuda a estabelecer o tecido de granulação. Alguns fatores de crescimento aceleram a proliferação dos vasos sanguíneos tais como o FGF ou o VEGF que são secretados principalmente pelos macrófagos .

A migração de células endoteliais observada no tecido de granulação ocorre sobre a rede de fibronectina depositada na ferida. A atividade mitótica dessas células leva então à formação de brotos capilares que surgem a partir dos vasos sanguíneos adjacentes à ferida. Progressivamente esses brotos passam a apresentar uma luz e conseqüentemente fluxo sanguíneo. No início a proliferação endotelial é estimulada pela baixa tensão de oxigênio ( $PO_2$ ), porém nas etapas seguintes, uma tensão maior de oxigênio é essencial para a sua proliferação, bem como para a produção de colágeno, que completa a formação dos vasos. O padrão de crescimento vascular é muito semelhante na cicatrização da pele, dos músculos e do trato gastrointestinal.

A modulação da angiogênese é de grande interesse na atualidade, uma vez que a inibição do crescimento de vasos poderia diminuir a progressão de tumores, bem como o seu estímulo poderia acelerar a cura de úlceras crônicas.

### **2.3.3. Fase de Fibroplasia**

Quando os fibroblastos chegam ao ferimento (a partir de 24 horas após a lesão), passam a depositar nova matriz extracelular no leito da ferida. Esta matriz, ainda provisória, é composta por grandes quantidades de fibronectina, além de outras proteínas que compõem a matriz como colágeno, elastina e glicosaminoglicanas. O objetivo é preencher o defeito tecidual causado pela lesão e permitir movimentação de células atraídas para o local. Aproximadamente aos 5 dias após a lesão, a matriz provisória já estará povoada por tecido vascular em proliferação, fibroblastos e células inflamatórias, configurando o tecido de granulação.

O tecido de granulação é o sinal macroscópico da ocorrência da deposição de tecido conjuntivo na base do ferimento, e é chamado assim devido ao aspecto granuloso de cor vermelha rutilante de sua superfície, dada pela presença de múltiplos capilares elevados, em forma de laços, que formam um eixo estrutural circundado por macrófagos, fibroblastos e matriz extracelular (rede de fibras de colágeno). É um tecido especializado, precisamente organizado do ponto de vista funcional e anatômico, que tem o objetivo de “limpar” as áreas lesadas de fragmentos desvitalizados (através dos macrófagos), “nutrir” o novo tecido mesenquimal em crescimento (através dos neovasos) e “preencher” o defeito tecidual existente (pela deposição de colágeno), constituindo um substrato para a progressão da epitélio neoformado.

O número de macrófagos nessa fase diminui, e os queratinócitos, os fibroblastos e as células endoteliais assumem a produção de fatores de crescimento. Esses fatores perpetuam o estímulo de proliferação, síntese de matriz extracelular e angiogênese (11). Em um momento posterior a matriz extracelular adquire uma composição mais definitiva, passa a ser composta principalmente por colágeno e em menor proporção por glicosaminoglicanas e proteoglicanas.

A fase proliferativa pode perdurar por várias semanas, até que esteja restabelecida a continuidade do epitélio. O prolongamento da fase de formação de tecido de granulação leva a uma maior deposição de colágeno, o que ocorre por exemplo com a presença de bactérias ou corpos estranhos no ferimento; isso mantém o recrutamento de neutrófilos, resultando no prolongamento da inflamação, com maior dano tecidual e subsequente maior formação de tecido fibroso.

Outro fator que estimula a formação de fibrose é a tensão mecânica no ferimento. Estudos mostram que ao se submeter fibroblastos a tensão, esses passam a produzir maior quantidade de TGF $\beta$  (13). Clinicamente, este fenômeno poderia levar a maior produção de matriz extracelular e conseqüentemente explicar o surgimento de cicatrizes hipertróficas em feridas sob tensão. Já as doenças fibróticas, tais como a formação de quelóide, morphea e a esclerodermia podem ser encaradas como decorrentes de uma

disfunção da função dos fibroblastos, levando a uma desregulação da fibroplasia.

#### **2.3.4. A fase de remodelação**

Uma vez que a ferida esteja reepitelizada, o colágeno produzido durante a fase de deposição de matriz extracelular continua sendo remodelado em resposta às solicitações de tensão sobre a pele reparada. Nos casos onde houve formação de cicatriz visível, corresponde a chamada Fase de Amadurecimento da cicatriz. Tal fenômeno se dá através de processo dinâmico e contínuo de produção e degradação de colágeno.

Durante esse processo, ocorrem principalmente dois fenômenos: o aumento da resistência tensil da ferida e a diminuição da sua área, ou seja, a sua contração.

A resistência tênsil da área reparada aumenta continuamente apesar da redução da síntese de colágeno. Esse ganho de força se deve à modificação estrutural desse novo colágeno depositado. Histologicamente, essas fibras inicialmente desorganizadas, tornam-se mais espessas e formam fascículos e eventualmente fibras compactas. Este aumento no diâmetro da fibra é diretamente proporcional ao ganho de força tênsil(13).

O processo da remodelação é dinâmico, no qual a maturação da cicatriz ocorre durante meses ou anos. Estudos em feridas de ratos mostram que, por volta de três meses, ocorre estabilização da resistência tênsil da cicatriz, mas esta só vai atingir seu ponto máximo após um ano da lesão. Entretanto, a

resistência mecânica final do tecido cicatricial é equivalente a apenas 80% da resistência da pele íntegra(14).

O fenômeno de produção e remodelação de colágeno é grande importância para a resolução de uma ferida. Ele determina não apenas o aspecto final de uma cicatriz, mas também as suas propriedades mecânicas como resistência, área ou elasticidade. Devido ao impacto que isso gera não apenas do ponto de vista estético mas também funcional, aprofundaremos a sua discussão a partir da revisão bibliográfica.



### **3. Objetivos:**

Considerando a importância do fenômeno de contração de feridas, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre esse fenômeno específico. Procuramos também estabelecer em nosso meio um modelo experimental para o estudo desse fenômeno.

Um segundo objetivo a partir do uso desse modelo, foi a realização de um estudo comparativo entre a contração gerada por fibroblastos de pele normal, e a contração gerada por fibroblastos de quelóides. E verificar o efeito do fator de crescimento TGF $\beta$  sobre os fibroblastos de pele normal.

## 4. Revisão Bibliográfica

### 4.1. Contração da ferida

O tecido de granulação formado passa a sofrer uma involução progressiva após 2 semanas da lesão. Este fenômeno, representado pelo movimento centrípeto dos limites da ferida em direção ao centro, é chamado de contração, e ocorre gradualmente com o intuito de diminuir a área a ser recoberta pelo epitélio em proliferação. O processo de contração da ferida pode gerar um quadro de comprometimento funcional, chamado *contratura*, com conseqüente deformidade e restrição da função de uma articulação(15).

A contração da ferida começa aproximadamente 4 a 5 dias após a lesão inicial e atinge seu máximo em torno de 12 a 15 dias, embora possa continuar a agir por períodos maiores se a ferida permanecer aberta. A taxa de contração depende da frouxidão do tecido: uma ferida no couro cabeludo ou na região pré-tibial, locais onde a pele já é naturalmente mais tensa, irá contrair menos(15).

A contração é desejável por um lado, porque à medida em que ocorre, reduz o risco de infecção e perdas metabólicas. Entretanto, em determinadas áreas, pode produzir deformidades e problemas funcionais e estéticos como por exemplo nas articulações ou em áreas como as pálpebras ou os lábios. Alguns dos fatores que reduzem a taxa de contração da ferida são: infecção,

desnutrição, corticóides, enxertia de pele parcial e enxertia de pele total. A enxertia de pele parcial reduz mas não evita a contração subsequente da ferida, enquanto que a enxertia de pele total essencialmente a abole(15).

A primeira teoria que tentou explicar a contração das feridas foi proposta por Watts, Grillo, e Gross em 1958 e era baseada na chamada “teoria da moldura”.(19,20). Segundo essa teoria o processo de contração ocorria devido ao avanço das bordas da ferida em direção ao seu centro. Ou seja, o “motor” da contração não seria as células do interior do tecido de granulação, mas sim, as células localizadas na periferia da lesão (possivelmente fibroblastos). A hipótese é de que essas células puxariam as bordas da ferida centripetamente, o que resultaria na contração da ferida(19). Evidências para essa teoria partiram de estudos com porcos da Índia, nos quais a deficiência de Vitamina C não impediram a contração da lesão de pele, sugerindo que a integridade das fibras colágenas da matriz extracelular não é importante para o processo de contração do tecido de granulação das feridas (21).

Entretanto, estudos posteriores sugeriram que as forças de contração se originavam no centro da lesão (no tecido de granulação) e não nas suas bordas (22). Outros estudos corroboraram essa segunda teoria, uma vez que se observou que a lesão das células do tecido de granulação através de radiação ou de toxinas interrompia o processo de contração da lesão (23).

Devido a identificação de células especializadas em gerar contração por Gabbiani em 1971 (miofibroblastos)(25), os estudos passaram a partir de então a se concentrar no estudo da composição celular e na remodelação do colágeno do tecido de granulação.

Duas hipóteses um tanto contraditórias tentam atualmente explicar o mecanismo da contração das feridas.

Passaremos a detalhar as teorias que tentam explicar a contração das feridas.

### **a. Contração mediada por Miofibroblastos**

A primeira teoria afirma que são os miofibroblastos os responsáveis pela contração de feridas.

Esse tipo especializado de célula é formado por fibroblastos que sofreram alterações fenotípicas e passaram a produzir proteínas contráteis (actina e miosina). Os miofibroblastos constituem a maior população de células encontrada no tecido de granulação maduro e foram detectados também em cápsulas de implantes mamários e em nódulos de pacientes com contratura de Dupuytren(16). Tais células podem ser encontradas dispostas na área do ferimento alinhadas ao longo das linhas de contração desde o terceiro dia após a lesão inicial; o fator de crescimento derivado de plaquetas tem sido identificado como o principal estímulo para a contração da ferida(16).

Os miofibroblastos apresentam características intermediárias entre os fibroblastos normais e as células de musculatura lisa (24). Devido a esse fenótipo particular, foram batizadas de “miofibroblastos”. Foram descritos pela primeira vez no tecido de granulação de feridas através de microscopia eletrônica em 1971.(11,25).

Essas células são mais móveis e tem maior capacidade de contração que os fibroblastos normais, e normalmente desaparecem com a cicatrização da ferida. Elas são encontradas frequentemente em locais onde há necessidade de geração

de forças mecânicas, como por exemplo nas cicatrizações por segunda intenção, ou em cicatrizes patológicas tais como os quelóides, cicatrizes hipertróficas, fibromatoses, ou na reação estromal de tumores epiteliais. (11). Recentemente passaram a ser identificadas também em tumores como o rabdomiossarcoma, ou em meio a células cardíacas de pacientes com miocárdio hipertrófico por insuficiência cardíaca congestiva(12), ou em doenças fibroproliferativas como na Doença de Peyronie (26), em pacientes com contratura capsular em implantes tais como prótese mamárias e marcapassos (27).

A diferenciação de fibroblasto para miofibroblasto é acelerada durante o processo de cicatrização até o 14<sup>o</sup>. dia após a ferida, e então sua concentração diminui progressivamente até o 35<sup>o</sup>. Dia após a lesão (11), período no qual provavelmente entram em apoptose.

Essa transição de fibroblastos para miofibroblasto se inicia com o surgimento do proto-miofibroblasto, cujas fibras de stress contêm apenas actina citoplasmática B e Gama, diferentemente do miofibroblasto maduro que contém actina Alfa de músculo liso. Essa diferenciação para miofibroblasto é um processo complexo, regulado por diferentes fatores, dentre eles pela citocina TGF- $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor B-1*) e por um componente da matriz extracelular – a fibronectina ED-A., além da presença de tensão mecânica na ferida(11).

A capacidade de gerar contração do miofibroblasto deve-se muito provavelmente a ação direta (contração isométrica) da Actina Alfa de Células de

Musculatura Lisa, através do sua Terminação-N com domínio AcEEED. (12), mediada pela proteína Rho/Rho quinase. A força assim gerada é transmitida pela Vinculina e Tensina, que conectam as fibras de *Stress* a matriz extra-celular (28). O seu aparelho de contração inclui além dos microfilamentos de alfa-actina, uma associação de outras proteínas de contração, tais com a miosina não-muscular (29) e até algumas proteínas de musculatura estriada tais como a miosina sarcomérica de cadeia pesada e a MyoD (24). A contração gerada por essas proteínas é transmitida através da interação de um miofibroblasto com outro, e da ligação do miofibroblasto com a matriz extra-celular. A interface entre os componentes da matriz extracelular e o citoesqueleto do miofibroblasto são as fibras de Actina Alfa, permitindo portanto a transmissão de forças para a matriz. As adesões entre os miofibroblastos parecem ser importantes para sincronizar a atividade de contração dos miofibroblastos (29). Cada miofibroblasto é capaz de gerar uma força de 2,65 microN/células (31).

Quando a contração da ferida termina e esta está totalmente reepitelizada, os miofibroblastos expressando alfa-actina desaparecem, provavelmente através de apoptose. Essa ativação da apoptose depende da densidade de fibroblastos na ferida e da organização das fibras de alfa-actina, ou seja, quando os miofibroblastos se encontram em condições proliferativas, o *turn over* da alfa-actina é mais rápido e a estabilidade do RNAm para essa proteína é menor; portanto a quantidade de miofibroblastos diminui(32). A cicatriz torna-se então tipicamente menos celularizada e povoada por fibroblastos normais, contendo reticulo endoplasmático rugoso, sem os microfilamentos de actina (33).

Uma das possíveis causas para o surgimento de cicatrizes hipertróficas e contraturas cicatriciais é a ausência dessa apoptose ou eventualmente, um atraso em sua indução (34).



## **b. Contração mediada pela remodelação de matriz**

Uma outra teoria afirma que a contração se faz pela remodelação do colágeno gerada por fibroblastos da derme e não pela ação dos miofibroblastos. Estes gerariam uma contração da ferida a partir reorganização espacial das fibrilas de colágeno em feixes mais espessos. Estudos com biópsias seriadas de feridas que cicatrizam por segunda intenção mostram que a contração da ferida se inicia semanas antes do surgimento de miofibroblastos no seu leito (17). Nesse caso, os responsáveis pela contração seriam os fibroblastos do tecido de granulação e não os miofibroblastos.

Não se sabe exatamente como os fibroblastos geram a remodelação da matriz e a contração do tecido de granulação. Alguns autores acreditam que é a locomoção dos fibroblastos dentro do tecido conjuntivo que leva a remodelação do colágeno e conseqüentemente a contração (23,35) , e não a ação dos miofibroblastos (36). Segundo esses estudos, os fibroblastos migram em media de 5 a 100 $\mu$ m/h (37).

Outros estudos em microscopia eletrônica sobre esse modelo nos levam a acreditar que é a mudança de formato dos fibroblastos no interior da matriz que gera a contração. Eles revelam que apos a inclusão do fibroblasto na matriz, este passa a gerar uma contração logo após o inicio do experimento e que se mantém constante até as 15 primeiras horas. A observação do comportamento celular durante esse período mostra que a contração da matriz coincide com a mudança de

formato da célula: eles tem inicialmente um formato circular e sofrem um alongamento, porem não se observou sua migração ou contração (38).

Para estudar essa interação entre o fibroblasto e a matriz extracelular, um dos modelos mais difundidos é o de géis de colágeno povoado por células proposto por Bell *et cols* em 1979 (18).

A simplicidade do modelo de géis de colágeno povoado por fibroblastos (GCPF) descrito por Bel permite uma investigação que seria difícil em modelos *in vivo*. Devido a sua paucidade ele permite estudar aspectos específicos da cicatrização, como por o exemplo a influencia de determinados fatores de crescimento, ou de alguns componentes da matriz extracelular, na contração do colágeno.

Independentemente da forma como se dá a contração, sabe-se que ela depende da ligação entre o fibroblasto e a matriz. Essa ligação ocorre através de proteínas da membrana celular chamadas integrinas. Elas a interação das células com o colágeno da matriz extra-celular e são formadas por duas cadeias de proteínas chamadas  $\alpha$  e  $\beta$  (39). As principais integrinas são a fibronectina, a vitronectina e a integrina  $\alpha_2\beta_1$ . Estudos mostram que os fibroblastos utilizam uma pequena cascata de reações para se ligar ao colágeno. A hipótese é de que nas primeiras 5 horas a ligação dos fibroblastos com a matriz seja através da Fibronectina. A partir de 4 horas do inicio da reação passa a ser importante a ligação através da Vitronectina e finalmente apos 6 horas as ligações são através

da integrina  $\alpha_2\beta_1$ . O estudo também sugere uma interdependência entre as ligações e que as reações em seqüência são obrigatórias; em outras palavras, a habilidade de se ligar através de uma integrina depende de uma ligação bem sucedida com a integrina anterior da cascata de reação(39).

#### **4. Teoria de Murray-Oster**

A teoria do contínuo de Murray-Oster (40) é um modelo matemático que propõe através de uma equação, que mais de um sistema de controle pode ser o responsável pela geração da contração. Em particular ela sugere que o mecanismo de contração não se deve exclusivamente a interação entre célula e matriz extracelular mas sim devido a combinação da interação entre célula e matriz (remodelação da matriz) e célula e célula (ação de miofibroblastos), ambas interagindo para o processo (41).

#### **5. Modulação da contração pelo Fator de Crescimento Transformador**

##### **Beta (TGF $\beta$ ):**

A contração do gel de colágeno mediada por fibroblastos depende de um citoesqueleto de actina intacto (36,42) e da atividade da enzima miosina de cadeia leve quinase (37). Para que essa contração ocorra é necessário também plasma, o que indica que este provavelmente contém substâncias capazes de regular a contração.

A atividade do plasma pode ser simulada ou substituída por fatores de crescimento isolados. Um dos principais fatores de crescimento na modulação da contração é o TGF $\beta$ .

O TGF $\beta$  é um polipeptídeo que está presente em uma grande variedade de células, especialmente nas plaquetas, que os liberam no local da lesão (43). Trabalhos experimentais com TGF $\beta$  mostram que ele é capaz de estimular a cicatrização (44-46). Enquanto estudos *in vitro* sugerem que o TGF $\beta$ 1 é quimiotático para células inflamatórias (46) e para fibroblastos (48).

O TGF $\beta$  apresenta 3 subtipos: 1,2 e 3. (49). Os níveis dos subtipos 1 e 2 estimulam os fibroblastos e estão aumentados nas cicatrizes quelóides, enquanto o subtipo 3 não está aumentado (49).

O TGF  $\beta$  1 estimula a contração gerada por fibroblastos (34,49) e está associado também com uma produção maior de colágeno (50,51) e de fibronectina (53).

Outro efeito do TGF $\beta$ 1 e 2 é a diferenciação de fibroblasto para miofibroblasto (38,39). A adição de TGF $\beta$ 1 em géis de colágeno povoados por fibroblastos em concentrações variando de 1 a 10 ng/ml, gera uma ativação dose dependente dos fibroblastos. O fator de crescimento induz a transformação dos fibroblastos em miofibroblastos, através da estimulação da síntese de proteínas como a fibronectina, a tenacina e a actina de músculo liso (54).

O TGF $\beta$ 1 e 2 podem estar implicados na formação de quelóides. Uma das hipóteses para a formação dos quelóides é o excesso de contração gerado por fibroblastos e esse excesso de contração pode ser gerado pelo TGF $\beta$  (55). Estudos mostram que géis de colágeno contendo fibroblastos de quelóides apresentam maior contração que os de fibroblastos normais. Além disso, a adição de TGF $\beta$  em géis com fibroblastos normais, levam os mesmos a gerar o mesmo padrão de contração que os géis com fibroblastos originados de quelóides (56) Uma segunda evidência que reforça essa hipótese é a de que a inibição do TGF $\beta$  através do uso de SB-431542 (um bloqueador do receptor de TGF $\beta$ ) consegue inibir a contração do gel povoado por fibroblastos de quelóides. Essa capacidade de inibição de contração esta associada a supressão que a substancia gera sobre a alfa-actina de músculo liso (57).

A propriedade do TGF $\beta$  de estimular a contração gerada pelos fibroblastos pode ser relevante para outros processos alem da cicatrização normal (58). Portanto é possível que o TGF $\beta$  secretado pelos macrófagos (59) e ativado pelos linfócitos (44) pode ter um papel importante na resposta fibroproliferativa aumentada observada nas feridas com reação inflamatória crônica.

**MATERIAL**

**E**

**MÉTODO:**

## **6. MATERIAL E MÉTODO:**

O projeto incluiu: (I) o estabelecimento do modelo de contração do gel de colágeno, (II) o estudo comparativo da contração de géis quando povoado por fibroblastos normais e a contração gerada por fibroblastos de quelóides, e (III) a influência do TGF $\beta$  sobre a contração dos fibroblastos oriundos de pele normal.

### **I. ESTABELECIMENTO DO MODELO:**

#### **1.Culturas primárias - fibroblastos humanos:**

Fibroblastos humanos foram isolados a partir de pele normal de espessura total, ou de fragmentos de quelóides pela técnica de “explante”(60)

Excedentes cutâneos de espessura total obtidos em mastoplastias redutoras ou de fragmentos de quelóides excisados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e doados para finalidade de pesquisa, foram transportados em frasco estéril com solução salina a 0,9% até o Laboratório de Pesquisa. Em fluxo laminar o tecido foi imerso em etanol a 70% durante 30 segundos para diminuir a colonização bacteriana, e a seguir lavado em dois banhos de solução salina 0,9% para retirada do álcool, (citotóxico para os fibroblastos).(Figura 2).

Os fragmentos de aproximadamente 5 cm<sup>2</sup> de pele normal ou de cicatrizes quelóides, foram submetidos à retirada do tecido subcutâneo e cortados em

fragmentos de 1mm<sup>2</sup>. Estes fragmentos foram posicionados com a porção dérmica em contato com a superfície de cultivo em frasco de 25 cm<sup>2</sup> de superfície de cultivo, previamente recoberto por 0,4 ml de Soro Fetal Bovino (SFB) (Figura 3). O frasco foi invertido, de modo que os fragmentos ficaram voltados para cima, acrescentando-se na garrafa de cultura 5ml de meio de Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM) + 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) + solução antibiótica (1% de Penicilina Sódica, 10.000 U/ml /Sulfato de estreptomicina 10000 g/ml), deixando-se em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, 37°C, durante 2 horas. Após transcorrido este intervalo durante o qual ocorreu a adesão dos fragmentos à superfície de cultura, os frascos foram reinvertidos cuidadosamente e colocados na estufa CO<sub>2</sub> 5% a 37°C (Figura 4) .

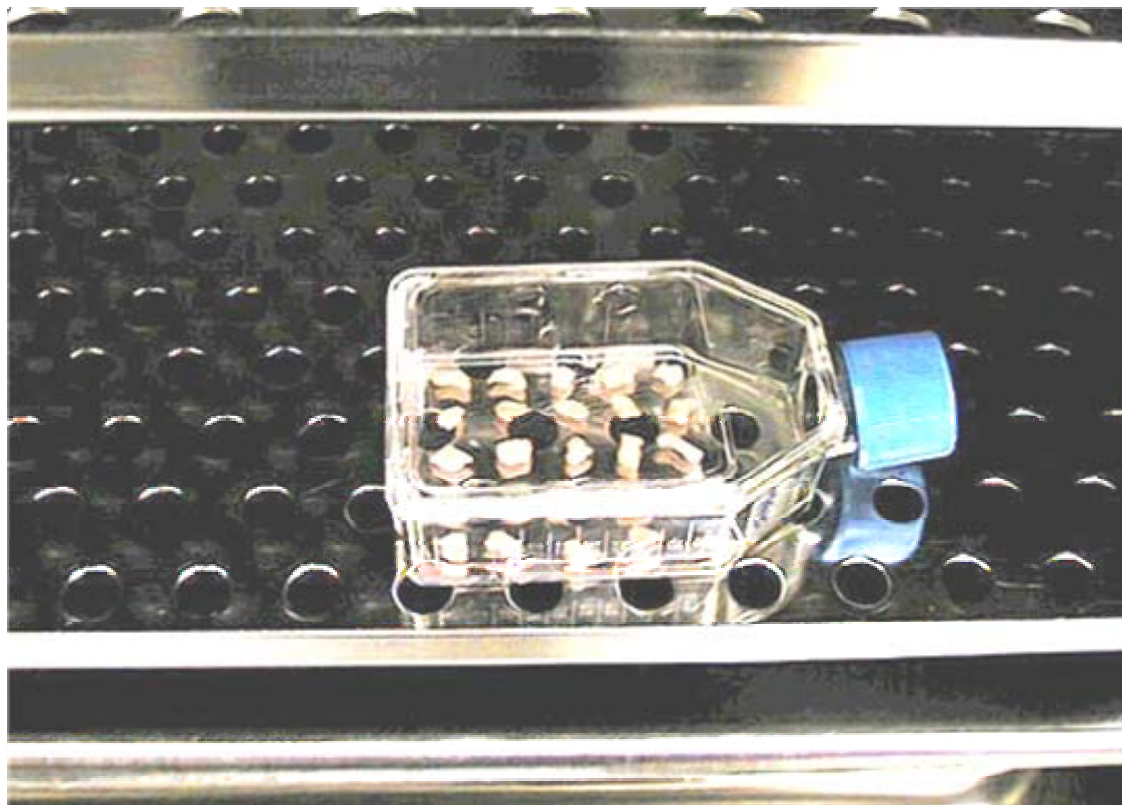


**Figura 2. Banhos de etanol a 70% e solução salina**





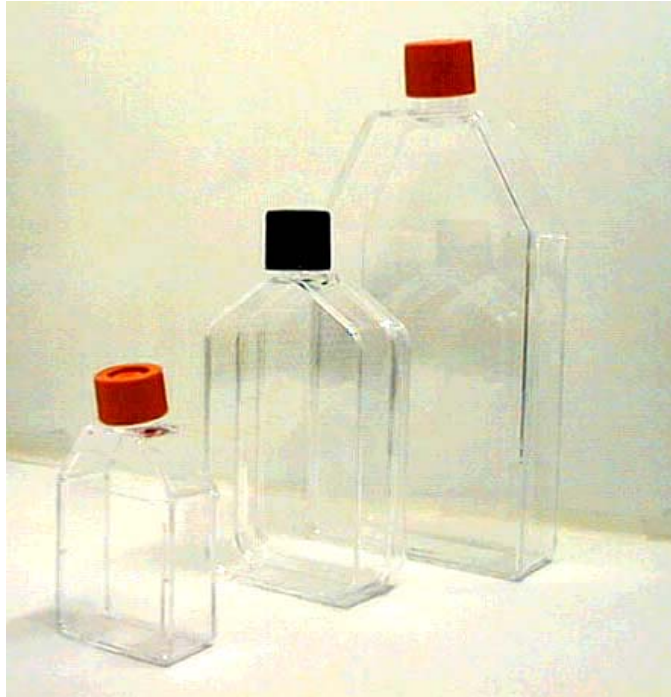
**Figura 3. Cultura de Fibroblastos por Explante**



**Figura 4. Garrafa de 25 cm 3 na estufa de CO2.**

O meio foi substituído por novos 5ml de DMEM/ 10% de SFB + 1% de Penicilina/Estreptomicina pela primeira vez após 4 dias, e novamente a cada 3 dias. Cerca de 2 semanas após o início da cultura observou-se fibroblastos contornando os fragmentos dermo-epidérmicos, permitindo a remoção dos mesmos. Os fibroblastos multiplicaram-se até a semi-confluência, momento no qual realizou-se a amplificação da cultura.

Esta amplificação foi realizada através da adição de 5 ml de solução de Tripsina 0,05% + EDTA 0,02% na garrafa de cultura. Após 5 minutos essa reação enzimática foi interrompida pela adição de 5ml de DMEM/ 10% de SFB. O conteúdo foi aspirado, transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado por 5 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O botão de células foi ressuspenso em 15ml de meio de cultura (DMEM/ 10% de SFB) e transferido para garrafa de cultura de células de 75 cm<sup>2</sup> de área e incubado a 37° C em uma atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup>. Amplificações similares foram realizadas até atingir-se um total aproximado de 1 x 10<sup>6</sup> de fibroblastos (Figura 5).



**Figura 5. Amplificação das culturas celulares: a intervalos, a suspensão de células é transferida para uma garrafa com maior área. Garrafas de cultura de células de 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> e 175cm<sup>2</sup>.**

## II. Gel de colágeno e fibroblastos:

### a. Preparo da solução de colágeno:

A solução de colágeno foi preparadas segundo modificação do protocolo proposto por Bell *et cols.* (11), a saber: caudas de ratos tipo Wistar-Furth foram lavadas com escova cirúrgica e sabão, e colocadas em álcool etílico 70% por 24 horas. Os quatro tendões existentes nas caudas dos ratos foram retirados assepticamente (figura 6) e colocados em um recipiente com ácido acético diluído 1:1000, usando 250 ml para cada cauda (Figura 7) . A mistura foi mantida por 48 horas em agitação magnética a 4°C e armazenada a seguir em refrigeração (4°C). Após 2 semanas obteve-se uma solução viscosa (Figura 9) centrifugada a 500 RPM durante uma hora, gerou duas fases: a fração sobrenadante contendo colágeno tipo I (ácido solúvel) que foi retirada e guardada a 4°C e a restante, representando a fração de colágeno ácido insolúvel, que foi descartada.

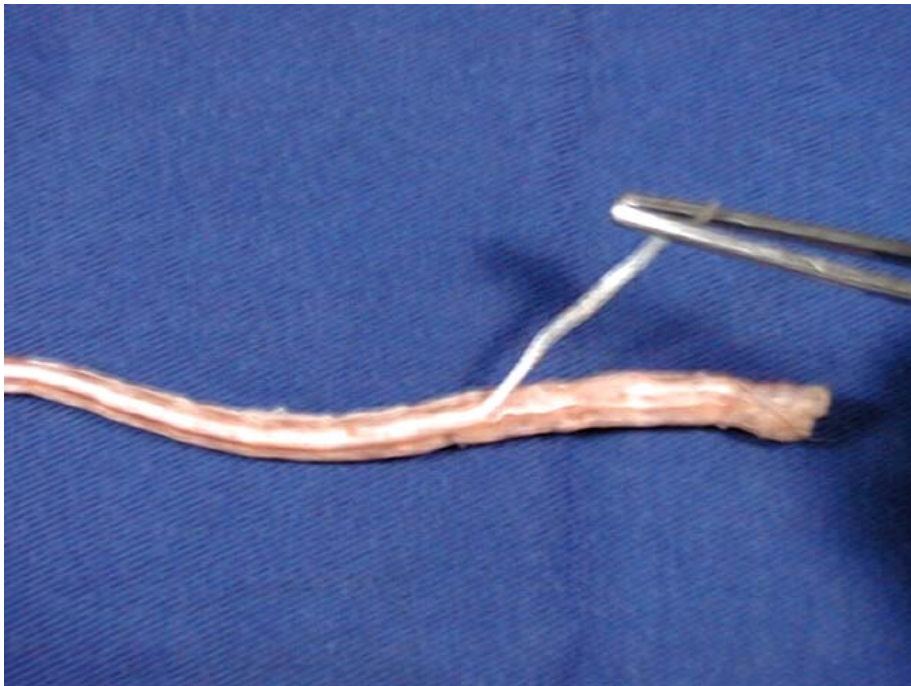


Figura 6. Dissecção da cauda do Rato





Figura 7. Exposição dos tendões a solução de ácido acético 1:1000



Figura 9. Sobrenadante após dissolução da fração ácido-solúvel (colágeno tipo I).

## **b. Determinação da concentração de colágeno tipo I:**

A concentração de colágeno tipo I na solução obtida foi determinado indiretamente pelo cálculo da concentração de hidroxiprolina (HOP), um dos principais aminoácidos constituintes do colágeno tipo I(31).

Para tanto, foi retirada uma amostra de 1 ml da solução de colágeno obtida das caudas de rato, a qual foi liofilizada, resultando em substrato seco. A este substrato, foram adicionados 2 ml de ácido clorídrico (HCl) (MERCK), passando-se o material para uma ampola vedada que foi mantida por aproximadamente 22 horas em estufa a 100°C para efetivação da hidrólise ácida. Este procedimento resultou na liberação de hidroxiprolina livre, que pode ser dosada por espectrofotometria.

Para tanto, a amostra foi neutralizada pela adição de 2,4 ml de hidróxido de lítio (LiOH) (MERCK). Em seguida, foram adicionados 20 ml de Isopropanol e 1 ml de Cloramina T (MERCK), incubando-se por 20 minutos. O processo de coloração do material foi feito através da adição de 2 ml de Reagente de Erlich, em banho termostaticado a 60°C por 20 minutos. Em seguida, foi feita a leitura de absorbância da amostra em aparelho de espectrofotometria no comprimento de onda de 560 nm. Após esta medida foi possível determinar a concentração do colágeno solubilizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Conc. da HOP} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times \text{fator} \times \text{diluição de LiOH} \times 5 \times (\text{vol de HCl})}{2 \times \text{massa de colágeno}}$$

Obs: fator= 4/Absorbância padrão

Para o cálculo da concentração de colágeno tipo I da amostra a partir da concentração de HOP, multiplica-se pela constante de conversão 7,5.

### **c. Protocolo para polimerização da solução de colágeno tipo I e formação do gel**

Foram testados 4 protocolos de polimerização da solução de colágeno, para configurar um gel adequado para posterior inclusão de fibroblastos:

1. Proposto pelo Dr. Jean Luc da Universidade Federal de São Paulo: mistura de 800 $\mu$ l de solução de colágeno + 200 $\mu$ l de DMEM (5X) + 76 $\mu$ l de NaOH (0,1M).
2. Proposto pelo Dr. Sang Won Ham da Universidade Federal de São Paulo: mistura de 200 $\mu$ l de solução de colágeno + 200 $\mu$ l de DMEM 2X + 25 $\mu$ l de NaOH (0,1M) + 200 $\mu$ l de Soro Fetal Bovino.
3. Proposto por Dr. Marvin Karasek da Universidade de Stanford: mistura de 680  $\mu$ l solução de colágeno +80 $\mu$ l de DMEM (10 X) + 65,6 $\mu$ l de NaHCO<sub>3</sub> (0,137 M).
4. Proposto pela Collagen Biomaterials: mistura de 400  $\mu$ l de solução de colágeno + 100  $\mu$ l de PBS (10X) + 100  $\mu$ l de NaOH (0,1M) +100 $\mu$ l de PBS (1 X).

Os géis resultantes dos 4 protocolos propostos foram observados durante 7 dias.



#### **d. Influência do número de fibroblastos sobre a contração do gel de colágeno:**

Para estabelecer o número ideal de fibroblastos a ser incluído para a obtenção de contração macroscopicamente mensurável em cada gel, foram preparados diversos géis contendo respectivamente:  $5 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$ ;  $0,25 \times 10^6$  e  $0,1 \times 10^6$  fibroblastos provenientes de pele normal. As células segundo protocolo de Bell *et cols.*(11) foram incluídas durante a preparação da matriz colágena. Cada uma das propostas teve sua estabilidade e eficiência de contração avaliadas durante 7 dias em estufa a  $37^\circ \text{C}$ .

#### **e. Inclusão de fibroblastos na matriz de colágeno e polimerização do gel:**

Após a eleição do melhor método de formação do gel de colágeno e do número ideal de fibroblastos a ser empregado por gel, foram iniciados os trabalhos de montagem das matrizes de colágeno povoadas por fibroblastos. Em placas multipoços de 24 poços (FALCON) foram incluídos no momento da confecção dos géis de colágeno, aproximadamente  $1 \times 10^6$  de fibroblastos por gel em dois distintos experimentos. Aguardou-se a formação do gel durante 2 horas (Figura 9).

Uma vez ocorrida a formação do gel, foram adicionados 2 ml de meio de cultura (DMEM + 10% SFB). O gel foi desprendido gentilmente das paredes e leito dos poços de cultura e as placas multipoços armazenadas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ \text{C}$ . Os experimentos foram acompanhados e avaliados durante 48 horas.



Figura 9. Gél de Colágeno povoado por fibroblastos

**f. Avaliação macroscópica da contração do gel povoados por fibroblastos provenientes de pele normal e de quelóides:**

A área do gel de colágeno povoado por fibroblastos foi registrada nos momentos 12, 24, 36 e 48 horas após o início do experimento através de fotografias com câmeras digitais. O cálculo da medida das áreas do gel foi realizada através do software “UTHSCSA Image Tool for Windows versão 3.0”.

A porcentagem de contração foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de contração} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100$$

Onde: A1 = área inicial do gel

A2 = área no intervalo observado.

### **III. Estudo comparativo da contração de géis de colágeno povoado por fibroblastos provenientes de pele normal e fibroblastos oriundos de cicatrizes quelóides:**

Foram realizados grupos de experimentos independentes para fibroblastos originados de pele normal e de cicatrizes quelóides.

Para ambos, matrizes em triplicata povoadas por  $1 \times 10^6$  fibroblastos provenientes de pele normal doados por 9 doadores distintos (n=9) ou por fibroblastos oriundos de quelóides doados por 9 pacientes distintos. Como controle, adotaram-se géis sem a inclusão de células em ambos experimentos.

A porcentagem de contração dos géis foi mensurada a intervalos de 12 horas, durante 48 horas, através de registro fotográfico e cálculo de porcentagem de contração como descrito anteriormente.

### **IV. Efeito modificador do TGF $\beta$ sobre a contração do gel de colágeno povoado por fibroblastos provenientes de pele normal:**

A eficiência do modelo para o estudo do efeito de drogas moduladoras da cicatrização foi testada com a adição de 10 ng de TGF $\beta$  (SIGMA) no momento de inclusão de fibroblastos oriundos de pele normal. As células utilizadas nesse

experimento provieram dos mesmos doadores de pele normal utilizados anteriormente. O controle utilizado foram géis de colágeno povoados por fibroblastos de pele normal sem adição de agentes moduladores. Mediu-se a contração macroscópica do gel gerada nesse grupo em intervalos similares aos experimentos anteriores.

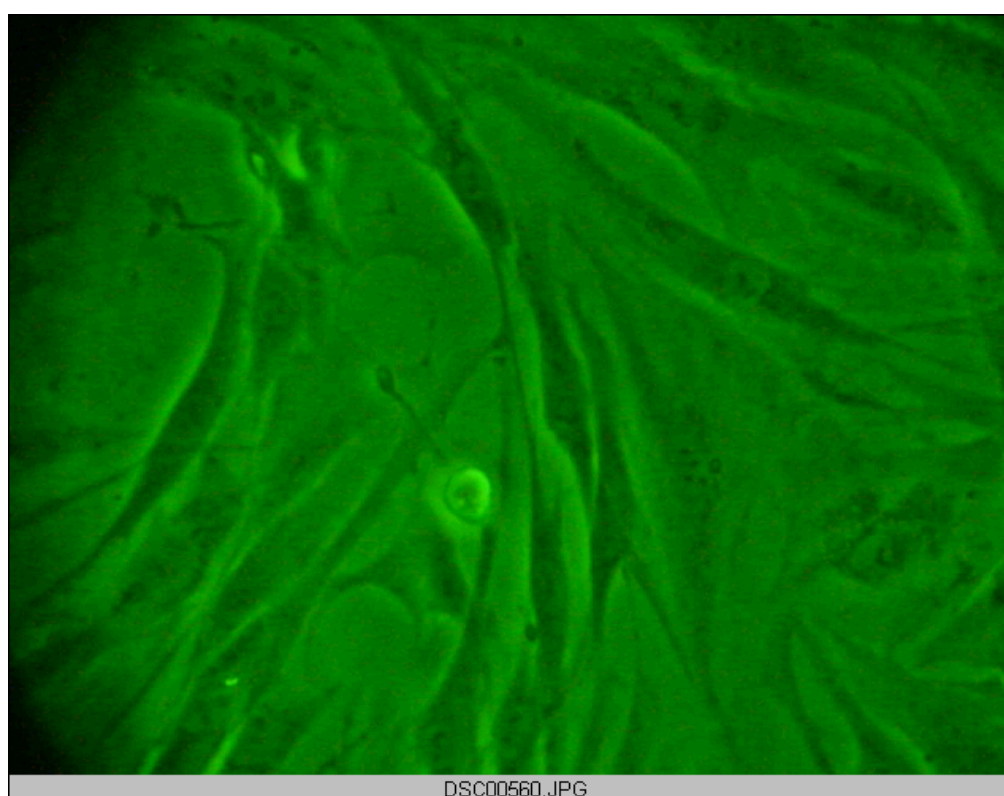
## **V. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram avaliados pelo método ANOVA (Analysis of Variance)

## RESULTADOS:

### 1. Culturas primárias de fibroblastos humanos:

O isolamento de fibroblastos oriundos de pele normal e de quelóides foi atingido com sucesso utilizando-se o método de explante proposto. Obteve-se, em média, um total de  $1 \times 10^6$  fibroblastos após três semanas da cultura primária com suas ampliações (Figura 10).



**Figura 10: Fibroblastos humanos em cultura**

### ***2.1) Preparo da solução de colágeno:***

Após a centrifugação da mistura com os tendões da cauda de ratos e o ácido acético, obteve-se um sobrenadante constituído por uma solução homogênea, de coloração transparente e fluida, possível de ser manipulada por pipetagem.

Utilizando-se 4 caudas de rato tipo Wistar-Furth conseguiu-se produzir 50 ml dessa solução ácida de colágeno, ou seja, com um rendimento de 12,5 ml de solução de colágeno ácido solúvel por cauda utilizada. A liofilização de 1 ml da solução ácida de colágeno forneceu 1,4 g de substrato seco.

## 2.2) Determinação da concentração de colágeno da solução:

A dosagem de hidroxiprolina após a hidrólise foi realizada por espectrofotometria (560 nm), obtendo-se os seguintes resultados:

*Absorbância da amostra de colágeno solúvel: 1,875*

*Absorbância padrão do dia: 0,4125*

Utilizando a fórmula proposta, pode ser determinada a concentração de hidroxiprolina da amostra:

$$\text{Conc. da HOP} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times \text{fator} \times \text{diluição de LiOH} \times 5 \times (\text{vol de HCl})}{2 \times \text{massa de colágeno}}$$

*Obs: fator= 4/ Absorbância padrão*

$$\text{Conc. de HOP} = \frac{[1,875 \times 4 / 0,4125 \times 2,4 \times 5 \times (2)]}{2 \times 1,4} = 0,155732 \mu\text{g/ ml.}$$

Como a concentração de colágeno tipo I equivale à concentração de HPO multiplicada por 7,5 , a solução de colágeno produzida tinha uma concentração de colágeno tipo I de 1,2158  $\mu\text{g/ ml}$ .



### **2.3) Protocolo de polimerização da solução de colágeno tipo I e formação do gel:**

As propostas de polimerização do Dr. Jean Luc da UNIFESP e do Dr. Sang Won Ham da UNIFESP apresentaram em nossas mãos resultados bastante insatisfatórios pois o colágeno polimerizou-se de maneira heterogênea e com pouca consistência, sendo pouco favorável para a incorporação celular. O protocolo proposto pelo Dr. Marvin Karasek da Universidade de Stanford e o protocolo da Collagen Biomaterials, geraram os melhores resultados, observando-se um gel homogêneo e de consistência final firme. O protocolo da Collagen Biomaterials foi finalmente adotado por ter demonstrado maior facilidade de execução.

### **2.4. Influência do número de fibroblastos sobre a contração do gel:**

Com o número de  $1 \times 10^6$  células foi observada contração macroscópica mensurável do gel a partir de 12 horas e a sua compactação máxima possível em 48 horas. Este número de células foi adotado como padrão para a montagem das matrizes colágenas.

### **3. Estudo comparativo da contração gerada por fibroblastos normais e de quelóides:**

#### **3.1. Avaliação da contração macroscópica do gel de colágeno povoado por fibroblastos provenientes de pele normal ou de cicatrizes quelóides:**

Não se observou contração nos géis controle (sem células).

Os géis povoados por fibroblastos provenientes de pele normal sofreram contração progressiva ao longo dos intervalos estudados. A Tabela 2 mostra a média da contração em cada um dos doadores em cada intervalo. Pode-se observar um maior incremento da contração nos intervalos iniciais que tende a ter uma velocidade menor nos intervalos seguintes.

Os géis povoados por fibroblastos provenientes de quelóides sofreram contração que pode ser observada na Tabela 3 (médias das triplicatas). Nota-se maior contração dos géis povoados por fibroblastos provenientes de quelóides, por momento de estudo em relação aos géis povoados por fibroblastos provenientes de pele normal.

A contração média gerada por fibroblastos provenientes de quelóides em relação aos fibroblastos de pele normal e controle pode ser observada no Gráfico 1.

Tabela 2: estatística descritiva para a porcentagem de contração do grupo normal

Paciente	Grupo	Tempo de Observação			
		12hs	24hs	36hs	48hs
1	Pele normal	54,23	61,2	73,1	82,15
2	Pele normal	59,23	60,2	62,1	80,2
3	Pele normal	51	53,46	60,3	68,1
4	Pele normal	35	61,7	72,3	77,2
5	Pele normal	36,1	40,2	72	77,9
6	Pele normal	62	70,7	74,3	77,49
7	Pele normal	54,2	69,2	72,3	77,55
8	Pele normal	50,1	60,3	63	65,3
9	Pele normal	54,2	57,6	58,2	60,41

	Intervalo de Tempo			
	12 h	24hs	36hs	48hs
<b>Media</b>	50,67	59,4	67,51	74,03
<b>Desvio</b>	9,34	8,95	6,44	7,5
<b>Padrão</b>				
<b>Coifa</b>	87,18	80,10	41,45	56,28
<b>Variação</b>				
<b>Mínimo</b>	35	40,2	58,2	60,41
<b>Mediana</b>	54,2	60,3	72	77,49

<b>Maximo</b>	62	70,7	74,3	82,16
<b>N</b>	9	9	9	9

Valores médios da porcentagem de contração do gel povoados por fibroblastos oriundos de pele normal ao longo do tempo de estudo, em relação a sua área inicial (n=9). Por exemplo, a diminuição media da área do gel em 12 horas foi de 50,67%.

Tabela 3: estatística descritiva para a porcentagem de contração do grupo Quelóide

Paciente	Grupo	Tempo de Observação			
		12hs	24hs	36hs	48hs
1	Quelóide	52	57,80	65	80,78
2	Quelóide	68	79,24	80,34	81,25
3	Quelóide	73,04	79,36	81,36	85,02
4	Quelóide	72	77	80	85
5	Quelóide	75	88	88	87
6	Quelóide	68	75	90	92
7	Quelóide	54,30	60,08	65,49	73,33
8	Quelóide	56	64,64	74,85	77,38
9	Quelóide	78	83,50	87,67	92,89

	Intervalo de Tempo			
	12 h	24hs	36hs	48hs
<b>Media</b>	66,3	73,85	79,20	83,85
<b>Desvio Padrão</b>	0,096957	0,105833	0,092145	0,064175
<b>Coef Variação</b>	84,572519	119,677571	97,9595476	34,1580238
<b>Mínimo</b>	52	57,8	65	73,33
<b>Mediana</b>	68	77	80,34	85

<b>Maximo</b>	75	88	90	92
<b>n</b>	9	9	9	9

Valores médios da porcentagem de contração do gel povoados por fibroblastos oriundos de quelóides ao longo do tempo de estudo, em relação a sua área inicial (n=9). Por exemplo, a diminuição média da área do gel em 12 horas foi de 66,3%.

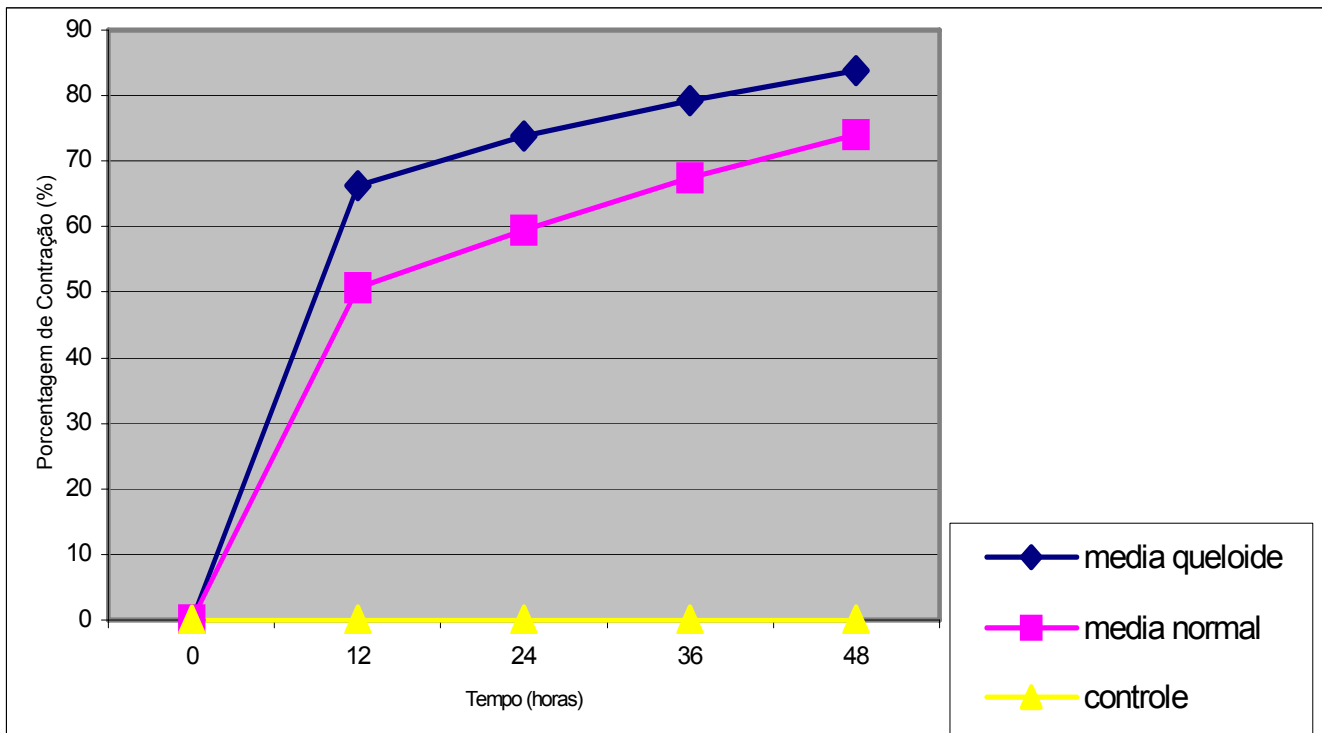


Gráfico 1: Porcentagem de contração média por instante de tempo de observação do grupo normal X queiloide.

#### 4. Efeito do TGF $\beta$ sobre a contração do gel de colágeno povoado com fibroblastos provenientes de pele normal:

Os efeitos da adição de TGF $\beta$  nos géis povoados por fibroblastos de pele normal foram registrados nos instantes 12, 24, 36 e 48 horas.

Na Tabela 4 apresentamos os dados disponíveis para análise a partir das medidas das áreas dos géis em cada momento, enquanto na Tabela 4 mostramos suas respectivas estatísticas descritivas (média, desvio padrão, erro padrão, coeficiente de variação, mínimo, mediana, máximo e tamanho amostral) para os grupos controle (fibroblastos de pele normal sem fator de crescimento) e TGF $\beta$  (fibroblasto de pele normal com adição de TGF $\beta$ ).

**Tabela 4.** Dados de porcentagem de contração disponíveis para análise.

Paciente	Fator de Crescimento	Tempo de Observação			
		12 h	24hs	36hs	48hs
1	Controle	54,23	61,2	73,1	82,15
1	TGF $\beta$	52,1	61	70,8	85,7
2	Controle	59,23	60,2	62,1	80,2
2	TGF $\beta$	50,1	64,2	73,09	93,15
3	Controle	51	53,46	60,3	68,1

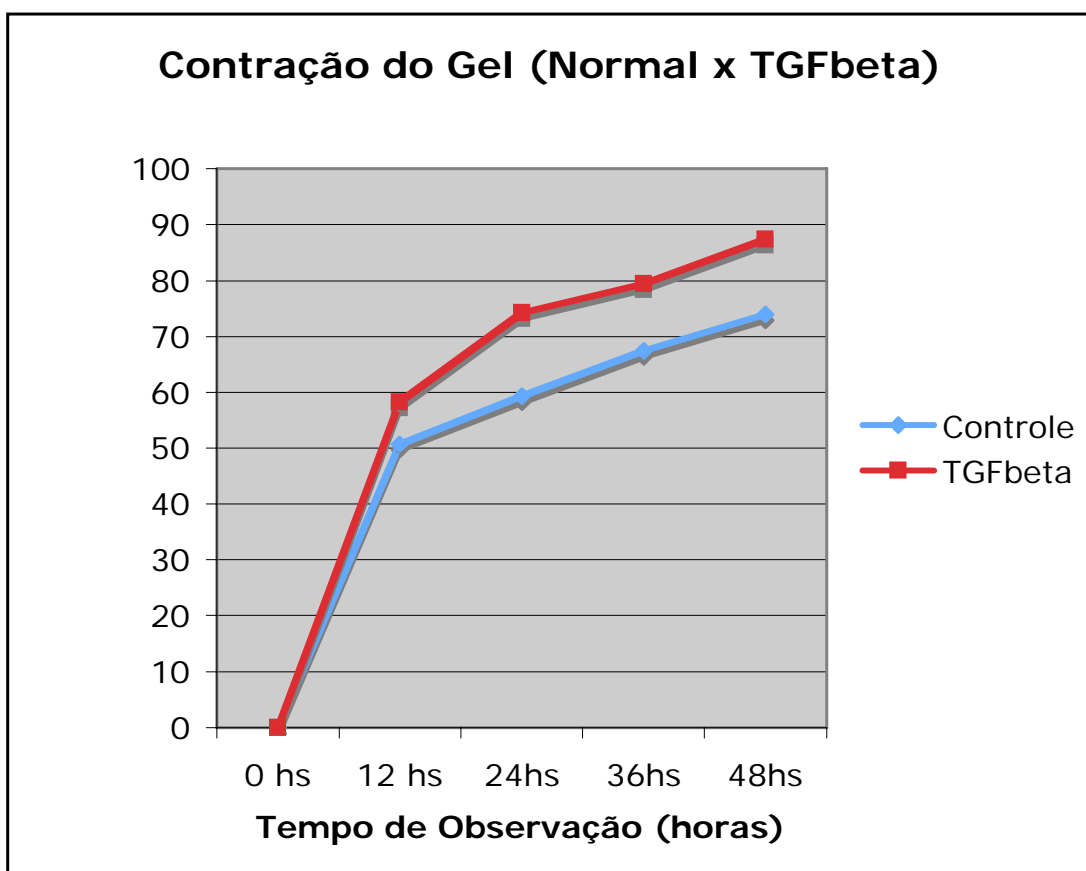


3	TGF $\beta$	68,1	78,7	80,6	86,3
4	Controle	35	61,7	72,3	77,2
4	TGF $\beta$	44	84,8	86	87,2
5	Controle	36,1	40,2	72	77,9
5	TGF $\beta$	56	88,7	90,4	92,8
6	Controle	62	70,7	74,3	77,49
6	TGF $\beta$	70	83,2	85,6	90,9
7	Controle	54,2	69,2	72,3	77,55
7	TGF $\beta$	60	72,1	82,3	87,9
8	Controle	50,1	60,3	63	65,3
8	TGF $\beta$	65,4	68,4	76,3	83,65
9	Controle	54,2	57,6	58,2	60,41
9	TGF $\beta$	59,2	67,2	70,2	79,25

**Tabela 5.** Estatísticas descritivas para a porcentagem de contração.

Fator de Crescimento	Estatística	Tempo de Observação			
		12 h	24hs	36hs	48hs
Controle	Media	50,67	59,4	67,51	74,03
	Desvio Padrão	9,34	8,95	6,44	7,5
	Erro Padrão	3,11	2,98	2,15	2,5
	Coeficiente de Variação	18,43%	15,07%	9,54%	10,13%
	Mínimo	35	40,2	58,2	60,41
	Mediana	54,2	60,3	72	77,49
	Maximo	62	70,7	74,3	82,15
	n	9	9	9	9
TGFbeta	Media	58,32	74,26	79,48	87,42
	Desvio Padrão	8,68	9,91	7,25	4,47
	Erro Padrão	2,89	3,3	2,42	1,49
	Coeficiente de Variação	14,88%	13,34%	9,13%	5,12%
	Mínimo	44	61	70,2	79,2
	Mediana	59,2	72,1	80,6	87,2
	Maximo	70	88,7	90,4	93,15
	n	9	9	9	9

O gráfico 2 mostra a média de porcentagem de contração dos grupos controle e TGF $\beta$ , em cada instante estudado.



**Gráfico 2.** Perfis médios da variável porcentagem de contração por instante de tempo de observação e tratamento.

**5. Comparação entre a contração gerada por Fibroblastos Normais sob o efeito do TGFβ e a gerada por fibroblastos de Quelóides:**

A curva gerada pelos fibroblastos normais sob o efeito de TGFβ (cor amarela) e a gerada por fibroblastos oriundos de quelóides (cor vermelha) são coincidentes do ponto de vista estatístico.

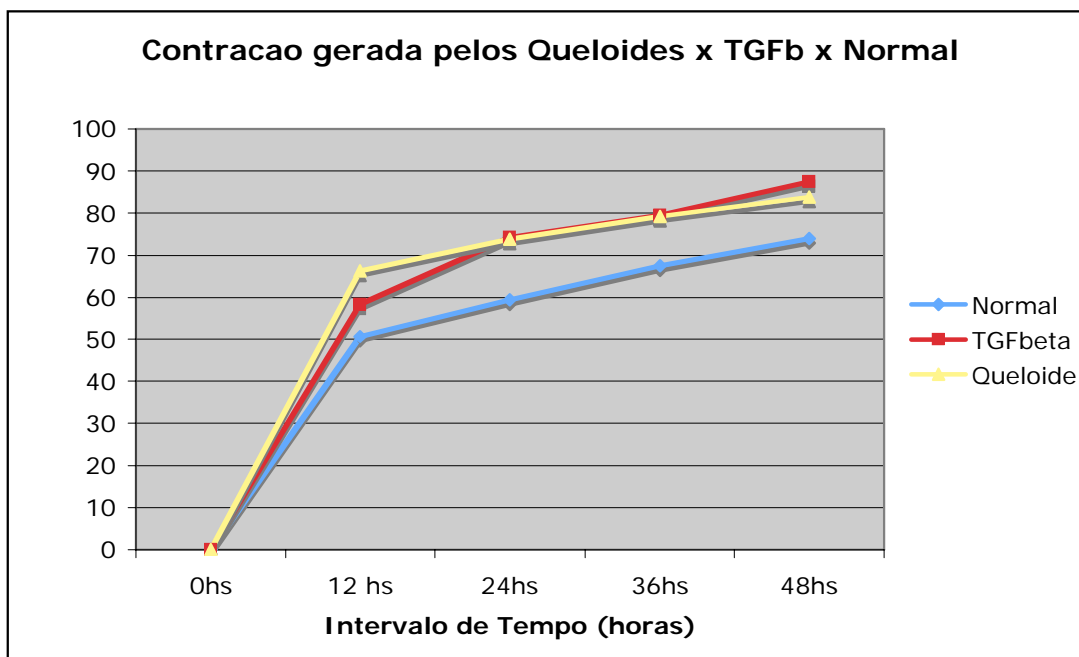


Gráfico 3: Comparação entre a contração gerada por fibroblastos de pele normal modificado por TGFβ X fibroblastos de quelóides.

## 8. Discussão

A prevenção da formação de cicatrizes quelóides no pós operatório de cirurgias ainda não é eficiente. Assim como os altos índices de recidiva após os tratamentos dessas cicatrizes, refletem o grau de desconhecimento existente quanto aos fenômenos envolvidos na sua origem. Durante décadas o conhecimento provinha da análise em nível de estudos histológicos e bioquímicos. O desenvolvimento recente da área de biotecnologia permitiu a criação de matrizes e a cultura de células ex-vivo, surgindo então a perspectiva de uma melhor compreensão da organização e do controle do processo de cicatrização.

Na literatura, o modelo descrito por Bell *et cols.* em 1979 tem sido aceito mundialmente como adequado para o estudo da contração de feridas justamente por incluir os dois participantes fundamentais na cicatrização, ou seja a matriz dérmica extracelular e os fibroblastos(12,13,21,22,23,24).

Este modelo introduzido por Bell e explorado com algumas modificações neste trabalho demonstrou ser um cenário propício para a compreensão dos fenômenos de contração e organização celular a nível de biologia molecular, contribuindo para a ampliação dos conhecimentos relativos ao fenômenos da geração de cicatrizes anômalas .

A simplicidade e paucidade de componentes do modelo que utiliza apenas fibroblastos e colágeno, é por um lado sua limitação uma vez que o tecido de

granulação é composto de diferentes tipos celulares, entretanto, é também sua maior força, pois permite a realização de experimentos que seriam impossíveis de realizar *in vivo*, devido justamente aos múltiplos eventos simultâneos e pouco controláveis. (34). Nesse modelo é possível medir o impacto de cada elemento responsável pela contração de uma ferida. Além disso, esse modelo pode ser utilizado de maneira mais complexa, através, por exemplo, da introdução de uma co-cultura nesse modelo (Queratinócitos, fibroblastos ou células endoteliais) (34).

O entendimento da contração das feridas seria impossível se existissem apenas modelos em animais ou em humanos devido a multiplicidade de fatores. Portanto, uma possibilidade lógica seria que as pesquisas pudessem inicialmente utilizar modelos *in vitro*, como o descrito por Bell, e caso se mostrem promissoras, serem testadas em modelos animais e finalmente em ensaios clínicos em humanos.

Porém, as teorias desenvolvidas a partir dos estudos *in vitro* só terão utilidade se validadas na situação clínica. Há semelhanças entre a observação clínica do fenômeno de contração do tecido de granulação e as matrizes de colágeno povoadas por fibroblastos aqui estudadas, tanto em relação ao padrão de contração, quanto em relação ao comportamento das células e a influência da composição do meio extracelular.

Ehrlich através de biópsias seriadas de feridas sacrais também confirma esta observação. Ele constatou que a contração da ferida se inicia nas primeiras 12

horas e se prolonga nas 6 semanas seguintes. Entretanto só foi possível detectar a presença de miofibroblastos semanas após o surgimento da ferida. leito (17). Portanto comprova-se clinicamente que o fibroblasto exerce seu papel de contração mesmo quando ainda indiferenciado, provavelmente através de sua interação com a matriz ao redor. Pode-se observar uma semelhança interessante entre a evolução natural da cicatrização de uma ferida e o modelo de gel de colágeno. Em ambos o processo de contração inicia nas primeiras horas, e independe inicialmente da presença de miofibroblastos.

Atualmente diferentes teorias procuram explicar a contração do leito das feridas. Alguns autores (20) , propuseram que a contração celular de um tipo especial de fibroblastos diferenciados - miofibroblastos - seriam os responsáveis pela contração do tecido de granulação das feridas. Erlich *et cols.* (6, 10), sugerem que a reorganização da matriz devido a locomoção dos fibroblastos no seu interior leva conseqüentemente à contração.

Os autores que defendem que a contração depende dos miofibroblastos se baseiam na expressão de alfa actina de musculatura lisa, presentes em espessos feixes chamados fibras de stress (7). Essa actina de músculo liso não é detectada até o sexto dia da ferida e então é expresso progressivamente até o 21<sup>o</sup> dia (8). Após 4 semanas essa expressão diminui e essas células entram provavelmente em apoptose (9). Para os autores partidários dessa teoria, as fibras confeririam ao miofibroblasto a capacidade de se contrair, “arrastando” consigo as fibras colágenas

e a soma da ação de cada miofibroblasto reduzindo a distância entre as fibras de colágeno, induziria a contração do leito da ferida.

Por outro lado a observação clínica dos pacientes mostra que o surgimento dessas células nas biópsias não corresponde com o início da contração da ferida. A contração se inicia antes do surgimento dos miofibroblastos, quase imediatamente após a formação da ferida, e continua por duas a três semanas(8), ou seja quando os miofibroblastos já iniciaram a sua apoptose.

O primeiro passo para o estabelecimento do modelo experimental foi a obtenção de fibroblastos humanos e seu cultivo. Para isso é possível empregar-se técnicas de isolamento de células enzimáticas e não enzimáticas, como o explante (37). A escolha do método de explante neste estudo foi adotado por se tratar de método simples, confiável, com rendimento adequado de células e menor potencial de contaminação.

O colágeno para formação das "matrizes dérmicas" na forma de gel foi obtido a partir de extração ácida de colágeno tipo I de tendões de caudas de ratos. A opção pelas caudas de rato foi devido ao alto teor relativo de colágeno tipo I presente também na derme humana e a disponibilidade desse animal em nosso biotério. O procedimento utilizado explorou a propriedade física das moléculas de colágeno tipo I que se tornam solúveis quando em ambiente ácido e em baixas temperaturas (17).



A polimerização da solução na forma de gel se vale do oposto desta propriedade. Assim a técnica utilizada para formação do gel de colágeno combinou em diferentes proporções o aquecimento e a alcalinização desta solução. Dentre os protocolos testados todos utilizaram NaOH para a alcalinização da solução de colágeno, porém o modelo proposto pela Collagen Biomaterials foi o único a propor solução salina fosfato tamponada (PBS) na sua composição. Talvez tenha sido a propriedade tampão dessa substância a responsável por gerar um pH mais estável e conseqüentemente os melhores resultados.

Segundo Bell *et cols.* (11) a concentração de colágeno e o número de fibroblastos presentes influenciaria de maneira direta a contração do gel. Estudos em géis de colágeno tipo I (29) mostram que géis contendo concentrações menores de colágeno contraem mais e com mais rapidez que aqueles com maior concentração de colágeno. Outro aspecto importante é que essa contração não ocorre devido a degradação de colágeno, mas sim devido à sua remodelação. Portanto, a grande contração observada cursa com um aumento da densidade do gel (28). Por outro lado, quanto maior o número de fibroblastos, maior a contração, refletindo de maneira interessante o papel individual de cada célula, e permite supor que a soma da ação de cada uma das delas, que gera a contração mensurável do gel.

A contração macroscópica observada nos géis povoados por fibroblastos de pele normal teve início precoce, foi progressivo nos intervalos estudados e atingiu o seu máximo em 48 horas. Após este intervalo não se observou contração

progressiva ou mensurável. Daí a adoção deste prazo para interromper os estudos. Uma possível justificativa para essa situação seria a “saturação” dos mecanismos de compactação das fibras. Ou seja, após esse período, todas as fibras de colágeno presentes no gel já estariam em sua máxima organização e o espaço inter-celular seria o mínimo possível. Outra explicação seria o fato dos fibroblastos entrarem em apoptose quando agrupados. Sabe-se que a concentração de colágeno no gel influencia a sua capacidade de contração e a sobrevivência dos fibroblastos (29). No estudo citado aqui, o grupo com maior contração do gel, observou-se um maior índice de apoptose dos fibroblastos (29).

Observamos uma contração maior do gel no grupo povoado por fibroblastos provenientes de quelóides. Isso reflete que o comportamento dessas células no que tange à contração, que é mais intenso e inicia-se mais precocemente que o observado nos géis povoados por células de pele normal. Portanto, a ocorrência de cicatrizes quelóides não pode ser justificada apenas pelo conceito tradicional de desbalanço entre a produção e a absorção de colágeno, mas deve-se considerar também que há possível influência intrínseca das células, interagindo e organizando as fibras colágenas vizinhas de maneira diferente, eventualmente criando um adensamento de fibrilas colágenas mais intensa, e conseqüentemente alterando o resultado final. Não se sabe ao certo se essa diferença se deve a fatores genéticos, ou a resposta exacerbada a fatores de crescimento, ou a modificações específicas da citoarquitetura.

De fato, estudos histológicos demonstraram arranjo estrutural distinto entre as cicatrizes normais e quelóides (32). Outra hipótese aventada seria de que a

diferença entre o comportamento cicatricial estaria nas diferentes características da matriz extra-celular, principalmente quanto à sua composição de colágeno e a orientação de suas fibras(33). Em nosso estudo, utilizando matrizes colágenas idênticas e variando apenas o componente celular, observou-se padrões de contração diferentes, o que valoriza o papel das células.

Outro aspecto do estudo buscou testar o modelo como cenário para avaliação de drogas de ação moduladora da contração com potencial valor para uso clínico.

É sugerido na literatura que os fatores de crescimento (*polipeptide growth factors*) tenham um importante papel no reparo tecidual (12). Particularmente, no que tange ao fenômeno de contração do tecido conjuntivo recém formado, têm-se demonstrado que os polipeptídios do tipo fatores de crescimento  $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), alguns peptídeos sintéticos como o SRGDTG (29) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) afetam a função dos fibroblastos em gel de colágeno (29,13, 18,15).

O Fator Transformador  $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ) é um polipeptídio multifuncional presente em uma extensa variedade de células, sendo especialmente abundante nas plaquetas, o qual é liberado nos locais de lesão tecidual (26). Trabalhos experimentais tem demonstrado que TGF $\beta$ , em conjunto com outros fatores (13,27,28) pode promover a cicatrização de feridas, sendo quimiotático para células inflamatórias (25), para fibroblastos e indutor de fibroblastos a produzir

quantidades aumentadas de colágeno e fibronectina. O TGF $\beta$  também estimula a contração de colágeno por fibroblastos como demonstrado em trabalho de Montesano et cols. (12).

As matrizes geradas nesse trabalho demonstraram-se apropriadas para o teste de drogas. Observamos que o TGF $\beta$  promoveu uma maior contração do gel de colágeno. Vale ainda destacar que entre os períodos de 12hs e 24hs a substância TGF $\beta$  apresenta um comportamento médio diferente do grupo controle (apenas com fibroblastos de pele normal), por apresentar um acréscimo estatisticamente significativo na porcentagem de contração. O mecanismo pelo qual o TGFbeta estimula a contração não é conhecido (43). A contração do gel de colágeno é o resultado da tração acumulada gerada pelos fibroblastos sobre as fibrilas de colágeno (50). Teoricamente o TGFbeta pode ou aumentar a força gerada pelos fibroblastos, ou melhorar a transmissão dela para a matriz de colágeno. A síntese aumentada de actina (51), fibronectina (52) e receptores de matriz (53) representam outros mecanismos potenciais pelos quais o TGFbeta pode aumentar a eficiência da contração do gel de colágeno pelos fibroblastos.

Segundo estudos de Jessen (37) e Gabbiani (38) o TGF $\beta$  leva a diferenciação de fibroblastos em Miofibroblastos. Portanto, uma possível explicação a ser melhor investigada é que o grupo em que foi adicionado TGF $\beta$  sofreu maior contração devido a diferenciação dos fibroblastos em

miofibroblastos, A modulação celular gerada por essas drogas pode ser de grande utilidade em situações clínicas que se deseja promover a contração da ferida, ou acelerar sua cicatrização às custas de deposição de colágeno; possíveis candidatos seriam por exemplo, úlceras por estase venosa ou ferida que devem fechar por segunda intenção, como após a ressecção de cistos pilonidais.

Fibroblastos de quelóides produzem maior quantidade de TGF $\beta$  (34,35). Essa é uma possível explicação para a semelhança observada nas curvas de contração dos grupos TGF $\beta$  e Quelóides (tabelas 2 e 3). Cabe também aventar uma possível aplicação para anticorpos anti-TGF $\beta$ , que diminuiriam essa maior propensão à contração. Estudos com SB-431542, um inibidor específico de TGF $\beta$ , consegue diminuir a contração do gel povoado por fibroblastos de quelóides. Essa capacidade de inibição de contração esta associada a supressão que a substancia gera sobre a alfa-actina de músculo liso (42).

Pudemos corroborar nesta proposta que a contração de feridas é um processo complexo, que parece combinar de maneira dinâmica e organizada múltiplos fatores. Nesta “orquestra” de muitos elementos as células, a matriz extracelular, e os mediadores protéicos exercem seus papéis. Devido ao intrincado papel de cada um dos elementos deste processo, muito dificilmente será possível o estudo isolado de cada componente em modelos *in vivo*. Matrizes colágenas povoadas por fibroblastos como as propostas neste estudo talvez sejam por demais incompletas para refletir plenamente a complexidade dos fenômenos envolvidos na

contração de feridas. No entanto, na medida em que permitem modificações ou inclusão de elementos adicionais da “orquestra cicatricial”, poderão esclarecer os verdadeiros papéis de cada “instrumento” e suas inter-relações. Este conhecimento é que nos capacitará para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

## 9. CONCLUSÕES

1. O estabelecimento do modelo em nosso meio permitiu estudo do fenômeno de contração de feridas, além de ser válido para o teste de drogas modificadoras da cicatrização e o estudo de cicatrizes exacerbadas.
2. O estudo comparativo da contração do gel povoado por fibroblastos provenientes de quelóides sofreram contração maior que os povoados por fibroblastos de pele normal e contração semelhante a gerada por fibroblastos de pele normal modificados pelo TGF $\beta$ .

## 10. Referências Bibliografias

1. Clayton IT, *Dicionário Medico Enciclopédico Taber*, 17<sup>o</sup>. Edição, pg. 720, 2000.
2. Morris JP: Wound Healing. In: Oxford Textbook of surgery, cap. 06, 2<sup>a</sup>. Ed, Oxford university press pg. 132, 2001.
3. Radice GP. The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus* larvae. *Dev. Biol* 76:26-46,1980.
4. Dias JLC, Sinhornini IL. Influence of high environmental temperature on inflammation and repair induced by a foreign body in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles. *Braz J Méd Biol Res* 24:583-586, 1991.
5. Arrunategui G, Kamamoto F, Ferreira MC: Resolução tecidual Cap 01 pg 28. In: Tratado de Cirurgia Plástica da USP, Manole ed., *in press*



6. Kumar V: Inflammation and Repair. Chap 03. *In* Cotran:Robbins Pathologic Basis of Disease, pg 51-4 , W B Saunders Company, 6th ed, 1999.
7. Grinnell F, Cell adhesion, *In* Cohen IK, Diegelmann RF, Lindbald WL, editors. *In* Wound Healing: biochemical and clinical aspects, Saunders Company, Philadelphia, 1993,
8. Morris JP: Wound Healing. *In*: Oxford Textbook of surgery, cap. 06, 2<sup>a</sup>. Ed, Oxford university press pg. 137,2001.
9. Cavalheiro filho C, Rached A, Chamone DA, Coagulopatia e Hemoterapia, *In* Pos operatório de cirurgia torácica e cardiovascular cap 07, pg 86 e 87, artmed ed. , 2004
10. Morris JP: Sequence in inflammation. *In*: Wood Oxford Textbook of surgery, cap. 06, 2<sup>a</sup>. Ed, Oxford university press pg. 138, 2001

11. Demouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G, Tissue repair, contraction and the myobibroblast. *Wound Repair Regen*, Jan-Fev. 13(1): 7-12,2005.
12. Chaponnier C, Gabbiani G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *J Pathol* nov, 204(4). 386-95, 2004.
13. Daly JM, Vars HM, Dudrick SJ: Effects of protein depletion on colonic anastomoses, *Surg Gynecol Obstet* 134:15-21,19, 1993
14. Levenson SM, Geever EF: The healing of rat skin wounds, *Ann Surg* 161: 293-308, 1965.
15. Peacock EE, Cohen IK. Wound Healing. *In* Mmacarthy PLastic Surgery, Philadelphia:WB Saunders, cap 5 – Pg 167, 1990.

16. Rudolf R, Vande Berg J, Erlich HP: Wound contraction and scar contracture. In Cohen IK, Diegelmann, editors: *Wound healing: biochemical and clinical aspects*, Philadelphia, WB Saunders, 1993
17. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Ehrlich HP. : Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts and myofibroblasts. *Plast Recons Surg* 102(1): 124-31, jul 1998.
18. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Cell Biology. Proc Natl Acad Sci.*: 76:1274-78, 1979.
19. Watts GT, Grillo HC, Gross J: studies in wound healing II: the role of granulation tissue in contraction. *Ann Surg.* 148: 153,1958
20. Grillo HC, Gross J: studies in wound healing III: Contraction in vitamin C deficiency. *Proc Soc Exp Biol Méd.* 101:268, 1959

21. Abercrombie, M., M. H. Flint, and D. W. James. Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea pigs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 4:167-175, 1956.
22. Van winkle, W: wound contraction. *Surg Gynecol Obstet* 125:131, 1967.
23. Rudolph R: Contraction and the control of contraction. *World J Surg* 4: 279,1980.
24. Walker GA, Guerrero IA, Leinwand LA. Myofibroblasts: molecular crossdressers. *Curr Top Dev Biol* 51: 91-107, 2001.
25. Gabbiani G, Ryan GB, MAjne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia..* May 15; 27(5): 549-50, 1971.

26. Ariyan S, Enriquez R, Krizek TJ. Wound contraction and fibrocontractive disorders. *Arch Surg* 113(9):1034-46, 1978.
27. Rudolph R, Utley JR, Woodward M. Contractile fibroblasts (myofibroblasts) in a painful pacemaker pocket. *Ann Thorac Surg.* Apr 31(4): 373-6 ,1981.
28. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* oct; 14(5): 538-46, 2003
29. Van Beurden HE, Von den Hoff, Torensma R, Kuijpers-Jatman AM. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dent Res.* oct 84 (10): 871-80 , 2005,
30. Hinz B, Gabbiani G. Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost.* 90(6): 993-1002. Dec 2003.

31. Fray TR, molloy JE, Armitage MP, Sparrow JC. Quantification of single human dermal fibroblast contraction. *Tissue eng*, 4(3):281-91, 1998.
  
32. Arora PD, Mc culloch CA. The deletion of transforming factor beta induced myofibroblastss depends on growth conditions and actin organization. *Am J Pathol* 155(6): 2087-99, 1999.
  
33. Schmitt-graff A, Desmouliere A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* 425 (1): 3-24, 1994.
  
34. Nedelec B, Ghahary PG, Tredget EE. Control of wound contraction. Basic and clinical features. *Hand Clin* 16(2): 289-302, 2000.

35. Fukamizu, H., and F. Grinnell. Spatial organization of extracellular matrix and fibroblast activity: Effects of serum, transforming growth factor  $\beta$ , and fibronectin. *Exp. Cell Res.* 190:276-282,1990.
  
36. Guidry, C., and F. Grinnell. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J. Cell Sci.* 79:67-81, 1985.
  
37. Ehrlich, H. P., W. B. Rockwell, T. L. Cornwell, and J. B. M. Rajaratnam. 1991. Demonstration of a direct role for myosin light chain kinase in fibroblast-populated collagen lattice contraction. *J. Cell Physiol.* 146:1-7, 1991,
  
38. Montesano R, Orci L. Transforming growth factor  $\beta$  stimulates collagen matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4894-97, 1988.

39. Ronnov-Jessen, L., and O. W. Petersen. Induction of  $\alpha$ -smooth muscle actin by transforming growth factor-E1 in quiescent human breast gland fibroblasts. *Lab. Invest.* 68:696-707, 1993.
  
40. Zhu YK, Umino T, Liu XD, Rennard SI. Contraction of fibroblast containing collagen gels: initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 37(1):10-16, 2001.
  
41. Ramtani S. Mechanical modelling of cell/cell interactions during the contraction of a fibroblast-populated collagen microsphere: theory and model simulation. *J Biomech* nov 37(11): 1709-18, 2004.
  
42. Bellows, C. G., A. H. Melcher, and J. E. Aubin. Association between tension and orientation of periodontal ligament fibroblasts and exogenous collagen fibres in collagen gels in vitro. *J. Cell Sci.* 58:125-138, 1982.



43. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., de Crombrughe, B. Some recent advances in the chemistry and biology of TGF $\beta$ . *J. Cell Biol.* 105, 1039-1045, 1987.

44. Sporn, M. B., Roberts, A. B., Shull, J. H., Smith, J. M. & Ward, J. M. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219, 1329-1331, 1983.

45. Roberts, AB, Sporn, MB, Assoian, RK, Smith, JM, Roche, NS, Wakefield, LM, Heine, UI, Liotta, LA, Falanga, V, Kehrl, J. H., Fauci, AS. Transforming growth factors type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4167-4171, 1986.

46. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A., Gramates, P., Sporn, M. B. & Deuel, T. F. Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by TGF $\beta$ . *Science* 237, 1333-1336, 1987.

47. Wahl, SM, Hunt, DA, Wakefield, LM. McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B. & Sporn, MB. TGF $\beta$  induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5788-5792, 1987.
48. Postlethwaite, AE, Keski-Oja, J, Moses, H. L. & Kang, AH. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by TGF $\beta$ . *J. Exp. Med.* 165, 251-256, 1987.
49. Lee, T. Y., Chin, G. S., Kim, W., et al. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. *Ann. Plast. Surg.* 43: 179, 1999.
50. Montesano, R., and L. Orci. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: Implications for wound healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:4894-4897, 1988.

51. Younai, S., Nichter, L. S., Wellisz, T., et al. Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts. *Ann. Plast. Surg.* 33: 148, 1994.
  
52. Peltonen, J., Hsiao, L. L., Jaakkola, S., et al. Activation of collagen gene expression in keloids: Co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA. *J. Invest. Dermatol.* 97: 240, 1991.
  
53. Babu, M., Diegelmann, R., and Oliver, N. Fibronectin is overproduced by keloid fibroblasts during abnormal wound healing. *Mol. Cell Biol.* 9: 1642, 1989.
  
54. Desmouliere, A., Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. Transforming growth factor beta- 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in

quiescent and growing cultured fibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122:103-111, 1993.

55. Gentilhomme E, Neveux Y, Lebeau J, Desmolieres A. Modulation of a fibrotic process induced by transforming growth factor beta-1 in dermal equivalents. *Cell Biol Toxicol.* 199; 15(4): 229-38.

56. Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound healing modulators. *Artificial Organs* 27(8):701-05, 2003.

57. Hasegawa T, Nakao A, Sumiyoshi K, Ogawa H. SB431542 inhibits TGF $\beta$  - induced contraction of collagen gel by normal and keloid fibroblasts. *J Dermatol Sci*; 39(1):33-8, 2005.

58. Montesano R, Orci L. Implications for Wound Healing Transforming Growth Factor  $\beta$  Stimulates Collagen-Matrix Contraction by Fibroblasts: *Proc. Natd. Acad. Sci. USA*. Vol. 85, pp. 4894-4897, July 1988
59. Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Raines, E. W., Ross, R., Sporn, M. B. Expression and secretion of type beta growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6020-6024., 1987.
60. Finesmith TH, Brodley KN, Davidson JM. Fibroblasts from wounds of different stages of repair vary in their hability to contract a collagen gel in response to growth factors. *J Cell Physiol*, 144:99, 1990.