

BERNARDO HOCHMAN

**FIBRAS NERVOSAS E MELANÓCITOS
NO QUELÓIDE: ESTUDO MORFOMÉTRICO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2005

BERNARDO HOCHMAN

**FIBRAS NERVOSAS E MELANÓCITOS
NO QUELÓIDE: ESTUDO MORFOMÉTRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo - Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

ORIENTADORA: Prof^{sa} Dr^a LYDIA MASA KO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. FÁBIO XERFAN NAHAS

Prof. Dr. VICTOR EDUARDO ARRUA ARIAS

Prof^{sa} Dr^a CHRISTIANE STEPONAVICIUS SOBRAL

SÃO PAULO

2005

Hochman, Bernardo.

Fibras nervosas e melanócitos no quelóide: estudo morfométrico / Bernardo

Hochman. -- São Paulo, 2005.

xxiii, 122f.

Tese Doutorado - Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica.

Nerve fibers and melanocytes in keloid: a morphometric study

1. Quelóide. 2. Fibras nervosas. 3. Melanócitos. 4. Monofenol Mono-Oxigenase. 5. Cicatriz hipertrófica.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
PLÁSTICA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

COORDENADORA

Prof^{fa} Dr^a LYDIA MASAKO FERREIRA

Dedicatórias

Ao meu Papito Abraham (in memoriam), meu querido, meu velho, meu amigo. Sei que você está ouvindo sobre a inervação do quelóide. Sei também que você não deve estar entendendo muita coisa a respeito. Mas sabe muito bem da falta e da saudade que sinto de você. E quero que saiba, que se hoje estou aqui, foi por todos os seus sacrifícios pessoais para isso, e pelo seu exemplo de honestidade e coerência com os próprios princípios. Te amo, valeu e obrigado por tudo.

Mi querida Mamita Elena, sós el ejemplo de abnegación y dedicación a las personas que se ama, y Diós me propició la bendición que yo sea una de esas personas. Decirte muchas gracias por todo lo que hás luchado, y te hás sacrificado, para que yo haya aquí llegado, és insuficiente. Pero queiro decirte que sós la mejor mamita del mundo, que no tengo condiciones de retribuirte por todo, y que te amo demás.

À Silvia, minha querida esposa e companheira, dedico este momento a você. É comum a uma pessoa, ao amadurecer, que isso aconteça, concomitantemente, em mais de um setor da sua vida. Assim sendo, tive mais essa benção, em atingir a maioria científica com a maioria do meu sentimento de amor a você. A sua constante ajuda e participação na minha vida, além da sua sublimação a períodos de lazer, foi indispensável para que este momento ocorra.

Aos meus filhos David, Rebeca, Gabriel, e Victor, e às minhas filhas Érica e Maiara, dedico este momento da minha vida. Agradeço a compreensão por todos os momentos que não pude, de forma direta, compartilhar com vocês, conversando, passeando ou brincando. Peço a Deus que vocês possam, em tempo breve, seguir os mandamentos da suas almas, no caminho que cada um seguir, e possam sentir o que estou sentindo. Por isso, repito que os exemplos sempre são mais fortes que os preceitos. Contem sempre comigo. Amo vocês.

A Anita, minha querida irmã do coração, você é uma pessoa especial para mim. Saiba que você muito tem me ajudado a chegar aqui. Por isso, afirmo que tenho outra benção, de ter uma “irmã-amiga”. Que toda a inspiração que você tem me dado, que eu possa te retribuir da maneira que te faça mais feliz. Obrigado por tudo. Te amo.

A todos meus queridos avós Josef, Golda, Samuel e Faiga, (in memoriam), saibam que a herança cultural e de valores morais deixada por vocês, além de todo o carinho que me deram, também são responsáveis por ter chegado nesta etapa de realização da minha vida.

Meu querido tio Simon (in memoriam), também quero te dedicar este momento. Já que desta vez não deu para você assistir aí da cadeira, assiste a continuação do mestrado, daí, sabendo que nunca te esquecerei.

Amo todos vocês. Por favor, continuem inspirando e zelando por nós.

A Deus,, valeu !!!

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora **Lydia Masako Ferreira**, Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo — Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM). Quero que saiba que o Supremo Governante e Professor Deus envia, entre nós, alguns ministros. Dentre as funções dos mesmos, além da liderança, inclui ensinar os outros a se governarem por si mesmos, procurar o caminho para encontrar a própria vocação e, assim, a realização pessoal. Também possuem a função de resgatar, para voltar a esse caminho, aqueles que se desviaram. Ensinam também a importância da gratidão e da ajuda ao próximo. Se, por acaso, um desses ministros vier a exercer a Medicina, afortunados serão aqueles colegas que puderem conviver e aprender com ele. E, se um desses ministros, além de médico, se dedicar também à pesquisa na área da saúde, abençoados serão os pesquisadores que tiverem sua iniciação e orientação com o mesmo. Também serão agraciados os alunos e residentes iniciados, liderados e orientados por esse ministro e, obviamente, a Disciplina, a Residência e a Pós-Graduação serão considerados centros de excelência e referência, nacional e internacional. Por mecanismos naturais, portanto, esse ministro receberá sucessivas e justas homenagens. Posso dizer hoje que sou grato, pois fui premiado com todas essas bênçãos, pela minha passagem pela graduação médica, residência e pós-graduação. Também sou imensamente grato por ter me resgatado para seguir meu caminho. Por isso, agradeço a Deus e a uma de suas melhores ministras, chamada Lydia Masako Ferreira, o sentimento de realização pessoal que estou sentindo, e o reencontro com minha vocação e paz interior.

Ao Professor **Fabio Xerfan Nahas**, Doutor e Professor Adjunto Visitante da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço não somente pela brilhante co-orientação durante a realização desta pesquisa, mas também pelos ótimos aconselhamentos acadêmicos, profissionais e pessoais, dados durante todo o tempo do convívio. Sou grato, também, por todo o prestígio, confiança e amizade depositados.

Ao Professor **Victor Eduardo Arrua Arias**, Doutor em Ciências na área de Oncologia, pesquisador do Laboratório de Investigação Médica nº 26 da Disciplina de Técnica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia da Universidade de São Paulo, agradeço por toda a co-orientação durante a fase de planejamento e preparo histológico das amostras, bem como durante a interpretação de resultados, numa área que não tinha familiaridade. Aprendi muito sobre a imuno-histoquímica, desde a grafia etimológica, até a riqueza de recursos que propicia para investigar o sistema nervoso cutâneo. Porém, aprendi muito mais ainda, como confiar nas pessoas e propiciar-lhes uma sincera amizade.

À Professora **Christiane Steponavicius Sobral**, Doutora e Professora colaboradora na Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço por todas as sugestões durante a co-orientação deste estudo, e pela iniciativa de procurar na literatura mais subsídios para fortalecê-lo, sentindo-me honrado com seu espontâneo espírito de coleguismo e amizade.

Aos **Docentes** da Disciplina de Cirurgia Plástica e do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço pela transmissão do seu conhecimento na área da pesquisa, que muito embasou minha formação, e por suas críticas científicas que contribuíram para lapidar este estudo.

À Professora Doutora **Yára Juliano**, Professora Titular da Disciplina de Saúde Coletiva da Universidade de Santo Amaro (UNISA), agradeço por toda sua parceria na estruturação e orientação na análise estatística deste estudo.

Ao acadêmico **Rafael Fagionato Locali**, aluno do 3º ano do Curso de Graduação em Medicina da UNIFESP-EPM, agradeço pela sua colaboração e apoio incondicional, que foi muito importante no embasamento deste estudo, e tenha certeza, também, da minha genuína admiração pela sua capacidade profissional e potencial como médico e pesquisador.

Ao acadêmico **Leonardo Quicoli Rosa de Oliveira**, aluno do 3º ano do Curso de Graduação em Medicina da UNIFESP-EPM, agradeço por toda a ajuda e pelo tempo investido, mas que foi muito importante para o a elaboração do planejamento deste estudo.

À enfermeira **Leila Blanes**, Doutora em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, e estomaterapeuta do Hospital São Paulo, meu agradecimento por toda a cooperação neste estudo, durante sua execução, e pelo incentivo contínuo à minha causa “antiquelóide”, desde que iniciamos, simultaneamente, a pós-graduação. Obrigado por sua amizade e pelo seu exemplo acadêmico e pessoal de garra e humildade.

Às fisioterapeutas, **Graziela Chacon** e **Débora de Miranda Henriques**, colegas no Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, meu agradecimento pelo valioso auxílio na execução do protocolo de pesquisa deste estudo.

A todos os colegas **Pós-Graduandos** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço pelo auxílio e amizade, o que muito facilitou a concretização deste estudo.

Ao residente **Mathias Weinstock**, da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço pela solidariedade em dispensar-me seu tempo, fora do seu horário regular, apesar de escasso, para a tradução de trabalhos científicos.

A todos os **Residentes** da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço por toda a ajuda que me deram, principalmente na fase de recrutamento e operação dos pacientes. Pude ensinar-lhes bastante sobre técnica operatória e cicatrização, mas aprendi muito com todos eles, principalmente sobre solidariedade, respeito e gratidão.

À técnica de Enfermagem **Elena Rodrigues da Silva**, da Casa da Cirurgia Plástica, minha gratidão pela inestimável ajuda em recrutar pacientes, auxílio direto durante as intervenções cirúrgicas e agendar as sessões de beta-terapia, dar carinho às pacientes no pós-operatório e organização dos laudos histopatológicos.

À enfermeira **Célia Soares Bittencourt**, aos auxiliares de enfermagem **Clispim Valladares do Nascimento**, **Clarice Gomes Pereira** e **Ivone Dias do Amaral**, e à assistente administrativa **Claudete Oliveira Silva**, todos integrantes da Casa da Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, agradeço por toda ajuda e amizade que me foi dada durante a fase de recrutamento de pacientes no pós-operatório.

Às assistentes administrativas **Sandra Regina da Costa** e **Bernadete Costa Santos**, do serviço de Radioterapia do Hospital São Paulo, minha gratidão pela

colaboração na marcação das sessões de beta-terapia pós-operatória, o que ajudou, significativamente, no andamento do estudo na fase de coleta das lesões.

Às secretárias da Cirurgia Plástica **Sandra da Silva, Marta Rejane dos Reis Silva** e **Silvana Aparecida de Assis**, meu muito obrigado pelo carinho e ajuda constantes, sempre disponíveis e com um sorriso, por mais atarefadas que estivessem.

Às bibliotecárias **Andréa Cristina Feitosa do Carmo** e **Isabel Bueno Santos Menezes**, da Biblioteca Central (BIREME), meu agradecimento pelo inestimável auxílio nas atualizações da revisão sistemática da literatura e das normas bibliotécnicas.

Aos bibliotecários **Rosely de Fátima Pellizzon, Tereza Avalos, Reinaldo Ramos de Carvalho** e **Alexandra Godoe Rosa**, da Biblioteca Central (BIREME), meu agradecimento pelo minucioso auxílio na localização e captura de periódicos não disponíveis nessa biblioteca, e pela contribuição em revisões bibliográficas.

Ao analista de sistemas, **Wilson Roberto Cavalheiro**, pertencente à Disciplina de Bioestatística do Departamento de Medicina Preventiva da UNIFESP-EPM, agradeço pelo apoio na diagramação dos resultados estatísticos deste estudo.

À produtora editorial, **Alexandra Costa da Fonseca**, minha gratidão pela importante tarefa de fazer a revisão ortográfica e gramatical da língua portuguesa desta dissertação.

À Bacharel em Letras, **Déa Naya Nogueira**, meu agradecimento por ter revisado e ajudado na elaboração da dissertação, e pela amizade oferecida. A **Andrea Nogueira Senise**, agradeço pelo auxílio na diagramação gráfica.

Ao Professor Doutor **Flávio Paulo de Faria**, Professor do Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP-EPM, e à Professora Doutora **Edna Haapalainen**, Chefe do CEME, meu agradecimento pela participação durante a fase de planejamento deste estudo.

Ao Professor Doutor **Antonio José Bucalon**, Professor de Bioengenharia do Departamento de Física da faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (*Campus* Rio Claro - SP), pelo assessoramento em bioeletricidade nas etapas iniciais deste estudo, e pela espontânea amizade.

À empresa **Bioset[®] - Indústria de Equipamentos Eletrônicos em Eletro-Medicina**, de Rio Claro (SP), meu agradecimento a todos os integrantes da diretoria, além dos funcionários, pela disponibilidade oferecida no início do estudo.

À fisioterapeuta **Margarete Feres**, Professora Supervisora na Faculdade Anhembi-Morumbi (zona leste - SP), agradeço o apoio logístico em eletrocondutividade cutânea na fase inicial deste estudo, e pela amizade sincera que se consolidou..

Ao Professor **Sergio Cides**, Químico e Professor nos Cursos de Pós-Graduação da Fundação Getúlio Vargas e da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, meu agradecimento pelo assessoramento na língua inglesa.

A **Fernando Di Gangi**, Diretor Comercial da Medgen[®] - Comércio e Importação, agradeço pelo seu empenho em conseguir reagentes imuno-histoquímicos.

A **Alexsandra Ribeiro Ferreira**, técnica de Enfermagem e minha auxiliar de trabalho, minha gratidão pelo inestimável auxílio na supervisão das amostras, e interação com o laboratório durante a fase de processamento das lâminas.

Às **secretárias** do Laboratório de Patologia Cardoso de Almeida, meu agradecimento por sempre terem me auxiliado, fazendo-me sentir "em casa".

Minha gratidão aos **pacientes portadores de quelóide**, que participaram deste estudo, ou não, pela esperança e confiança depositada em nós.

*“Assim como a Hidra dos gregos, tal é o quelóide,
que cria duas cabeças cada vez que uma é extirpada”.*

Jean Louis Alibert ¹

*“As doenças, assim como esses quelóides,
apesar do seu aspecto destrutivo,
são como o Shiva dançante,
com a clava, a espada e o tambor em suas várias mãos,
mas com uma mão estendida para a frente
em um gesto que diz: não tenha medo”.*

Donald Sandner ²

*“Explorar um sintoma corporal é entrar nele,
assim como ele entrou em nós,
e tomar parte dele em um mistério sagrado.
É com grande respeito e humildade
que aceitamos essa tarefa”.*

Rose-Emily Rothenberg ³

¹ Responsável pela primeira descrição científica do quelóide, em 1806.

² Sandner D. Proceedings of the 1985 California Spring Conference of Jungian Analysts and Control Candidates. San Francisco: C. G. Jung Institute of San Francisco; 1985. p.207-10.

³ Rothenberg R-E. A jóia na ferida. São Paulo: Paulus; 2004. p.19-25.

“A ciência sem a religião é manca.

E a religião sem a ciência é cega”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	9
3. LITERATURA	11
3.1. Quelóide e fibras nervosas	11
3.2. Quelóide e melanócitos	13
3.3. Inervação em cicatrizes hipertróficas	14
3.4. Recolonização melanocítica cicatricial	18
4. MÉTODOS	21
4.1. Casuística	21
4.2. Obtenção das amostras de tecido	23
4.3. Preparo das lâminas para exame histológico	26
4.3.1. Coloração por hematoxilina-eosina	26
4.3.2. Reação imuno-histoquímica para proteína S-100	26
4.3.3. Reação imuno-histoquímica para tirosinase	27
4.4. Mensurações	28
4.4.1. Digitalização fotográfica das lâminas	28
4.4.2. Fotomicrografia das lâminas	29
4.4.3. Quantificação das fibras nervosas, melanócitos e tirosinase	30
4.5. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	43
6.1. Sobre o projeto do estudo	43
6.1.1. Relevância da pesquisa de fibras nervosas	43
6.1.1.1. Inter-relação anatômica e eletrofisiológica da inervação cutânea na cicatrização	43
6.1.1.2. Inter-relação da inervação cutânea com a cicatriz hipertrófica	46

6.1.2. Relevância da pesquisa de melanócitos	46
6.1.2.1. Inter-relação dos melanócitos com a rede nervosa cutânea ...	46
6.1.2.2. Inter-relação dos melanócitos com o quelóide	48
6.1.3. Relevância da pesquisa de tirosinase	49
6.2. Sobre os métodos...	49
6.2.1. Desenho da pesquisa.....	49
6.2.2. Casuística.....	50
6.2.2.1. Diagnóstico histopatológico “quelóide <i>versus</i> cicatriz hipertrófica”	52
6.2.3. Metodização da fotomicrogrametria	56
6.3. Sobre os resultados...	57
6.3.1. Fibras nervosas no quelóide	57
6.3.1.1. Quantificação	57
6.3.1.2. Profundidade das fibras nervosas	61
6.3.2. Melanócitos	64
6.3.2.1. Quantificação celular	64
6.3.2.2. Quantificação da tirosinase	66
6.3.3. Fibras nervosas e melanócitos <i>versus</i> tempo de evolução das lesões...	68
6.4. Perspectivas.....	70
6.4.1. Unificação nosológica do quelóide e da cicatriz hipertrófica	70
6.4.2. Investigação da participação das fibras nervosas no quelóide.....	72
6.4.3. Investigação da participação do fator melanocítico no quelóide	74
6.4.4. Investigação da epiderme no quelóide.....	76
6.4.4.1. Investigação das fibras nervosas no epitélio do quelóide.....	77
6.4.5. Investigação neural em cicatrizes hipertróficas pós-queimadura.....	78
6.5. Considerações finais...	79
7. CONCLUSÕES.....	82
8. REFERÊNCIAS	84
NORMAS E FONTES CONSULTADAS	96
APÊNDICES	99
ANEXOS	117

RESUMO

Introdução: A patogênese do quelóide é desconhecida. Apesar da inervação cutânea participar da cicatrização, existe uma lacuna na literatura relativa ao sistema nervoso cutâneo no quelóide. **Objetivo:** Quantificar fibras nervosas e melanócitos no quelóide, bem como avaliar a atividade melanogênica. **Métodos:** Compararam-se amostras de quelóide e de pele adjacente da região torácica de 27 pacientes não-brancas. As fibras nervosas e os melanócitos foram corados por imuno-histoquímica, pela reação à proteína S-100. A quantificação das fibras nervosas dérmicas, e das células melanocíticas epiteliais, foi realizada por contagem direta em cada tecido. A profundidade da fibra nervosa mais superficial, em relação à camada granulosa, foi mensurada por régua histológica. Os dados obtidos também foram analisados em função do tempo de evolução das lesões. A atividade melanogênica foi quantificada mediante reação imuno-histoquímica, por anticorpo anti-tirosinase. **Resultados:** As amostras de quelóide apresentaram quantidade maior de fibras nervosas ($p < 0,001$), em comparação com o tecido cutâneo adjacente à lesão. A fibra nervosa mais superficial no quelóide estava a uma profundidade maior que na pele ($p < 0,001$). A quantidade de melanócitos nas amostras de quelóide foi menor em relação às de pele ($p < 0,001$), da mesma forma quanto à tirosinase ($p < 0,001$). Com o tempo evolutivo das lesões, não houve associação estatística dos resultados das fibras nervosas e melanócitos. **Conclusão:** O quelóide apresenta maior quantidade de fibras nervosas dérmicas e numa profundidade maior em relação à pele. A quantidade de melanócitos e de tirosinase é menor no quelóide que na pele.

ABSTRACT

Background: Keloid pathogenesis is still unknown. In spite of the cutaneous innervation taking part of scarring, there is a gap in the literature on cutaneous nervous system in keloid. **Purpose:** To quantify both nerve fibers and melanocytes in keloid, as well as to evaluate the melanogenic activity. **Methods:** Both keloid and adjacent skin specimens from the chest region of 27 non-white subjects were compared. Nerve fibers and melanocytes underwent immunohistochemical dyeing by S-100 protein reaction. The quantification of dermal nerve fibers and epithelial melanocytic cells was carried out by direct counting of each tissue. Depth of the most superficial nervous fiber, when compared to the granular layer was measured through a histological meter. Data obtained were also analyzed as a function of the lesions development time. Melanogenic activity was quantified through immunohistochemical reaction by anti-tyrosinase antibody. **Results:** Keloid specimens showed a higher quantity of nerve fibers ($p<0.001$) when compared to lesion-adjacent cutaneous tissues. Keloid most superficial nervous fiber was deeper than the ones of the skin ($p<0.001$). The amount of melanocytes in the keloid specimens was lower than the amount in the skin ($p<0.001$), as well as tyrosinase ($p<0.001$). Statistically significant association with lesions development time of nerve fibers and melanocytes results was not found. **Conclusion:** Keloid presents a higher quantity of dermal nerve fibers which are most deeply located than they occur in the skin. Melanocytes and tyrosinase amounts are lower in keloid than in the skin.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A patogênese do quelóide ainda não está esclarecida, por isso, os tratamentos atuais geralmente possuem caráter apenas preventivo ou paliativo (FERREIRA, 1995; NIESSEN *et al.*, 1999). Mesmo compreendendo-se alguns mecanismos acerca dos fatores biológicos do quelóide *in vitro* (KEIRA, 2003; KEIRA *et al.*, 2004a), ainda não se sabe o bastante sobre as ações desses fatores *in vivo*. Essa dificuldade reside no fato de o quelóide ocorrer exclusivamente em humanos (PLACIK & LEWIS, 1992; O'SULLIVAN *et al.*, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999). Tal exclusividade tem dificultado a pesquisa experimental em modelos animais sob condições de imunidade similares às do ser humano (FERREIRA & FERREIRA, 2003). A maioria das pesquisas a respeito, envolvendo fibroblastos e queratinócitos, são descritas em animais imunodeprimidos (GRAGNANI *et al.*, 2004; CAMPANER, 2005).

A integração do enxerto heterólogo de quelóide, validando-o como modelo experimental de investigação, foi descrita no *hamster* sírio-dourado (*Mesocricetus auratus*), animal com sistema imune normal (HOCHMAN, 2002; HOCHMAN *et al.*, 2003a; 2004a; 2004b; 2005b). Esse fato ocorreu, mais especificamente, no subepitélio da bolsa jugal, que é um consagrado local de privilégio imunológico. Tal particularidade deve-se à ausência de um

reconhecimento antigênico linfático aferente nesse local (HALLER & BILLINGHAM, 1967; HOCHMAN *et al.*, 2003b). Porém, esse estudo descritivo revelou, pela primeira vez, melanócitos com pigmento melânico no fragmento de quelóide enxertado, fato que chamou a atenção, uma vez que estudos descritivos demonstraram que a melanina está totalmente ausente ou presente apenas em quantidades ínfimas no quelóide (DATUBO-BROWN, 1990; PLACIK & LEWIS, 1992; O’SULLIVAN *et al.*, 1996). Ademais, o *hamster* sírio-dourado não possui esse pigmento na bolsa jugal (HALLER & BILLINGHAM, 1967). Embora não tenha sido possível explicar esse fenômeno ocorrido no fragmento de quelóide enxertado, provavelmente o melanócito produtor de melanina estava incluído na amostra obtida da lesão original.

Essa constatação, entretanto, projetou uma perspectiva à procura da patogenia desse distúrbio. Melanócitos são células epidérmicas oriundas de melanoblastos que migraram a partir da crista neural (JIMBOW *et al.*, 1976; SLOMINSKI *et al.* 1993). Em conjunto com as fibras nervosas dermoepidérmicas, constituem o denominado “sistema nervoso cutâneo” ou “sistema neurosensorial cutâneo” (TOYODA *et al.*, 1999; LUGER, 2002). Nesse sistema existe uma íntima conexão física dos terminais axônicos intra-epidérmicos com melanócitos epidérmicos em humanos. Esse sistema nervoso cutâneo, além de possuir atividades primárias sobre a pele, como participação na inflamação, imunidade, regulação funcional dos anexos cutâneos,

termorregulação e modulação na homeostase, também participa da cicatrização (SLOMINSKI *et al.*, 1993; BESNÉ *et al.*, 2002; LIANG *et al.*, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2004). Em relação ao quelóide, enquanto fatores genéticos ainda são estabelecidos (CHEN *et al.*, 2003), fatores metabólicos, endócrinos, vasculares e imunológicos foram e continuam sendo pesquisados (ROCKWELL *et al.*, 1989; DUSTAN, 1995; RAHBAN & GARNER, 2003). Porém, não há na literatura pesquisas relacionando possíveis fatores neurogênicos na formação do quelóide.

Contudo, conforme será exposto, há evidências na literatura da associação entre quelóide a fatores neurais, representados pelas terminações nervosas cutâneas, e os melanócitos. Em relação à participação dessas terminações, os primeiros indícios foram relativos às cicatrizes hipertróficas, que gradativamente são consideradas uma expressão fenotípica de menor intensidade das cicatrizes queiloideais (CRAIG *et al.*, 1975; CANARY *et al.*, 1990; DATUBO-BROWN, 1990; MUIR, 1990; PLACIK & LEWIS, 1992; McGROUTHER, 1994; REIS, 1994; BERMAN & BIELEY, 1996; O'SULLIVAN *et al.*, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999; RAHBAN & GARNER, 2003; HOCHMAN *et al.*, 2004c; 2004d).

Demonstrou-se que cicatrizes hipertróficas possuem uma maior densidade de fibras nervosas que cicatrizes normais (normotróficas), à custa de terminações sensitivas nociceptoras (PARKHOUSE *et al.*, 1992; CROWE *et al.*, 1994). Também se constatou que a cicatriz hipertrófica é permeada por um número

maior de ramos axônicos em relação à cicatriz normotrófica (ZHANG & LAATO, 2001). Ainda, em pesquisa experimental em modelo suíno, validado para o estudo de cicatrizes hipertróficas (LIANG *et al.*, 2004), verificou-se a existência, em relação à pele, de uma maior quantidade de terminações nervosas nessas cicatrizes.

As fibras nervosas sensoriais tipo C e tipo A- δ (amielinizadas ou quase desmielinizadas, respectivamente) também são mediadoras primárias do processo cicatricial da pele, por meio de correntes bioelétricas geradas (KITCHEN & BAZIN, 1996; BESNÉ *et al.*, 2002). Alterações disfuncionais dessa corrente podem alterar a reparação tecidual (ALVAREZ *et al.*, 1983; KANDEL *et al.*, 2000; LIEBANO *et al.*, 2003). E, em relação ao quelóide, descreveu-se que, sob determinadas condições de estimulação elétrica, cicatrizes hipertróficas e queiloideais apresentaram uma regressão no crescimento (WEISS *et al.*, 1989; WEISS *et al.*, 1990).

Em relação ao outro componente neural cutâneo, o melanócito, sabe-se que cicatrizes normotróficas possuem essas células em quantidades similares à pele normal circunjacente (DUVE *et al.*, 1996; DRESSLER *et al.*, 2001; VELANGI & REES, 2001), em detrimento da escassez de melanina nas cicatrizes queiloideais (DATUBO-BROWN, 1990; PLACIK & LEWIS, 1992; O'SULLIVAN *et al.*, 1996). Tal diferença torna-se mais relevante à medida que o quelóide caracteriza-se por ser uma disfunção globalmente hiperproliferativa,

com hiperplasia fibroblástica, aumento da quantidade de matriz extracelular, da rede vascular, dos fatores de crescimento e do consumo energético (UEDA *et al.*, 1999; TREDGET *et al.*, 1997). Portanto, a escassez melanocítica transcorreria em sentido oposto ao contexto intrínseco hiperproliferativo e hipersecretor do quelóide.

Entretanto, o quelóide está, sob um prisma epidemiológico, vinculado à presença dos melanócitos, da melanina ou do Hormônio alfa-Estimulante dos Melanócitos (*alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone*, alfa-MSH) (ROCKWELL *et al.*, 1989; O'SULLIVAN *et al.*, 1996). Essa lesão é mais freqüente em pessoas não-brancas, destacadamente em negróides e mongolóides (RAMAKRISHNAN *et al.*, 1974; FERREIRA, 1995; BERMAN & BIELEY, 1996). Também é descrito como sendo mais comum em áreas corporais com maior concentração de melanócitos (ROCKWELL *et al.*, 1989), exceto onde existem inserções musculares dérmicas, como em pálpebras, nas placas aréolo-papilares e no escroto (CANARY *et al.*, 1990; O'SULLIVAN *et al.*, 1996).

Em contrapartida, áreas pouco pigmentadas são raramente locais de quelóide. Essas lesões são quase inexistentes na planta do pé e na palma da mão, mesmo em pessoas portadoras de cicatrizes queiloideais, apesar de esses locais estarem constantemente sujeitos a atritos e ferimentos (DATUBO-BROWN, 1990; REIS, 1994). A literatura ainda não descreveu o quelóide em pessoas portadoras de albinismo (MORGAN *et al.*, 1975), doença causada pela falta

congenita da tirosinase, principal enzima responsável pela melanogênese (TOYODA *et al.*, 1999; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Outro fator pigmentante cutâneo é a histamina, que se encontra aumentada no quelóide (KIKUCHI *et al.*, 1995). A radiação ultravioleta B (UV-B) aumenta o nível de alfa-MSH e induz, dose-dependente, a liberação de histamina de mastócitos cutâneos humanos (GRÜTZKAU *et al.*, 2000). Em cultura de células, a histamina aumenta a atividade da tirosinase nos melanócitos; *in vivo*, liberações prolongadas e abundantes de histamina induziriam a pigmentação cutânea via receptores H₂ dos melanócitos (SLOMINSKI & WORTSMAN, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2002). Assim, apesar de o tecido queiloideal possuir elevados teores de histamina, apresenta-se amelanótico, reforçando, dessa forma, a disparidade existente quanto ao melanócito no quelóide.

Existe uma lacuna na literatura científica sobre o envolvimento do sistema nervoso cutâneo com o quelóide, portanto, a inter-relação direta do quelóide com terminações nervosas, embasada na correlação com cicatrizes hipertróficas e na inter-relação inversa do quelóide com melanogênese, torna necessário um esclarecimento sobre o envolvimento desses componentes neurais na patogenia desse distúrbio cicatricial.

Objetivo

2. OBJETIVO

Investigar fibras nervosas e melanócitos no quelóide.

Literatura

3. LITERATURA

A revisão sistemática da literatura, conforme as estratégias de busca utilizadas (Apêndice 1), foi distribuída em artigos de primeira linha e de segunda linha. Os artigos de primeira linha foram agrupados em “Quelóide e fibras nervosas” (subcapítulo 3.1.) e “Quelóide e melanócitos” (subcapítulo 3.2.). Os artigos de segunda linha foram agrupados em “Cicatrices hipertróficas e fibras nervosas” (subcapítulo 3.3.) e “Melanogênese cicatricial” (subcapítulo 3.4.).

3.1. Quelóide e fibras nervosas

KADANOFF (1969) publicou um relato de três casos, onde investigou o processo de inervação das cicatrizes queiloideais. As lesões de três pacientes adultas foram resultantes de queimadura. As duas primeiras apresentavam lesões no dorso do pé; uma com idade de 27 anos e com tempo de evolução do quelóide de 8 meses, e a outra com 53 anos de idade e portadora de uma lesão com duração de 10,5 meses (paciente “8m” e “10,5m”, respectivamente). A terceira, com idade de 43 anos, apresentava lesão no dorso, com 44 meses de evolução (paciente “44m”). Em relação aos exames histológicos, as lâminas foram coradas pela técnica de impregnação pela prata. Nos três casos confirmou-se a arquitetura

microscópica típica de quelóide. Nas lesões das pacientes 8m e 10,5m, o tecido queiloideal possuía poucas fibras nervosas, estando praticamente ausentes na região central. As fibras que penetravam no quelóide cursavam acompanhando o trajeto de vasos sanguíneos, a partir do tecido conjuntivo normal lateral e profundo à lesão, onde havia um agrupamento maior de fibras nervosas. No quelóide da paciente 8m algumas fibras dirigiam-se diretamente ao epitélio, a partir de confluências laterais à lesão, fato que não ocorreu no quelóide da paciente 10,5m. Na paciente 44m o autor observou uma maior quantidade de fibras nervosas intralesionais. Segundo o autor, a presença de uma maior quantidade de fibras nervosas, no quelóide mais antigo, comprovaria o fato que esse tecido, apesar da intensa compactação, poderia receber a inervação. O autor afirmou que a inervação de cicatrizes normotróficas seria mais abundante que nas cicatrizes queiloideais, apesar do incipiente estágio desse tipo de investigação à época.

LEE et al. (2004) estudaram o estado funcional das fibras nervosas no quelóide, avaliando a alodínia (dor a estímulos táteis leves), a aloquinesse (sensibilidade ao prurido) e a termorrecepção. A partir de estímulos inócuos que, normalmente, não provocariam dor ou prurido, realizaram testes nas lesões queiloideais, na pele periqueiloideal e na pele da região contralateral, como controle. Nesse estudo autocontrolado foram utilizados 28 pacientes, numa faixa etária entre 18 e 55 anos, e não eram portadores de neuropatias ou neuralgias

atuais ou pregressas, assim como não tinham histórico de alcoolismo. Os pacientes foram orientados a informar o momento em que pudessem estar sentindo dor ou prurido, por meio de finos filamentos de escova, pressionados suavemente, a partir de uma distância de 8 cm na pele periqueloideal até o centro do quelóide. Também responderam sobre a intensidade dos sintomas, utilizando uma escala analógica em sentido crescente, com valores de zero a dez. Obtiveram como resultados que, no quelóide, 86% dos pacientes referiram prurido e 46% dor. Dos pacientes que referiram prurido, 92% relataram-no na margem do quelóide, e daqueles que referiram dor, 77% a localizaram no setor central do quelóide. O limiar de termorrecepção, testado por meio de termoeletrodos, foi anormal ao calor e frio nas lesões queloideais. Os autores concluíram que as alterações sensitivas no quelóide seriam conseqüentes a uma neuropatia funcional das fibras nervosas cutâneas.

3.2. Quelóide e melanócitos

RONNEN et al. (1986) relataram o caso de uma paciente com 19 anos que, durante cerca de dez anos, apresentou um quelóide em coxa direita sem alterações clínicas. Após dez dias de uma injeção intralesional com 1 ml de acetinado de triamcinolona a 1%, surgiu na cicatriz queloideal uma área achatada, pigmentada e de formato irregular, com 0,75 cm em seu maior eixo. Na

biópsia excisional realizada observou-se células névicas intra-epidérmicas, variando em tamanho e forma, e apresentando alguns melanócitos atípicos com núcleo aumentado e hipercromático. O diagnóstico laboratorial foi de “pseudomelanoma”.

BORCK & NAGEL (1997) publicaram um caso de um cidadão kuwaitiano, vítima de tortura por corrente elétrica, durante a guerra. Por meio de dispositivos metálicos, conectados nas hélices das orelhas, foi aplicada cinco vezes por dia, corrente alternada com 220 V, por dois minutos, durante cinco dias consecutivos. Após esse período, essa pessoa desenvolveu eritema nos locais de aplicação, seguida por ulceração alguns dias depois, que somente cicatrizou após três semanas. Após um mês, desenvolveram-se, nos locais de aplicação da corrente elétrica, cicatrizes quelóideais pigmentadas.

3.3 Inervação em cicatrizes hipertróficas

PARKHOUSE et al. (1992) pesquisaram, por imuno-histoquímica, a presença de fibras nervosas e de neuropeptídeos, em nove cicatrizes hipertróficas, cinco cicatrizes normotróficas e três fragmentos de pele, utilizados como controle. Além da maior quantidade de fibras nervosas na pele em relação às cicatrizes normotróficas, os autores demonstraram que somente nas cicatrizes

hipertróficas, as terminações nervosas imunocoradas conseguiam penetrar na densa matriz colágena, ficando orientadas na direção dos fibroblastos. Além da maior densidade de fibras nervosas nas cicatrizes hipertróficas, em relação aos outros tecidos estudados, outra diferença foi a presença de neuropeptídeos pró-inflamatórios, na base da epiderme, apenas nas cicatrizes hipertróficas. Os autores concluíram que as cicatrizes hipertróficas apresentam um caráter neural peculiar, não existente nas cicatrizes normotróficas e na pele.

CROWE et al. (1994) pesquisaram a presença de neuropeptídeos em relação aos sintomas de prurido e dor de cicatrizes hipertróficas. Utilizaram para esse estudo nove amostras de tecido de cicatrizes hipertróficas e cinco de cicatrizes normotróficas. Foram obtidas três amostras de pele, como controle, da adjacência das cicatrizes. As amostras de cicatrizes hipertróficas foram provenientes de nove pacientes. As amostras de cicatrizes normotróficas foram provenientes de cinco pacientes. Os cortes histológicos foram corados por imunofluorescência. Esse estudo demonstrou um aumento no número de neuropeptídeos pró-inflamatórios, contidos nas terminações nervosas das cicatrizes hipertróficas, em relação à pele, em contraste com a ausência desses neurotransmissores nas cicatrizes normotróficas, havendo, portanto, uma atividade inflamatória nociceptiva nas cicatrizes hipertróficas.

ALTUN et al. (2001) realizaram um estudo prospectivo para investigar a proliferação de fibras nervosas durante a cicatrização de queimaduras, e analisar possíveis diferenças, nesse contexto, entre cicatrizes hipertróficas e normotróficas por queimadura. Amostras desses tecidos foram obtidas de 22 pacientes, com idade entre 19 e 74 anos, com cicatrização espontânea de queimaduras. Amostras das cicatrizes e de pele adjacente, como controle, foram obtidas, de cada paciente, com um, quatro e sete meses após a queimadura. Somente no 4º e 7º mês as cicatrizes das queimaduras foram classificadas como hipertróficas ou normotróficas. As lâminas foram coradas por imuno-histoquímica por anticorpos monoclonais para *Protein Gene Product 9,5* (PGP 9,5) e *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP), e anticorpos policlonais para *Substance P* (SP), Neurocinina A (*Neurokinin A*, NK-A), Peptídeo Intestinal Vasoativo (*Vasoactive Intestinal Peptide*, VIP) e o Neuropeptídeo Y (*Neuropeptide Y*, NPY). Dois investigadores examinaram as fibras nervosas na epiderme e derme papilar, da cicatriz e da pele. Os resultados demonstraram um aumento progressivo na quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes, principalmente a partir do 4º mês pós-queimadura. Porém, até o 7º mês, essa quantidade não atingiu o nível de inervação da pele, tanto nas cicatrizes normotróficas como nas hipertróficas. Observou-se, também, um aumento da quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes normotróficas em relação às hipertróficas. Em relação à presença dos neuropeptídeos, não registraram diferenças significativas. Os autores concluíram que a maior quantidade de fibras nervosas nas cicatrizes normotróficas, em

relação às hipertróficas, poderia ser por uma função reguladora específica, das fibras nervosas cutâneas, no mecanismo de cicatrização por queimadura.

ZHANG & LAATO (2001) estudaram as fibras nervosas de cicatrizes hipertróficas e normotróficas. Obtiveram duas amostras de cicatriz hipertrófica de dois pacientes, com evolução cicatricial de 5 e 13 meses. As cicatrizes normotróficas, também de dois pacientes, tinham tempo de evolução de nove dias e 22 anos. Amostras de pele normal, utilizadas como controle, foram obtidas de quatro pacientes, a partir do excesso de pele remanescente de cicatriz hipertrófica. Por meio de imunofluorescência indireta, utilizando anticorpo de camundongo monoclonal anti-proteína de neurofilamentos, constataram que a cicatriz hipertrófica estava permeada por um número maior de ramos axônicos em relação à pele, e esta, por sua vez, continha um número maior de fibras em relação à cicatriz normotrófica. A partir desses resultados, os autores explicaram uma razão para as cicatrizes hipertróficas apresentarem dor, e das cicatrizes normotróficas apresentarem-se hipoestésicas, indicando que o componente neural está envolvido em cicatrizes hipertróficas.

3.4. Recolonização melanocítica cicatricial

VELANGI & REES (2001) pesquisaram a presença de melanócitos em cicatrizes normotróficas, uma vez que as mesmas podem apresentar-se hipocrômicas em relação à pele circunjacente. A partir de 16 voluntários brancos, oito de cada sexo, com idade variando entre 22 a 75 anos de idade (média de 44 anos), obtiveram biópsias de cicatrizes normotróficas hipocrômicas (“pálidas”). Também foram obtidas 11 biópsias de pele de locais mais protegidos da radiação solar, e 5 biópsias de pele mais exposta à radiação. Os indivíduos doadores foram classificados como tipo 2 ou 3 da classificação de Fitzpatrick, e não tiveram exposição solar recente. Em seis desses indivíduos, uma biópsia adicional foi obtida da pele adjacente à cicatriz. Foi realizado estudo imuno-histoquímico das biópsias com anticorpo monoclonal mel-5, c-kit e NKI/beteb, para detectar melanócitos ou precursores dos mesmos. Os fragmentos também foram corados pela técnica de Masson-Fontana para investigar a produção de melanina. Em relação à investigação imuno-histoquímica, não houve diferença entre a quantidade de melanócitos nas cicatrizes e na pele adjacente. A presença de melanina foi positiva em ambos os tecidos, e tampouco houve diferença na taxa de transferência desse pigmento do melanócito ao queratinócito. Os autores concluíram que a hipocromia das cicatrizes normotróficas seria resultante de fenômeno óptico, devido à menor vascularização nas cicatrizes em relação à pele

circunjacente, em associação às distintas características da textura epitelial e dérmica entre ambos os tecidos.

DRESSLER et al. (2001) investigaram a quantidade de melanócitos conforme o tempo de evolução da cicatriz. Colheram amostras de 64 cicatrizes e da pele adjacente, obtidas de cadáveres brancos, durante necrópsia, de diversas regiões do corpo. As idades das cicatrizes, reparadas por primeira intenção, variaram entre 10 dias a 39 anos. As lâminas histológicas foram coradas por reação de imuno-histoquímica para o anticorpo policlonal da proteína S-100. Os melanócitos do tecido cicatricial e da pele adjacente foram contados, em proporção com a quantidade de células basais. Uma avaliação estatística foi realizada comparando a idade cronológica da cicatriz com a proporção melanócitos/células basais. Essa relação nas cicatrizes estava aumentada após dez dias de uma operação. Cicatrizes entre 1 a 3 anos de evolução tiveram a maior proporção, com pico em 1,8 anos. Essa proporção diminuiu, gradativamente, entre as faixas de três a dez anos. A proporção de melanócitos/células basais das cicatrizes se equivaleu ao da pele adjacente após 10 anos. Os autores concluíram que o método proposto poderia ser utilizado como modelo para predizer a idade de uma cicatriz.

Métodos

4. MÉTODOS

O presente desenho de pesquisa é um estudo primário, analítico, clínico, transversal, de prevalência e autocomparativo. O projeto desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM), sob o nº 0403/04 (Apêndice 2).

4.1. Casuística

Neste estudo foram utilizadas amostras de quelóide com pelo menos um ano de evolução, e de pele normal, provenientes de 27 pacientes do sexo feminino, não-brancas, numa faixa etária compreendida entre 15 e 55 anos de idade. As pacientes foram selecionadas no ambulatório “Casa da Cirurgia Plástica” e no Ambulatório Geral de Cirurgia Plástica, pertencentes à Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP-EPM (Professora Titular Lydia Masako Ferreira).

Nos critérios de inclusão, as cicatrizes queiloideais apresentaram um eixo longitudinal de comprimento mínimo de 3 cm, e eixo transversal de comprimento mínimo de 2 cm. As lesões se localizaram numa extensão anatômica delimitada,

em sentido súpero-inferior, entre um plano transverso posicionado em ambos os pontos antropométricos *acromion* (*a*), e um plano transverso no nível do ponto *xiphoidale* (*xi*), situado entre o corpo do esterno e o processo xifóide do esterno (ERDMANN, 1997) (figura 1).

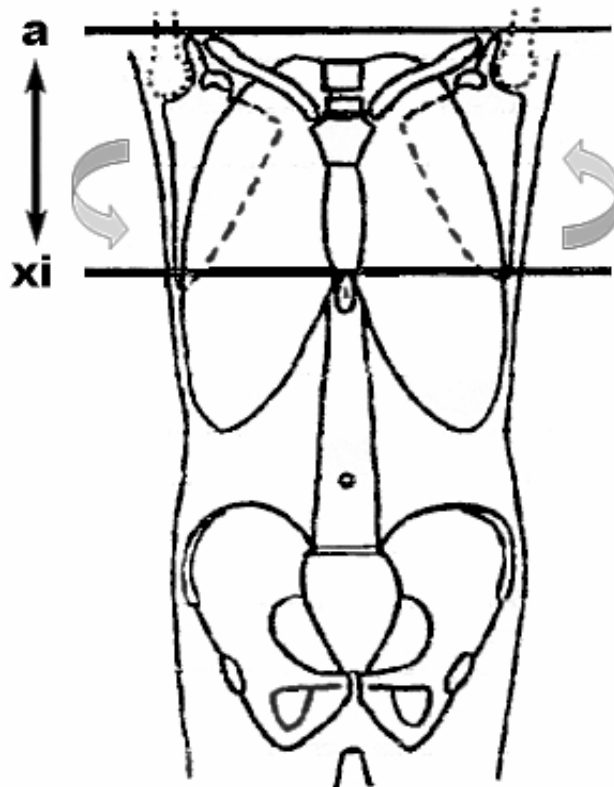


FIGURA 1 - Delimitação da extensão anatômica da localização do quelóide.

Abrange a circunferência corporal entre o plano transverso situado nos pontos *acromion* (*a*), e o plano transverso no ponto *xiphoidale* (*xi*).

Foram excluídos quelóides submetidos a qualquer tipo de tratamento prévio. Tampouco participaram do estudo pacientes que pudessem apresentar

qualquer tipo de dermatopatia crônica, doença metabólica, doença do colágeno ou doença auto-imune degenerativa, qualquer tipo de neoplasia maligna, ou que estivessem sob tratamento com corticosteróide (Apêndice 3).

Todas as pacientes foram devidamente informadas sobre a doação de uma parte da lesão queiloideal ressecada para fins de pesquisa. As pacientes forneceram seu aval mediante a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 4).

4.2. Obtenção das amostras de tecidos

As pacientes foram operadas na “Casa da Cirurgia Plástica”, sob anestesia local, utilizando-se lidocaína a 2%, com adrenalina em solução a uma concentração de 1/200.000. As cicatrizes queiloideais foram excisadas no plano da tela subcutânea, por incisão fusiforme justalesional, com bisturi de lâmina nº 15, incluindo nas extremidades um fragmento de pele, correspondente à retirada do excedente cutâneo necessário para uma adequada coaptação da sutura nas extremidades. Nos casos em que foi indicada a ressecção parcial do quelóide, em virtude do tamanho, ou disposição cutânea, que impossibilitasse um fechamento primário, o procedimento de excisão do fuso de quelóide com os excedentes cutâneos das extremidades foi similar ao da ressecção completa de uma lesão.

Foram obtidas amostras circulares de quelóide e pele, das peças operatórias, por meio de um *punch* circular de 5 mm, a partir da superfície epitelizada desses tecidos, contendo epitélio e tecido conjuntivo. As amostras de quelóide (Grupo Quelóide) foram obtidas no setor periférico da lesão a partir de uma distância de 5 mm de uma das extremidades sobre seu eixo longitudinal. As amostras de pele (Grupo Pele) foram oriundas do excedente cutâneo, na extremidade homolateral, donde se obteve a amostra de quelóide na peça cirúrgica, do local mais distal em relação ao quelóide, de forma que se pudesse obter um fragmento com 5 mm de diâmetro por meio do *punch* (figura 2).

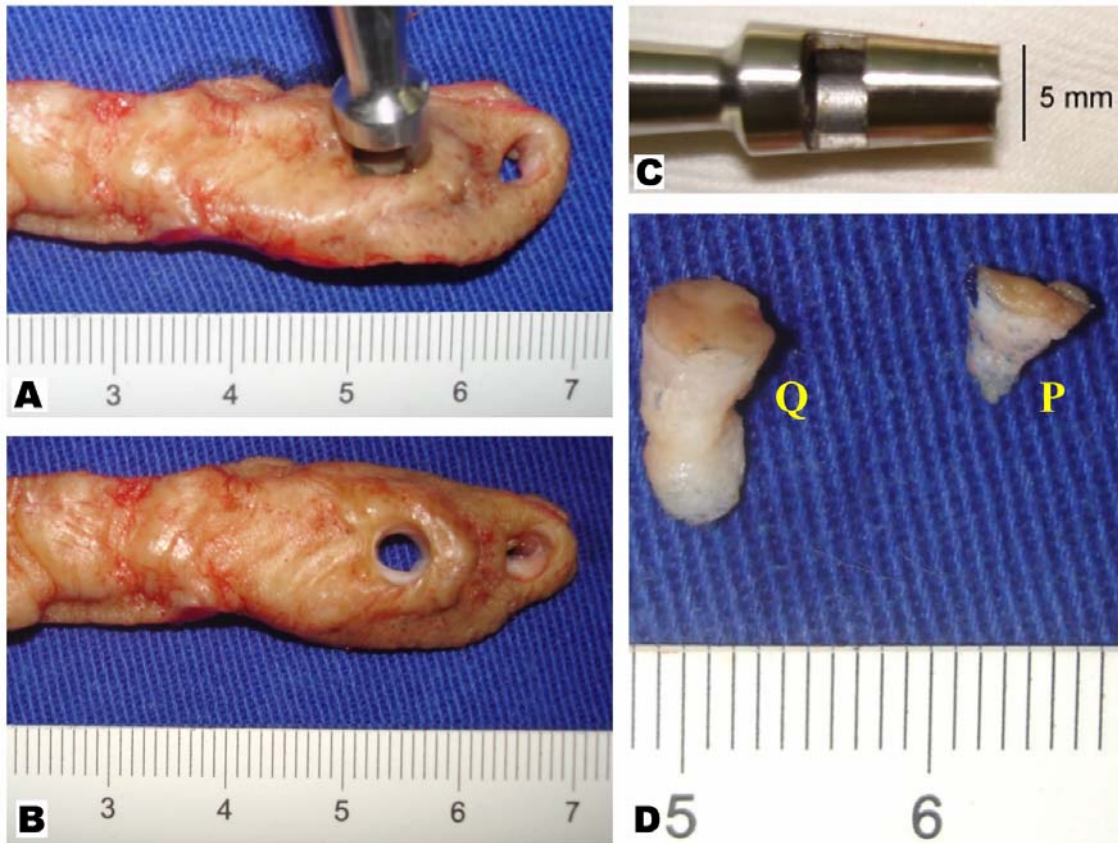


FIGURA 2 - Obtenção das amostras de quelóide e de pele.

- A. Retirada de tecido queloideal, por meio de *punch* circular de 5 mm de diâmetro, a partir do setor periférico da lesão, a 5 mm da extremidade da mesma.
- B. Aspecto da peça cirúrgica, após a retirada do fragmento de quelóide e de pele, oriunda do excedente cutâneo retirado para uma adequada coaptação da sutura nas extremidades.
- C. Margem cortante do *punch*.
- D. Pormenor dos fragmentos de quelóide (Q) e de pele (P), incluindo o epitélio e o tecido conjuntivo.

As amostras de ambos os tecidos foram imersas e fixadas em solução de formaldeído a 10%, e a seguir foram enviadas a um laboratório de histopatologia para serem processadas para o presente estudo. O restante da peça operatória foi enviado, seguindo os procedimentos de rotina do serviço, ao laboratório da Disciplina de Anatomia Patológica do Departamento de Morfologia da

UNIFESP-EPM, para confirmação do diagnóstico clínico, pela coloração por HE, pelos integrantes da equipe do laboratório.

4.3. Preparo das lâminas para exame histológico

4.3.1. Coloração por hematoxilina-eosina

As amostras fixadas em formaldeído foram desidratadas em gradientes crescentes de etanol e, em seguida, diafanizadas com xilol e incluídas em parafina. Cortes histológicos de 5 μm foram obtidos por micrótomo rotativo marca *American Optical*[®] (*standard*), sendo montados em lâminas histológicas previamente silanizadas (3-aminopropiltriétoxisilano, marca *Sigma*[®], código A3648). Um conjunto de cortes, assim obtidos, foi submetido à coloração por HE, e outro conjunto de cortes foi separado para reação imuno-histoquímica.

4.3.2. Reação imuno-histoquímica para proteína S-100

A partir das amostras de quelóide e de pele, fixadas em formaldeído a 10%, e incluídas em parafina, foram realizados cortes histológicos com de 5 μm de

espessura, os quais foram dispostos em lâminas previamente silanizadas. Após “desparafinização”, foram re-hidratados e imunocorados. Utilizou-se o método do complexo streptavidina-biotina-peroxidase (*kit* LSAB+, marca *Dako*[®], código K0690), conforme técnica descrita por GORCZYCA *et al.* (1995). A pesquisa de proteína S-100 foi realizada utilizando-se anticorpo policlonal da marca *Dako*[®], código Z0311 (Anexo 1), diluído a 1/800.

O bloqueio da peroxidase endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com água oxigenada a 3%, e a recuperação antigênica por calor úmido em panela a vapor (*steamer*) em tampão citrato 10mM, pH 6,0 por 1 hora. As reações foram reveladas com o substrato cromógeno diaminobenzidina (marca *Sigma*[®], código S8001), e a contra-coloração foi realizada com o uso de hematoxilina de Harris. Cortes histológicos de linfonodo, contendo melanoma cutâneo metastático, serviram de controles positivos. Os controles negativos foram obtidos substituindo-se o anticorpo primário por solução salina tamponada.

4.3.3. Reação imuno-histoquímica para tirosinase

A reação imuno-histoquímica para pesquisa de tirosinase foi realizada utilizando-se anticorpo monoclonal, clone T311, da marca *Labvision Neomarkers*[®], código MS-800-71 (Anexo 2), diluído a 1/1000, com

amplificação pela técnica do polímero de anticorpos conjugados à fosfatase alcalina, seguindo as instruções do fabricante.

Os cortes histológicos das amostras de quelóide e de pele, 5 µm de espessura, foram montados em lâminas previamente silanizadas. Após “desparafinização” e re-hidratação, as lâminas foram imunocoradas utilizando-se o sistema *EnvisionTM*[®] fosfatase alcalina (*kit EnvisionTM*[®] marca *DAKO*[®], código K1396). O bloqueio da fosfatase alcalina endógena foi alcançado lavando-se as lâminas com levamisol (incluído no *kit*), e a recuperação antigênica por calor úmido em panela a vapor (*steamer*), em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 por uma hora.

As reações foram reveladas com o substrato cromógeno *fast red* (incluído no *kit*) e a contra-coloração foi realizada utilizando-se hematoxilina de Harris. Os controles positivos e negativos dos cortes histológicos tiveram a mesma metodização referida na reação imuno-histoquímica para proteína S-100.

4.4. Mensurações

4.4.1. Digitalização fotográfica das lâminas

Sobre cada lâmina dos Grupos Quelóide e Pele, coradas por HE, foi colocada uma régua de uso histológico (microrrégua) com extensão de 1 cm,

marcada com divisões em milímetros e subdivisões em micrômetros, e cada conjunto lâmina-microrrégua foi disposto sobre a superfície iluminada de um negatoscópio. Com uma câmera filmadora digital *Sony*[®], modelo *SteadyShot*[®] *Digital 8* montada num tripé a uma distância fixa de 30 cm, e utilizando a configuração de *zoom* óptico de 20x e de *zoom* digital 700x, “congelou-se” uma imagem de cada lâmina por meio do *software Adobe*[®] *Premiere*[®] *Pro* em um microcomputador pessoal com processador *Pentium*[®] *IV*. A seguir, cada imagem foi convertida em arquivo com formato *Tag Image File Format* (TIFF).

4.4.2. Fotomicrogrametria das lâminas

A mensuração da área total da derme de cada corte histológico, e da extensão linear do epitélio das amostras de cada tecido, foi realizada pelo pesquisador. Utilizou-se o *software Image Tool*[®] *for Windows*[®] *version 3.00* sob sistema operacional *Microsoft*[®] *Windows*^{XP} *Home Edition*. Calibrou-se no *software*, como escala de referência, a medida de 1 mm utilizando a microrrégua na imagem digital, a fim de obter mensurações em dimensões reais. A fotomicrografia digitalizada de cada lâmina foi visibilizada ativando o recurso de ampliação digital *zoom in* apenas uma vez (figura 3).

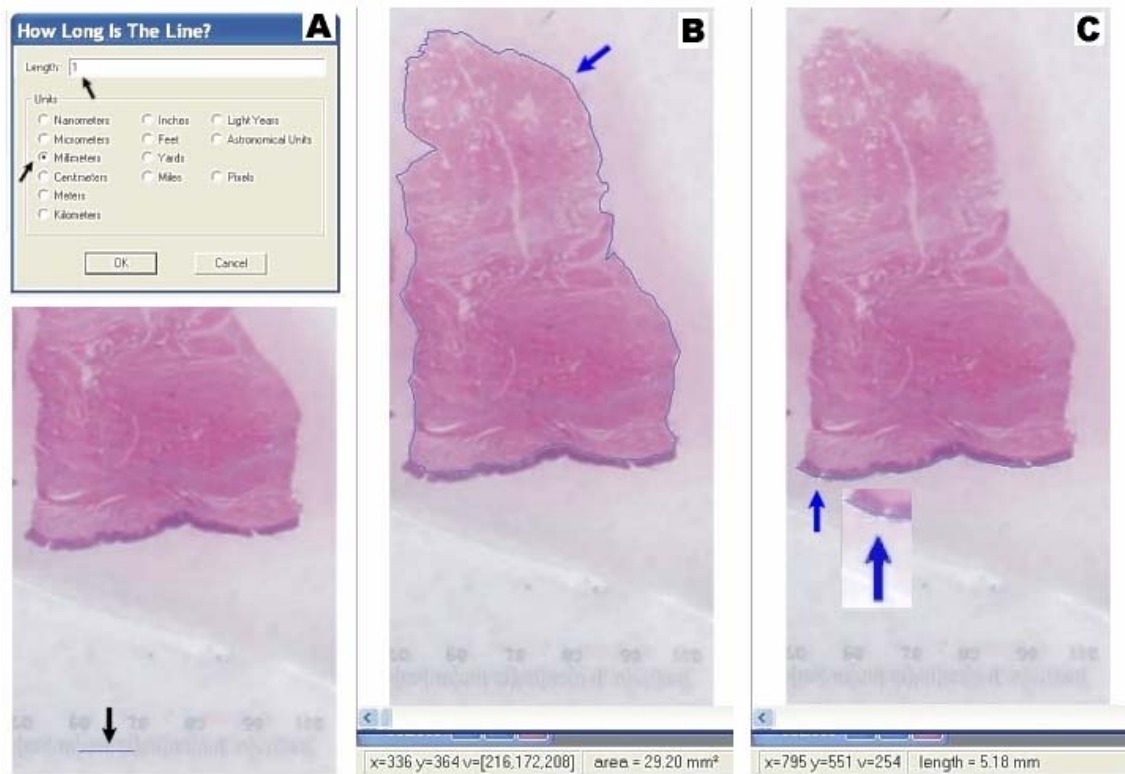


FIGURA 3 - Fotomicrogrametria computadorizada das amostras de tecidos.

- A. Aspecto da fotomicrografia digitalizada de amostra de quelóide, durante a fase de calibração do *software Image Tool*[®] *version 3.00*, para transformar as medidas em valores reais; na “janela de diálogo”, acima, as setas apontam o valor numérico e a respectiva unidade eleita; embaixo, a seta aponta, na microrrégua, a medida de 1 mm correspondente ao valor e à unidade.
- B. Mensuração da área dérmica (em mm²) do corte histológico da amostra de quelóide, em contorno azul (seta).
- C. Mensuração da extensão linear do epitélio (em mm), em tracejado azul; no detalhe ampliado, a seta aponta o tracejado.

4.4.3. Quantificação das fibras nervosas, melanócitos e tirosinase

A identificação e quantificação dos perfis de fibras nervosas, bem como a profundidade do perfil da fibra mais superficial, dos melanócitos e da tirosinase, foram realizadas pelo mesmo patologista. Utilizou-se um microscópio de luz da

marca *Nikon*[®] modelo *Labophot*, sendo realizada uma ampliação da imagem de 200 vezes.

As fibras nervosas foram contadas, uma a uma, mediante uma varredura em toda a derme do corte histológico, de cada lâmina do Grupo Quelóide e do Grupo Pele; os resultados foram expressos como o número de perfis de fibras nervosas/mm² de área de derme. Os melanócitos também foram contados, um a um, em toda a extensão linear do epitélio de cada corte, de ambos os grupos, e os resultados foram expressos como número de melanócitos/mm² de comprimento de epitélio.

A profundidade do perfil da fibra nervosa mais superficial foi determinada medindo a distância de uma linha, entre o ponto mais superficial do perfil da fibra, à camada granulosa da epiderme. Essa linha foi orientada, paralelamente, a uma linha perpendicular à direção do epitélio compreendida na amostra do tecido (figura 4). Utilizou-se uma microrrégua de 1 cm de extensão, dividida em 100 espaços de 0,1 mm, disposta sobre a lâmina (figura 5). Os resultados foram expressos em mm.

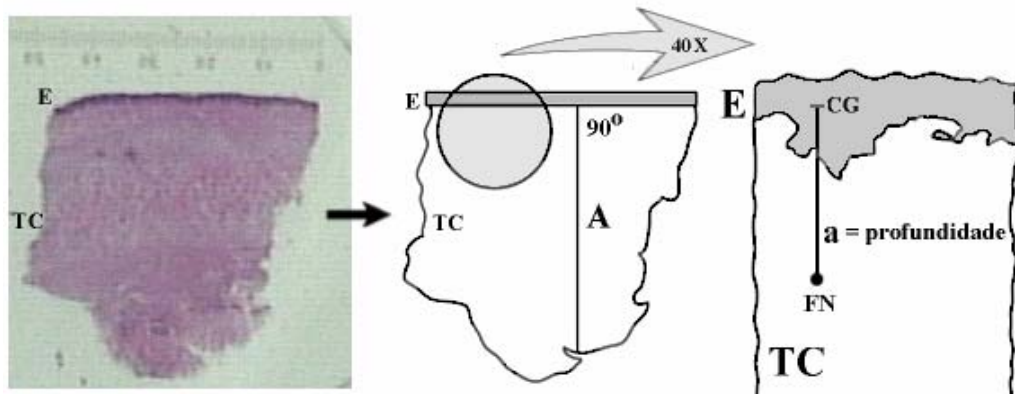


FIGURA 4 - Mensuração da profundidade do perfil da fibra mais superficial.

A partir da visualização de todo o fragmento amostral, demarca-se uma linha (A) perpendicular ao epitélio (E) em sentido ao tecido conjuntivo (TC). Ao ampliar um segmento da amostra em 40 vezes (área no círculo), ao localizar o perfil da fibra mais superficial, mede-se a distância (a) até a camada granulosa (CG) do epitélio, mantendo em paralelo as linhas (A e a).

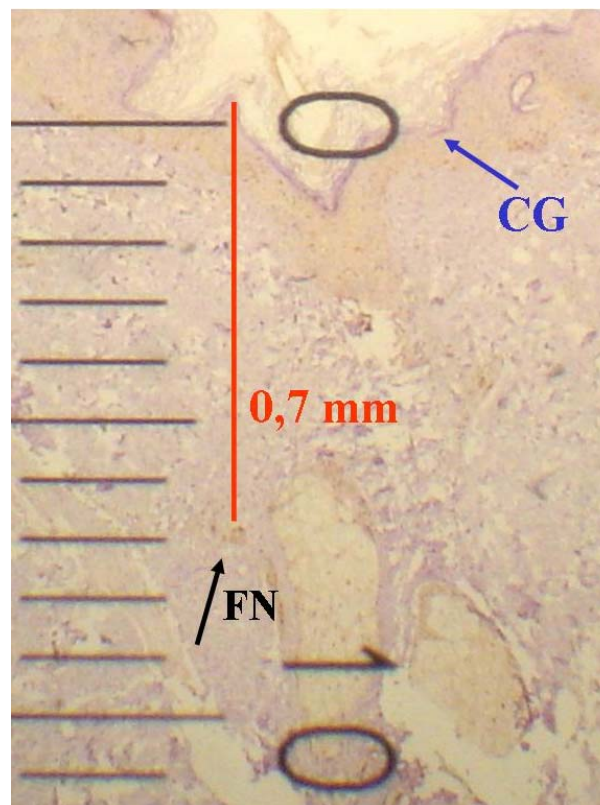


FIGURA 5 - Fotomicrografia da profundidade do perfil da fibra mais superficial.

Distância do perfil da fibra nervosa (FN) à camada granulosa (CG) do epitélio suprajacente (paciente n° 6; imuno-histoquímica; método da streptavidina-biotina-peroxidase; Envision® - método do polímero conjugado a enzima; proteína S-100, 40x).

Em relação à reação positiva para anticorpo anti-tirosinase, fez-se uma contagem qualitativa. Considerou-se a reação como positiva ou ausente em cada melanócito, independentemente da magnitude da reação. Assim, a quantificação da tirosinase foi baseada na proporção de melanócitos imunocorados contados na extensão do epitélio de cada amostra de tecido.

4.5. Análise estatística

Para análise dos resultados fixou-se em 0,05, ou 5%, o nível de rejeição da hipótese de nulidade, sendo aplicados os seguintes testes [nos valores com significância estatística inseriu-se um asterisco (*) nas tabelas]:

- a. Teste de Wilcoxon para comparar as medições efetuadas nas fibras nervosas e melanócitos, assim como para tirosinase, tanto no quelóide como na pele adjacente;
- b. Teste de Mann-Whitney para analisar possíveis correlações das quantificações das fibras nervosas e melanócitos, e da profundidade das fibras nervosas, com o valor da mediana do tempo de evolução das lesões.

Resultados

5. RESULTADOS

Na comparação da média das proporções do número de unidades de perfis de fibras nervosas por área (unidades/mm²), de todas as lâminas de cada grupo, houve um aumento, com significância estatística, da quantidade de perfis de fibras nervosas no Grupo Quelóide em relação ao Grupo Pele ($p < 0,001$) (figura 6). A média do perfil de fibra nervosa mais superficial, no Grupo Quelóide, estava a uma profundidade maior ($p < 0,001$) que no Grupo Pele (tabela 1).

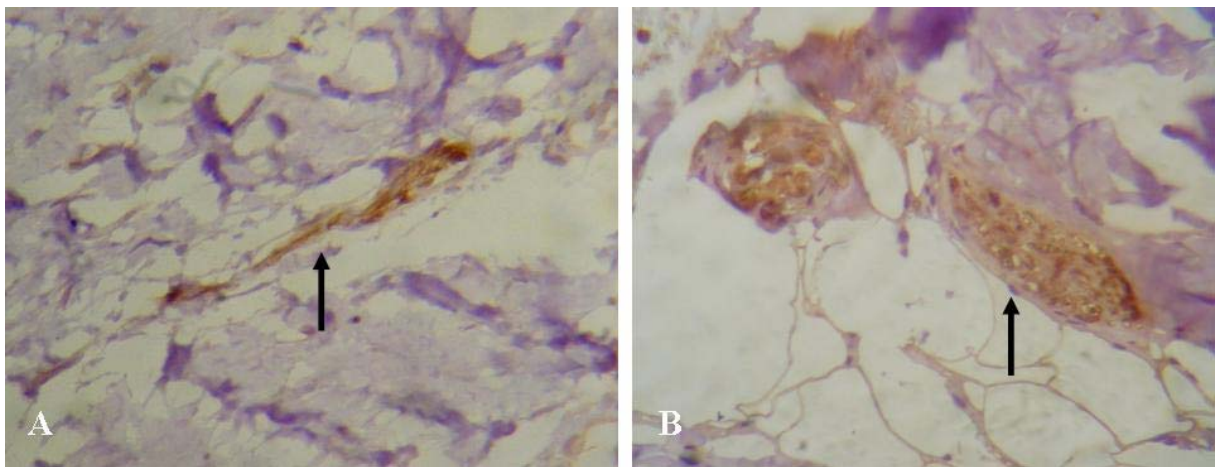


FIGURA 6 – Fibra nervosa no quelóide e na pele.

A. Fibra nervosa intraquelóideal comprimida (seta) em meio a fibras colágenas hialinizadas da lesão (6; IHC; LSAB; proteína S-100; 400x).

B. Fibra nervosa (seta) na derme da pele (6; IHC; LSAB; proteína S-100, 400x).

(Legenda: 6 - paciente n° 6; IHC - imuno-histoquímica; LSAB - método da streptavidina-biotina-peroxidase; Envision[®] - método do polímero conjugado a enzima).

TABELA 1 – Fibras nervosas no queuloide e na pele, segundo as medidas da quantidade de perfis por área, e da profundidade do perfil mais superficial.

Paciente	Perfis / Área (unidades/mm ²)		Profundidade (mm)	
	Grupo		Grupo	
	Queuloide	Pele	Queuloide	Pele
1	34,21	20,31	1,6	1,9
2	59,11	70,34	5,0	0,8
3	73,89	11,80	1,4	0,9
4	74,18	20,80	1,3	1,0
5	76,43	6,69	1,2	0,5
6	39,83	10,41	3,2	0,6
7	33,49	17,29	3,1	1,7
8	20,56	33,13	2,5	0,7
9	36,39	36,08	1,6	1,2
10	42,42	20,32	1,5	2,2
11	64,93	20,09	2,2	0,8
12	49,75	25,56	1,1	1,3
13	38,06	30,75	1,9	1,2
14	29,92	10,53	3,4	0,5
15	34,19	38,67	2,4	0,6
16	65,47	26,15	2,6	0,9
17	22,98	35,23	4,0	1,5
18	28,94	38,65	1,1	0,7
19	66,24	23,24	3,2	1,5
20	90,80	14,54	1,5	0,5
21	57,16	52,32	3,3	0,6
22	73,30	37,65	1,2	0,8
23	13,39	59,37	4,7	0,7
24	26,25	15,67	2,9	1,0
25	39,65	29,94	3,9	1,6
26	43,83	47,52	3,8	1,3
27	27,77	30,16	5,1	1,9
Média	46,8	29,0	2,6	1,1
Mediana	39,8	26,1	2,5	0,9

Teste de Wilcoxon

(Queuloide x Pele)

Z crítico = 1,96

Perfis/Área	Profundidade
Z calculado= 2,80 * (p < 0,001)	Z calculado= 4,24 * (p < 0,001)
Queuloide > Pele	Queuloide > Pele

A comparação da média das proporções do número de unidades de melanócitos por extensão de epitélio (unidades/mm), apresentou uma diminuição, com significância estatística ($p < 0,001$), no quelóide em relação à pele (figura 7) (tabela 2).

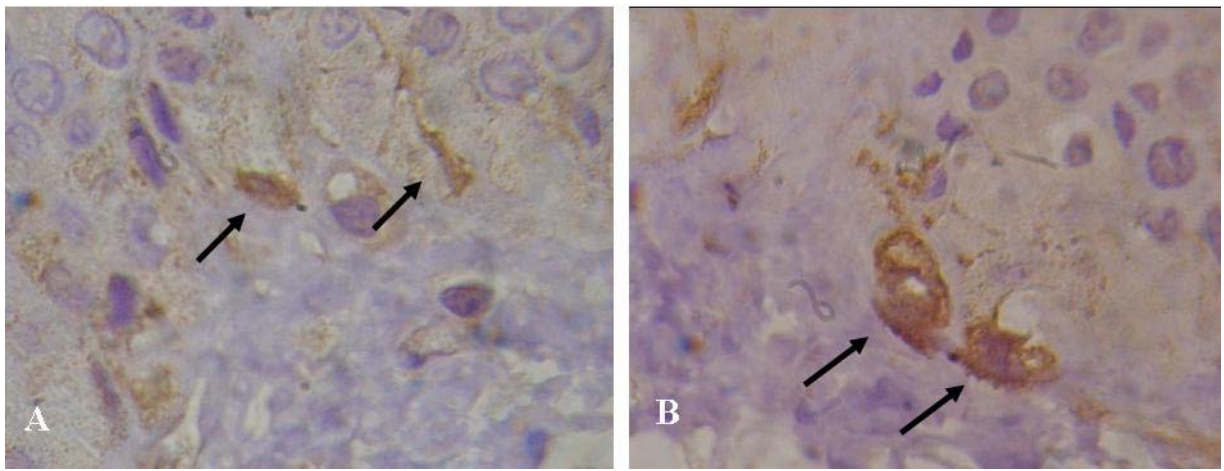


FIGURA 7 - Melanócitos no epitélio do quelóide e da pele.

A - Melanócitos no quelóide (setas) (6; IHC; LSAB; proteína S-100, 1000x).

B - Melanócitos na pele (setas) (6; IHC; LSAB; proteína S-100, 1000x).

(Legenda: 6 - paciente n° 6; IHC - imuno-histoquímica; LSAB - método da streptavidina-biotina-peroxidase; Envision® - método do polímero conjugado a enzima).

Tabela 2 – Melanócitos no queloide e na pele, segundo a medida da quantidade de melanócitos por extensão de epitélio.

Paciente	Melanócitos / extensão de epitélio (unidades/mm)	
	Grupo	
	Queloide	Pele
1	0,76	2,56
2	0,50	3,94
3	0,85	2,91
4	0,36	2,26
5	1,13	1,63
6	0,58	2,45
7	0,43	3,95
8	0,29	3,34
9	0,33	3,68
10	0,43	1,82
11	0,28	3,83
12	0,44	1,77
13	0,72	3,87
14	0,69	5,62
15	0,22	3,68
16	0,93	3,06
17	0,13	2,59
18	0,22	1,93
19	1,06	3,34
20	0,60	2,23
21	0,56	5,65
22	1,33	6,60
23	0,72	5,40
24	0,87	4,60
25	0,00	3,98
26	0,18	14,19
27	0,45	1,71
Média	0,5	3,8
Mediana	0,5	3,3

Teste de Wilcoxon

(Queloide x Pele)

Z calculado= 4,54 * Z crítico = 1,96

(p < 0,001)

Queloide < Pele

A análise da relação entre o tempo de evolução das lesões, menor ou maior (ou inclusive igual) a seis anos, com a quantidade de perfis de fibras nervosas ($p = 0,755$), a profundidade do perfil mais superficial ($p = 0,139$) e a quantidade de melanócitos ($p = 0,581$), não indicou associações com significância estatística (tabela 3).

TABELA 3 – Fibras nervosas no queiloide de pacientes com < de 6 anos ou ≥ de 6 anos de evolução segundo o perfil por área, profundidade e melanócitos por área.

	Perfis / Área (unidades / mm ²)		Profundidade (mm)		Melanócitos (unidades / mm)	
	< 6 anos	≥ 6 anos	< 6 anos	≥ 6 anos	< 6 anos	≥ 6 anos
	76,43	74,18	1,2	1,3	1,13	0,36
	39,83	28,94	3,2	1,1	0,58	0,22
	66,24	73,30	3,2	1,2	1,06	1,33
	27,77	73,89	5,1	1,4	0,45	0,85
	33,49	34,19	3,1	2,4	0,43	0,22
	36,39	34,21	1,6	1,6	0,33	0,76
	64,93	38,06	2,2	1,9	0,28	0,72
	22,98	29,92	4,0	3,4	0,13	0,69
	43,83	39,65	3,6	3,9	0,18	0,00
	49,75	65,47	1,1	2,6	0,44	0,93
	57,16	90,80	3,3	1,5	0,56	0,60
	13,39	26,25	4,7	2,9	0,72	0,87
		59,11		5,0		0,50
		42,42		1,5		0,43
		20,56		2,5		0,29
Média	44,34	48,73	3,0	2,3	0,52	0,58
Mediana	41,83	39,65	3,2	1,9	0,44	0,60

Teste de Mann-Whitney

(< 6 anos x ≥ 6 anos)

Z crítico = 1,96

Perfis / Área	Profundidade	Melanócitos
Z calculado= 0,34 (p = 0,755)	Z calculado= 1,49 (p = 0,139)	Z calculado= 0,59 (p = 0,581)

Em relação à quantidade de melanócitos imunocorados pela tirosinase, por extensão linear de epitélio (tirosinase (+) / mm), o quelóide apresentou uma quantidade menor, com significância estatística ($p < 0,001$), em relação à pele (figura 8) (tabela 4).

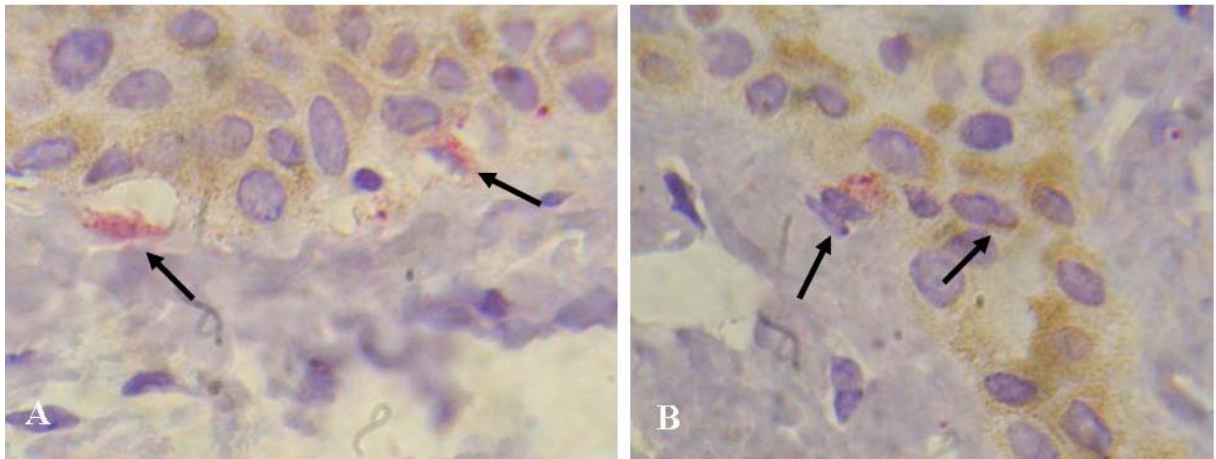


FIGURA 8 – Melanócito imunocorado por tirosinase no epitélio do quelóide e da pele.

A. Tirosinase (setas no pontilhado avermelhado) no quelóide (6; IHC; Envision[®]; tirosinase, 1000x).

B. Tirosinase na pele (setas) (6; IHC; Envision[®]; tirosinase, 1000x).

(Legenda: 6 - paciente n° 6; IHC - imuno-histoquímica).

Tabela 4 - Melanócitos imunocorados pela tirosinase no quelóide e na pele, segundo a extensão do epitélio.

Tirosinase (+) / extensão de epitélio (unidades/mm)		
	Queloide	Pele
	0,13	2,43
	0,12	6,04
	0,00	1,45
	0,00	0,00
	1,23	1,26
	0,93	0,70
	0,64	1,34
	0,57	0,78
	0,22	0,11
	0,00	3,64
	0,28	1,28
	0,00	0,59
	0,00	0,00
	2,54	0,00
	0,00	1,61
	0,23	4,50
	1,30	1,23
	0,99	1,09
	0,59	0,22
	0,00	2,12
	0,00	5,06
	0,22	0,00
	0,21	0,79
	0,65	0,12
	0,22	0,00
	0,18	10,97
	0,89	1,14
Média	2,61	1,79
Mediana	0,22	1,14

Teste de Wilcoxon

(Queloide x Pele)

Z calculado = 2,54 * Z crítico = 1,96
p < 0,001

Queloide < Pele

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Sobre o projeto do estudo

6.1.1. Relevância da pesquisa de fibras nervosas

6.1.1.1. Inter-relação anatômica e eletrofisiológica da inervação cutânea na cicatrização

Na atualidade, a pesquisa relacionada à formação do quelóide envolve fatores imunológicos. Contudo, os fatores de crescimento e as citocinas atuam na formação do quelóide por mecanismo humoral, parácrino e autócrino. Esses tipos de mecanismos, entretanto, não explicariam completamente o porquê do caráter anatômico preferencial, bizarro e temporal do quelóide, descritos a seguir.

O caráter anatômico seria devido a certas regiões serem mais frequentemente acometidas pelo quelóide que outras. Trata-se de uma lesão de comportamento bizarro, uma vez que pode se desenvolver em segmentos parciais de uma mesma cicatriz (ROCKWELL *et al.*, 1989; MCGROUTHER, 1994). O quelóide pode ter um caráter temporal, pois pode desenvolver-se num

determinado local do corpo a partir de uma incisão cirúrgica e, futuramente, uma nova incisão no mesmo local ou em local imediatamente vizinho pode não desenvolver esse distúrbio cicatricial.

Por conseguinte, se devem cogitar outros mecanismos reguladores do processo cicatricial, além dos fatores de crescimento e as citocinas, para explicar o singular caráter anatômico, bizarro e temporal do quelóide. Além desses elementos participantes da cicatrização, fatores neurotáxicos integrantes do sistema nervoso autônomo periférico, como as fibras nervosas sensoriais tipo C e tipo A- δ , também são controladores da cicatrização cutânea (BESNÉ *et al.*, 2002).

Essas fibras nervosas localizam-se na derme e na epiderme, alcançando a camada granulosa. Possuem, naturalmente, uma distribuição anatômica específica, e a densidade dessas fibras varia nas diferentes regiões anatômicas. Assim, a intensidade do processo inflamatório reparador cutâneo pode variar em função da região corporal comprometida, e de acordo com a quantidade e tipo de terminações nervosas locais (BESNÉ *et al.*, 2002). Dessa forma poderia-se, em tese, cogitar um paralelismo entre o padrão de distribuição neural cutâneo e o caráter anatômico e bizarro do quelóide. Ainda, corroboraria de forma indireta, o fato da inervação epidérmica e sua função diminuir com a idade (BESNÉ *et al.*, 2002), em concordância com o fato de o quelóide ser menos freqüente a partir da sexta década de vida.

Outro fator, diretamente envolvido na intensidade do processo de cicatrização da pele, é representado pela corrente bioelétrica circulante nesse tecido. Tal fenômeno associa-se às contínuas despolarizações e repolarizações neuronais (BORGENS, 1988a, 1988b; WEISS et al., 1990; PANESCU *et al.*, 1993; KITCHEN & BAZIN, 1996; BESNÉ *et al.*, 2002). Pesquisas *in vitro* evidenciaram que a corrente elétrica pode influenciar a proliferação de fibroblastos e a síntese de fibras colágenas (BASSETT & HERRMANN, 1968; WEISS et al., 1989; WEISS et al., 1990). Também se obteve aumento da produção colágena pela estimulação por correntes elétricas exógenas em estudos de feridas cutâneas em suínos (ALVAREZ *et al.*, 1983; KITCHEN & BAZIN, 1996), bem como em outros modelos animais experimentais e em humanos (BASSON & BURNEY, 1982; CARLEY & WAINAPEL, 1985; WEISS *et al.*, 1990; SANTOS *et al.*, 2004).

O sistema nervoso central, a partir de oscilações do seu *status* fisiológico autônomo, permite que influências comportamentais, distúrbios de personalidade e estresse psíquico modulem o processo de cicatrização por alterar as propriedades bioelétricas cutâneas (GARCIA *et al.*, 1990; SLOMINSKI *et al.*, 1993; MISERY, 2000). A partir dessas mudanças no estado neurovegetativo, durante períodos variáveis também se poderia cogitar um possível paralelismo com o caráter temporal do quelóide.

Portanto, a pesquisa de terminações nervosas cutâneas, objetivo deste estudo, pode ser um caminho viável para tentar obter uma compreensão mais abrangente do mecanismo deflagrador do quelóide.

6.1.1.2. Inter-relação da inervação cutânea com a cicatriz hipertrófica

A literatura cita indícios da inter-relação do quelóide com fatores neurogênicos. As primeiras evidências foram relativas às cicatrizes hipertróficas (PARKHOUSE *et al.*, 1992; CROWE *et al.*, 1994; ZHANG & LAATO, 2001; LIANG *et al.*, 2004). Essas cicatrizes possuem maior densidade de inervação que cicatrizes normais, portanto, em razão do crescente consenso de as cicatrizes hipertróficas serem consideradas uma expressão fenotípica de menor intensidade do quelóide, impõe-se também a pesquisa de fibras nervosas neste último, a fim de ampliar o entendimento e a inter-relação entre essas cicatrizes hiperproliferativas.

6.1.2. Relevância da pesquisa de melanócitos

6.1.2.1. Inter-relação dos melanócitos com a rede nervosa cutânea

Os melanócitos epidérmicos, por serem oriundos da crista neural, também são células operacionalmente sensórias dentro da rede nervosa cutânea,

responsável pela regulação da homeostase da epiderme humana (SLOMINSKI *et al.*, 1993). O mecanismo de controle da função dos melanócitos, dentro do sistema nervoso cutâneo, ainda não está bem esclarecido. Porém, demonstrou-se uma íntima conexão física dos terminais axônicos intra-epidérmicos com melanócitos epidérmicos humanos. Os locais de contato entre os axônios e os melanócitos são caracterizados por uma sinapse especializada (TOYODA *et al.*, 1999).

Os melanócitos produzem e liberam os neuropeptídeos melanogênicos alfa-MSH e corticotropina (*Adrenocorticotropic Hormone*, ACTH), classicamente conhecidos como “hormônios de estresse”, além de secretar e de ter receptores para catecolaminas, L-diidroxifenilalanina (*L-dihydroxyphenylalanine*, L-DOPA) e serotonina (TOYODA *et al.*, 1999; GRÜTZKAU *et al.*, 2000; SLOMINSKI *et al.*, 2004). Por conseguinte, para estímulos endógenos e ambientais, os melanócitos atuam como “sensores de estresse” na epiderme, portanto, disfunções reguladoras dos melanócitos, repercutidas na rede nervosa intra-epidérmica, podem desenvolver disfunções patológicas cutâneas, inclusive na cicatrização (SLOMINSKI *et al.*, 1993). Assim, o presente estudo, ao investigar a inervação do quelóide, incluiu também os melanócitos.

6.1.2.2. Inter-relação dos melanócitos com o quelóide

É bem conhecido o fato de a incidência do quelóide ser maior em indivíduos negros e em residentes em países tropicais, ao passo que carcinomas cutâneos ocorrem mais comumente em indivíduos brancos e naqueles residentes em países de clima mais frio (OLUWASANMI, 1974; HAZRATI & HOOMAND, 1977; ROCKWELL *et al.*, 1989; O'SULLIVAN *et al.*, 1996). Outra ocorrência relevante consiste que o quelóide, em pessoas de pele escura, desenvolve-se mais rapidamente que em pessoas de pele clara, e no fato da ausência de quelóide em albinos (OLUWASANMI, 1974; MORGAN *et al.*, 1975; NIESSEN *et al.*, 1999).

As diversas propriedades físicas da melanina, ópticas, fotorreativas e elétricas, indicam que a radiação UV pode afetar a homeostase epidérmica. A pigmentação cutânea, por exemplo, influencia a termorregulação cutânea. Assim, em indivíduos negros, cerca de 85% do espectro de luz visível é transformado em energia de calor, enquanto em brancos esse índice é de 55%. O excesso de energia térmica em pessoas negras tem o potencial de alterar a taxa metabólica das células cutâneas, com implicações na eletrocondutividade tecidual e na cicatrização cutânea (SLOMINSKI *et al.*, 1993; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

Portanto, variações naturais da pigmentação constitutiva, ou da pigmentação facultativa (adquirida), também podem acarretar oscilações da fisiologia da pele, bem como no processo cicatricial. Por conseguinte, pessoas de

pele escura apresentariam maior predisposição em desenvolver distúrbios cutâneos. Como o quelóide ocorre mais comumente em pessoas não-brancas, da mesma forma que em regiões mais expostas à radiação UV, o presente estudo propôs-se a investigar uma possível relação entre quelóide e melanócito.

6.1.3. Relevância da pesquisa de tirosinase

A tirosinase (monofenol mono-oxigenase, dopa oxidase, fenol-oxidase) é uma glico-enzima de cobre que catalisa as primeiras duas reações na síntese da melanina (a hidroxilação da tirosina a L-DOPA e sua subsequente oxidação a dopaquinona) (SLOMINSKI *et al.*, 2004). Sendo, portanto, uma enzima-chave na melanogênese, sua quantificação neste estudo torna-se um subsídio complementar importante para a pesquisa dos melanócitos no quelóide.

6.2. Sobre os métodos

6.2.1. Desenho da pesquisa

O desenho de pesquisa autocomparativo entre quelóide e pele, utilizado no presente estudo, obtendo um fragmento cutâneo pericicatricial do mesmo

paciente, já foi utilizado em outros estudos de cicatriz hipertrófica ou quelóide (CROWE *et al.*, 1994; SUETAKE *et al.*, 1996; SCHIERLE *et al.*, 1997; ALTUN *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004). Conceitualmente, este trabalho não é autocontrolado, pois o tecido controle para estudo do quelóide, ou cicatriz hipertrófica, seria o da cicatriz normotrófica, e não a pele (HOCHMAN *et al.*, 2005a). Porém, esse desenho de pesquisa autocomparativo entre quelóide e pele pode obter informações importantes, com redução das quantidades amostrais, pela exclusão de variáveis interpessoais.

6.2.2. Casuística

O quelóide é mais comum em pessoas não-brancas, fato que embasou a inclusão da cor dos pacientes neste estudo. A escolha em relação ao sexo deveu-se pela literatura sugerir que existe uma predisposição maior ao quelóide em pessoas do sexo feminino, em virtude de seu desenvolvimento poder estar relacionado a fatores hormonais, como aumento das lesões durante a gravidez, bem como uma relativa regressão na menopausa (REIS, 1994; NIESSEN *et al.*, 1999). Entretanto, alguns pesquisadores não encontraram correlação entre o risco de desenvolver quelóide e o sexo do paciente (ROCKWELL *et al.*, 1989; CANARY *et al.*, 1990; REIS, 1994; BERMAN & BIELEY, 1996).

Quanto à faixa etária incluída, a escolha deveu-se à maior frequência dessa lesão em pacientes jovens, com risco maior na segunda década de vida, sendo mais raro em pessoas acima de 73 anos de idade (REIS, 1994; FERREIRA, 1995, BERMAN & BIELEY, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999). No presente estudo, a média de idade das pacientes foi de 30 anos, sendo o intervalo de até 30 anos de idade o mais prevalente, com 51,85% (Apêndice 5.1 e 5.2) da casuística. Resultados similares foram encontrados por RAMAKRISHNAN *et al.* (1974) em um levantamento com 1.000 pacientes com quelóide, com 65,20% das lesões nesse intervalo etário, embora tivessem sido consideradas pessoas de ambos os sexos.

A maioria das lesões quelóideais, mais de 90%, localiza-se em posição superior ao abdome. A região esternal é citada como a mais freqüente, sendo que nessa localização o quelóide apresenta um crescimento mais agressivo, assumindo o formato de caranguejo (por isso o quelóide foi antigamente denominado de cancróide), ou o formato mais conhecido de borboleta (*butterfly*). A região deltóidea é citada como a segunda mais freqüente sede de quelóide (RAMAKRISHNAN *et al.*, 1974), seguida da região escapular, embora alguns estudos intercalem o quelóide de lóbulo de orelha na seqüência descrita (ROCKWELL *et al.*, 1989; O'SULLIVAN *et al.*, 1996). Essa distribuição preferencial do quelóide norteou a escolha topográfica de inclusão das lesões no presente estudo. Por isso, a extensão anatômica doadora de quelóide foi delimitada entre o plano transversal situado nos pontos *acromion* (a) e o plano

transverso no ponto *xiphoidale* (xi), em toda a circunferência da superfície (figura 1). Esse segmento corporal incluiu as regiões esternal, deltóidea e escapular (Apêndice 5.3).

Nos critérios de inclusão não houve limitação quanto à atividade clínica das lesões. Os principais parâmetros dessa atividade são o crescimento centrífugo referido da lesão, o prurido e a dor (O'SULLIVAN *et al.*, 1996). A vermelhidão, por ser de identificação duvidosa na cor da pele dos pacientes da presente casuística, não foi considerada. Neste estudo, o crescimento referido esteve presente em 70,37% dos casos; em relação aos sintomas, o prurido esteve em 81,48% dos casos, e a dor, em 59,26% (Apêndice 5.4). Assim, as lesões denotaram um caráter ativo por ocasião da ressecção, sugerindo um processo inflamatório concomitante (SCHIERLE *et al.*, 1997; RAHBAN & GANER, 2003). Esses achados vêm ao encontro da tendência relatada na literatura, sendo o prurido mais freqüente que a dor (MUIR, 1990; DATUBO-BROWN, 1990; O'SULLIVAN *et al.*, 1996). LEE *et al.* (2004) descreveram o prurido presente em 86% dos casos, e a dor, em 46%.

6.2.2.1. Diagnóstico histopatológico “quelóide versus cicatriz hipertrófica”

No presente estudo, todas as lesões a serem analisadas tiveram o diagnóstico clínico de quelóide pelo pesquisador, tendo como critério o aspecto e

a história clínica da cicatriz. Porém, das 27 peças enviadas para confirmação histopatológica por coloração de HE, o Laboratório da Disciplina de Anatomia Patológica da UNIFESP-EPM apresentou 66,66% dos diagnósticos histopatológicos com laudos de quelóide, 29,63% com cicatriz hipertrófica, e 3,70% com fibrose intersticial (Apêndice 5.1). Embora uma primeira impressão desse fato possa causar estranheza, uma análise mais profunda da literatura pode, *a priori*, explicá-lo, apesar de serem vários os patologistas responsáveis pelos diagnósticos emitidos .

Freqüentemente, quelóides não são facilmente distinguíveis de cicatrizes hipertróficas (OLUWASANMI, 1974; MUIR, 1990; NIESSEN *et al.*, 1999; RAHBAN & GAMER, 2003). REIS (1994) e O'SULLIVAN *et al.* (1996) propuseram uma diferenciação baseada em parâmetros clínicos, segundo a qual, o quelóide seria a cicatriz que, progressivamente, invade o tecido normal vizinho com tendência ao crescimento exagerado e duradouro. Cicatrizes hipertróficas seriam aquelas que permaneceriam confinadas à área lesada pelo ferimento, crescendo apenas em volume sobre a cicatriz inicial e, comumente, com tendência a regredir. DARZI *et al.* (1992) já haviam preconizado que o quelóide seria diagnosticado pela ausência de involução num período de até nove meses, ou pela recorrência pós-excisional.

MUIR (1990) propôs diferenciar o quelóide da cicatriz hipertrófica pelo tempo das lesões. Classificou as lesões em três grupos, a saber: grupo de curto tempo de evolução, de longo tempo de evolução e grupo intermediário. No

primeiro grupo, de curto tempo de evolução, as cicatrizes apresentariam grau de atividade clínica crescente, até em torno do 6º mês após o ferimento ou incisão, permanecendo de aspecto estático por alguns meses, regredindo, a seguir, de forma gradual. As cicatrizes desse grupo ocorreriam em qualquer parte do corpo e em qualquer idade, embora tenham sua expressão máxima em crianças. O autor preconizou que essas cicatrizes deveriam ser chamadas de “cicatrizes hipertróficas”. No segundo grupo, de longo tempo de evolução, a intensidade da atividade clínica seria menor que no primeiro grupo, porém, continuaria por vários anos e, progressivamente, se estenderia por sobre a pele adjacente. Essas cicatrizes se distribuiriam, preferencialmente, na região esternal, sendo comumente únicas. Porém, também podem ser múltiplas em decorrência de lesões acnéicas e, além da região esternal, poderiam se assentar na região deltóidea e no dorso (região escapular). Após vários anos de crescimento centrípeto da cicatriz, freqüentemente ocorreria uma regressão, ou atrofia, no seu setor central. Essas cicatrizes seriam mais freqüentes em adultos jovens, raramente em idade pré-puberal, e deveriam ser chamadas de “quelóide”. No terceiro grupo, ou intermediário, estariam as cicatrizes com características de transição entre as duas anteriores, com atividade clínica até em torno de dois anos. A base da cicatriz ficaria restrita às margens da ferida que a originou, da mesma forma que as cicatrizes hipertróficas, porém, essas cicatrizes teriam o comportamento do quelóide, ou seja, não envolveriam, e apresentariam tendência à recidiva pós-excisional. Esse grupo englobaria a maioria das cicatrizes

queloideais na orelha, que usualmente apresentam crescimento pedunculado, e alguns casos de cicatrizes também na região deltóidea.

No entanto, apesar dessas definições ou classificações existentes, na prática ainda é comum os clínicos ignorarem essa diferença, e continuarem considerando ambos os termos sinônimos. Ainda, essa confusão conceitual agrava-se quando as cicatrizes hipertróficas são também denominadas de “pseudoquelóide”, ou quando o quelóide é chamado de “quelóide verdadeiro” (OLUWASANMI, 1974; RUDOLPH, 1987; O’SULLIVAN *et al.*, 1996; NIESSEN *et al.*, 1999).

REIS (1994) preconizou que, nos casos em que a diferenciação clínica entre o quelóide e a cicatriz hipertrófica for difícil, apenas o exame histopatológico poderia fazer o diagnóstico. Contudo, ainda não foram estabelecidos critérios, consensualmente aceitos, para o diagnóstico diferencial histopatológico entre o quelóide e a cicatriz hipertrófica.

No presente estudo, 77,77% das amostras de quelóide foram obtidas da parede torácica anterior, 11,11% da região deltóidea, e igual porcentagem da região escapular. Assim, pelos critérios de MUIR (1990) acima descritos, para classificar uma lesão como “quelóide”, os diagnósticos clínicos das lesões incluídas na presente casuística deveriam ser enquadrados, globalmente, como quelóides. Entretanto, 33,33% dos laudos histopatológicos dessas lesões não foram de quelóide. Esse fato confirmou a confusão conceitual ainda existente, inclusive quanto à microscopia, pela não uniformidade dos laudos histopatológicos. Nesse sentido, considerando que pudesse haver uma progressão

da cicatriz hipertrófica ao quelóide, pesquisadores sugerem a necessidade de recorrer à microscopia eletrônica para diferenciar os dois tipos cicatriciais (ROCKWELL *et al.*, 1989; PLACIK & LEWIS, 1992; TREDGET *et al.*, 1997; NIESSEN *et al.*, 1999).

Por isso, é comum na prática distinguir essas cicatrizes, baseando-se apenas em impressões e evidências clínicas (RUDOLPH, 1987; O'SULLIVAN *et al.*, 1996), contrariamente aos preceitos da patologia, ciência na qual o diagnóstico histopatológico seria hierarquicamente soberano. Corrobora, no caso específico do quelóide, nessa aparente supremacia do diagnóstico clínico, o fato de o histopatologista não ter oportunidade de examinar a lesão *in vivo*, bem como não ter acesso a algumas informações clínicas chaves que, geralmente, o cirurgião deveria ter fornecido.

6.2.3. Metodização da fotomicrografia

Os recursos do *software Image Tool*[®] permitiram visualizar nitidamente os limites a serem medidos. A sobreposição da microrrégua sobre a lâmina possibilitou que a fotomicrografia obtivesse medidas em valor real, bem como que as mensurações fossem realizadas com fração de aproximação de ordem centesimal. As mensurações na seção histológica foram realizadas em lâminas coradas por HE, uma vez que, no preparo pela técnica imuno-

histoquímica por proteína S-100, pode ocorrer desfragmentações nas seções, resultando em artefatos do tipo espaços vazios.

6.3. Sobre os resultados

6.3.1. Fibras nervosas no quelóide

6.3.1.1. Quantificação

O tecido queiloideal apresentou uma quantidade maior de fibras nervosas no tecido conjuntivo, com significância estatística ($p < 0,01$), em comparação com o tecido cutâneo adjacente à lesão. Possíveis fibras nervosas terminais intra-epiteliais não foram contabilizadas, pois poderiam ser confundidas com células dendríticas epiteliais, ou com ramificações dos dendritos de melanócitos, em virtude do alcance da especificidade do método imuno-histoquímico empregado. Sendo o presente estudo analítico inédito na literatura, pode-se, a princípio, cotejá-lo apenas com o estudo descritivo de fibras nervosas em quelóide de KADANOFF (1969), e com os estudos analíticos de fibras nervosas em cicatrizes hipertróficas.

KADANOFF (1969), no relato de três casos de quelóide, observou que existia uma escassa quantidade de fibras nervosas nas lesões. Também relatou que cicatrizes normotróficas seriam mais inervadas que as queiloideais. Analogamente, ALTUN *et al.* (2001), analisando a proliferação de fibras nervosas em cicatrizes por queimadura, relatou que a quantidade dessas fibras em cicatrizes hipertróficas e normotróficas era menor que na pele. Considerando um mecanismo fisiopatológico comum entre o quelóide e a cicatriz hipertrófica, conforme já explicitado, os resultados dos autores desses dois estudos estão em desacordo com os achados de PARKHOUSE *et al.* (1992) e ZHANG & LAATO (2001). Nestes últimos, as cicatrizes hipertróficas apresentaram uma proporção maior de fibras nervosas em relação à pele, que, por sua vez, também foi maior em relação às cicatrizes normotróficas. Assim, os resultados de PARKHOUSE *et al.* (1992) e ZHANG & LAATO (2001) estariam, *a priori*, de acordo com os obtidos no presente estudo utilizando quelóide, e em discordância com os de KADANOFF (1969) e ALTUN *et al.* (2001).

A concordância de resultados deste estudo com PARKHOUSE *et al.* (1992) e ZHANG & LAATO (2001) ainda seria enfatizada se fosse considerado relevante o fato de que, em oito lâminas do presente estudo, o diagnóstico histopatológico foi de cicatriz hipertrófica. E mesmo nessas lâminas houve predomínio da quantidade de fibras nervosas na cicatriz hipertrófica em relação à pele.

No intuito de explicar a menor quantidade de fibras nervosas no quelóide encontrada por KADANOFF (1969), é relevante considerar que foi utilizada, para a identificação das fibras nervosas, a técnica de impregnação pela prata. Nas pesquisas de PARKHOUSE *et al.* (1992) e de ZHANG & LAATO (2001) utilizaram-se as técnicas por imuno-histoquímica e imunofluorescência indireta, respectivamente, bem como, no presente estudo, a técnica por histoquímica, métodos de maior acurácia.

Em consideração aos resultados de ALTUN *et al.* (2001), que também obtiveram uma menor quantidade de terminações nervosas imunocoradas em cicatrizes hipertróficas por queimadura em relação à pele, não haveria, ainda, uma explicação definitiva para essa discordância de resultados. Entretanto, cogitou-se a possível existência de um distinto mecanismo regulador da cicatrização, pelo sistema nervoso cutâneo, em casos de queimadura, talvez por uma destruição maior das terminações nervosas (MUIR, 1990; ALTUN *et al.*, 2001). Provavelmente, esse mecanismo também tenha contribuído na menor quantidade de fibras nervosas encontradas nas lesões queiloideais do relato de KADANOFF (1969), uma vez que as três lesões examinadas também foram ocasionadas por queimadura.

Ainda em relação a estudo de KADANOFF (1969), das três lesões do relato, duas foram obtidas do dorso do pé, tendo ambas o diagnóstico clínico e histopatológico confirmado de quelóide. Chama a atenção o fato de que a região do pé é um local raro de prevalência de quelóide. Além da prática clínica, dois

estudos com considerável casuística, e em regiões geográficas com alta prevalência de quelóide, confirmam essa disparidade. RAMAKRISHNAN *et al.* (1974), no levantamento realizado com 1.000 pacientes no sul da Índia, relataram que o membro inferior sediou 10,4% das lesões, porém não pormenorizando, especificamente, a região do pé. OLUWASANMI (1974), em estudo semelhante na África, acerca de 398 lesões queloideais únicas ou múltiplas por paciente, encontrou na região do pé apenas 1,76%. Portanto, seria possível inferir que no estudo de KADANOFF (1969), as duas lesões do pé poderiam ser cicatrizes hipertróficas, e não queloideais. Corroboraria esse fato a dificuldade, ainda existente na atualidade, de realizar o diagnóstico diferencial, clínico e histopatológico entre essas cicatrizes.

Com base nos achados de neuropeptídeos em cicatrizes hipertróficas (PARKHOUSE *et al.*, 1992; CROWE *et al.*, 1994), inferiu-se que a rede neural nociceptiva cutânea, além da sua função ortodrômica relativa à sensibilidade à dor, estaria associada, por mecanismo antidrômico, a efeitos do Fator de Crescimento Neural (*Neural Growth factor*, NGF). Esse fator, também secretado por queratinócitos, teria aumentado as ramificações e o comprimento das fibras nervosas nociceptivas nessas cicatrizes (SLOMINSKI *et al.*, 1993; TOYODA *et al.*, 1999; TAHERZADEH *et al.*, 2003).

Porém, sabe-se que fibras nervosas em regeneração interagem também com fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Transformador beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF-beta), e o Fator de Crescimento

Derivado de Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF), influenciando no direcionamento e alongamento do crescimento axônico (ZHANG & LAATO, 2001; TAHERZADEH *et al.*, 2003). No caso da cicatriz hipertrófica, e possivelmente no quelóide, no qual existe um aumento tecidual desses fatores, deve ocorrer um reforço no padrão de reinervação. Contudo, são necessários mais estudos para alcançar um maior nível de compreensão desse fenômeno, bem como de suas implicações.

Os estudos de PARKHOUSE *et al.* (1992), CROWE *et al.* (1994), ZHANG & LAATO (2001) e ALTUN *et al.* (2001) compararam a inervação de amostras de cicatriz hipertrófica, de pele e de cicatrizes normotróficas de diferentes pacientes. O presente estudo é inédito à medida que comparou o quelóide com a pele e de forma analítica, uma vez que o relato de casos de KADANOFF (1969) foi apenas descritivo - além de possuir uma casuística maior que a dos estudos citados, é autocomparativo. Por ser constituído por amostras de ambos os tecidos do mesmo paciente, e da mesma região corporal, conteria nos seus resultados informações mais exatas e fidedignas.

6.3.1.2. Profundidade das fibras nervosas

KADANOFF (1969) relatou que as fibras nervosas no quelóide, além de estarem em menor quantidade, praticamente inexistiam no setor central das

lesões com 8 e 10,5 meses de evolução, enquanto a lesão com 44 meses apresentou maior quantidade de fibras nesse setor. No presente estudo, além da maior quantidade de terminações nervosas em relação à pele adjacente, essas terminações também estavam imersas, no tecido conjuntivo, em uma profundidade maior em relação à camada granulosa do epitélio. Escolheu-se essa camada epitelial como parâmetro de referência, por ser a mais superficial e viável da pele. Da mesma forma, a falta de informações prévias a respeito na literatura acarreta a formulação de hipóteses para explicar esse achado no quelóide.

A primeira hipótese decorreria do afastamento centrífugo, a partir da derme reticular, da camada mais superficial da derme e do epitélio pelo crescimento expansivo do quelóide. Tal fato seria corroborado pela tendência crescente de considerar o quelóide uma verdadeira neoplasia benigna, uma vez que apresenta potencial de crescimento autônomo *in vitro* mesmo na ausência dos fatores *in vivo* (PLACIK & LEWIS, 1992).

Porém, as fibras nervosas nos tecidos em geral, inclusive no cutâneo, dispõem-se ao longo de vasos sanguíneos, refletindo a necessidade do suporte de oxigênio e nutrientes, bem como para manter, reciprocamente, o controle fisiológico da vasoconstrição e da vasodilatação. Essa íntima associação morfológica e funcional neurovascular ainda levanta questões sobre a natureza ontogenética desse padrão de ramificação de ambos os sistemas. MUKOUYAMA *et al.* (2002), a partir de pesquisa experimental em animais,

sugerem que os vasos arteriais alinham-se com as fibras nervosas seguindo seu padrão de arborização, fato que não ocorre com vasos venosos. Nessa pesquisa, camundongos mutantes com ausência de inervação sensoria não apresentam diferenciação nas artérias, enquanto naqueles portadores de uma inervação com fibras desorganizadas, a trajetória das ramificações vasculares seguiu o padrão dessas ramificações. O comando vasculotrópico seria controlado pela secreção local do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) pelas fibras sensorias. Utilizando microscopia eletrônica, esse padrão morfológico de paralelismo das ramificações neurovasculares também foi descrito no quelóide por KADANOFF (1969) e por DYER & ENNA (1975).

O crescimento centrífugo do quelóide, sendo este um tecido hipóxico, acarreta uma isquemia mais intensa no setor central, com substituição progressiva da celularidade por fibrose hialina. Essa região torna-se avascular, enquanto a região periférica mantém uma densa rede vascular (APPLETON *et al.*, 1996). Esse fenômeno traduz-se pela presença clínica de uma involução do setor central, de aspecto umbilicado, em lesões queloideais mais antigas, podendo evoluir até uma ulceração por necrose isquêmica (SCHIERLE *et al.*, 1997). Assim, a ausência de vasos na região central do quelóide também poderia, de forma reversa, interromper o processo de ramificação axônico, em sentido à superfície, pela falta de suporte nutricional. Esse mecanismo poderia ser uma segunda hipótese para explicar o fato de as fibras nervosas no quelóide serem mais

profundas, em comparação com as da pele. Porém, mais pesquisas devem ser realizadas para elucidar a origem dessa característica no quelóide, e as possíveis implicações fisiopatológicas, clínicas e terapêuticas.

6.3.2. Melanócitos

6.3.2.1. Quantificação celular

A quantidade de melanócitos, nas amostras de quelóide, foi menor, em termos de significância estatística, em relação às amostras de pele. Esse resultado coincide com estudos referidos na literatura, porém, todos apenas de caráter descritivo (CANARY *et al.*, 1990; DATUBO-BROWN, 1990; PLACIK & LEWIS, 1992; O'SULLIVAN *et al.*, 1996).

O Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor, TNF-alpha*, TNF-alfa), produzido por macrófagos, e também presente na epiderme e derme humana normal, possui uma ação inibitória, de forma dose dependente, na proliferação dos melanócitos e de suas ramificações dendríticas (SLOMINSKI *et al.*, 1993; SLOMINSKI *et al.*, 2004). A Interleucina-1 (*Interleukin-1*, IL-1) e a Interleucina-6 (*Interleukin-6*, IL-6) também inibem o crescimento e a proliferação dessas células (MORELLI & NORRIS, 1993; NIESSEN *et al.*,

1999). Sabe-se que o TNF-alfa, a IL-1 e a IL-6 encontram-se em teores aumentados no tecido queloidal (PLACIK & LEWIS, 1992; KIKUCHI *et al.*, 1995). Assim, uma hipótese para explicar a diminuição de melanócitos no quelóide poderia ser, a princípio, representada pela maior presença desse fator e dessas interleucinas em seu tecido.

No entanto, a epiderme *in vivo* não possui suprimento sanguíneo, portanto, os melanócitos na camada basal da epiderme são mantidos à custa de baixa pressão parcial de oxigênio (pO_2). Essa pressão na junção dermo-epidérmica, em nível fisiológico, oscila em torno de 15 mmHg, ou seja, com cerca de 1% a 3% de oxigênio. Pesquisa experimental demonstrou que uma maior taxa de crescimento dos melanócitos foi observada com uma pO_2 entre 6 a 34 mmHg, correspondendo até a 5% de oxigênio (HORIKOSHI *et al.*, 1991). Se a pO_2 epidérmica, em níveis fisiológicos, é de baixa magnitude, uma segunda hipótese para explicar a inibição da proliferação e crescimento dos melanócitos no quelóide seria pelo fato de esse ser um tecido hipóxico, diminuindo ainda mais a pO_2 local.

In vivo, a hipóxia é um fenômeno que afeta isoladamente o quelóide, uma vez que um aumento da tensão de oxigênio ambiental, ou arterial, não minimiza a hipóxia local (HUNT *et al.*, 1978; ROCKWELL *et al.*, 1989; KEIRA *et al.*, 2004b). Porém, são necessárias mais pesquisas, além dos mecanismos de ação citados, para explicar, de forma completa, a seqüência fisiopatológica pela qual o quelóide apresenta quantidade diminuída de melanócitos.

6.3.2.2. Quantificação da tirosinase

No presente estudo, a quantificação da tirosinase nas amostras de quelóide também demonstrou uma diminuição, com significância estatística, em comparação com as amostras de pele. Esse resultado, sendo também desconhecido da literatura, não permite ser cotejado com outros estudos, portanto, sua explicação apenas pode ser teorizada mediante uma revisão da fisiologia da melanogênese, aplicada aos aspectos microestruturais, bioquímicos e fisiopatológicos conhecidos do quelóide.

Um primeiro mecanismo possível para a diminuição da tirosinase, no quelóide, seria em decorrência de uma elevação no teor de ácido láctico nesse tecido, decorrente da hipóxia causada por oclusão microvascular pela hiperplasia endotelial (KISCHER *et al.*, 1982; SAHL Jr & CLEVER, 1994; KEIRA *et al.*, 2004b). Sendo a tirosinase uma enzima-chave na síntese de melanina, possui inibidores naturais pela necessidade fisiológica de existir mecanismos homeostáticos na melanogênese. O ácido láctico inibe essa enzima em nível transcricional, ou seja, no mRNA da tirosinase (ANDO *et al.*, 1993).

O efeito inibitório do ácido láctico não se deve a uma ação específica ou tóxica para agir como inibidor natural, mas a uma ação genérica própria de ácidos orgânicos. Testes com ácido fórmico e butírico obtiveram resultados semelhantes. Em cultura de melanócitos, a máxima produção de melanina ocorreu a um pH em torno de 6,8, ficando praticamente ausente em um pH

inferior a 5,5 (ANCANS *et al.*, 2001; FULLER *et al.*, 2001). A concentração do ácido láctico naturalmente existente em tecidos e células oscila em torno de apenas 1% daquela necessária para obter o efeito despigmentante descrito (ANDO *et al.*, 1993). Entretanto, não há estudos específicos relativos ao pH do quelóide, o mesmo ocorrendo em relação à concentração do ácido láctico nesse tecido.

No caso do quelóide, além do maior conteúdo de ácido láctico, esse tecido também é rico em ácido hialurônico, uma molécula do grupo das glicosaminoglicanas (GAGs), constituintes da matriz extracelular (ALASH *et al.*, 1995; NIESSEN *et al.*, 1999). O ácido hialurônico, por ser um ácido orgânico, poderia, teoricamente, também apresentar um efeito inibidor na tirosinase. Porém, ainda não existem informações na literatura que confirmem essa ação, ou um possível sinergismo entre o ácido láctico e hialurônico na inibição da tirosinase.

Nesse contexto, a maior importância da acidez local no quelóide, pela hipóxia, seria no sentido de estimular uma hipersecreção de fibras colágenas, que por um mecanismo do tipo “círculo vicioso”, contribuiria para um aumento do tecido queloidal (ANDO *et al.*, 1993; KEIRA, 2003). Assim, as características paucimelanocítica e hipomelanogênica explicadas se apresentariam, *a priori*, apenas como efeitos secundários da acidez local, não existindo nenhuma inter-relação comprovada, ou aparente, de causa-efeito sobre um aumento ou agravamento no quelóide propriamente dito.

Um segundo mecanismo fisiopatológico que contribuiria para a menor atividade da tirosinase no quelóide, em analogia aos melanócitos, seria mediado por aumento de citocinas nesse tecido. O TGF-beta, produzido por melanócitos, queratinócitos, linfócitos-T, monócitos, plaquetas e, em menor grau, pelos macrófagos, fibroblastos e células musculares lisas inibe a melanogênese. Essa ação processa-se, de forma autócrina e parácrina, pela diminuição na produção da tirosinase e da meia-vida intracelular da enzima, sem alterar a quantidade de melanossomos. O TNF-alfa também possui uma ação inibitória na atividade da tirosinase (MORELLI & NORRIS, 1993; SLOMINSKI *et al.*, 1993; BETTINGER *et al.*, 1996; SLOMINSKI *et al.*, 2004). As frações IL-1 alfa e IL-1 beta, e a IL-6, em menor grau, apresentam uma ação inibitória, de forma dose-dependente, na melanogênese da epiderme normal, por diminuir a atividade da tirosinase (MORELLI & NORRIS, 1993; SLOMINSKI *et al.*, 2004).

6.3.3. Fibras nervosas e melanócitos *versus* tempo de evolução das lesões

A taxa da síntese de colágeno em cicatrizes normotróficas é aproximadamente constante entre o período de 6 meses a 20 anos após um ferimento cutâneo. Pesquisa *in vitro* demonstrou que no quelóide e em cicatrizes hipertróficas, a taxa de síntese, medida pela incorporação de hidroxiprolina radioativa (L-[¹⁴C]-prolina) nos primeiros dois a três anos, mantém-se quase duas

vezes maior em relação às cicatrizes normotróficas. Após esse período, essa taxa decresce em torno de 50%, praticamente igualando-se à das cicatrizes hipertróficas. Entretanto, a concentração de colágeno, determinada pela quantidade de hidroxiprolina existente nesses tecidos, aumenta gradativamente, até em torno de quatro anos. A partir desse período, a manutenção do *status* queloideal seria mantida por um decréscimo da atividade colagenolítica (CRAIG *et al.*, 1975).

Por conseguinte, a biossíntese do colágeno no quelóide e cicatrizes hipertróficas estaria vinculada ao tempo evolutivo da cicatriz (CRAIG *et al.*, 1975). À procura de estabelecer uma possível associação entre o tempo de evolução e a quantidade e profundidade das fibras nervosas, bem como em relação à quantidade de melanócitos, arbitrou-se agrupar as amostras de quelóide em dois períodos de tempo evolutivo, conforme a mediana da presente casuística (Apêndice 5.5). Assim, estabeleceu-se um período menor e outro maior (ou igual, inclusive) que seis anos de evolução das lesões, porém não houve significância estatística nessas correlações.

6.4. Perspectivas

6.4.1. Unificação nosológica do quelóide e da cicatriz hipertrófica

Cresce o consenso na literatura que a distinção entre o quelóide e a cicatriz hipertrófica, sob um enfoque clínico, é mais quantitativa que qualitativa, apesar das implicações quanto ao tratamento. Os padrões de mudanças na taxa de síntese e na concentração de colágeno, que ocorrem nessas cicatrizes patológicas, são similares. Assim, essas observações indicariam que os mecanismos patogênicos também seriam similares (CRAIG *et al.*, 1975).

Outros autores consideram quelóide e cicatriz hipertrófica estágios diferentes de um mesmo processo, por isso McGROUTHER (1994) afirmou que, mesmo sob um enfoque histopatológico, a diferença teria uma importância relativa. Para minimizar a controvérsia, esse autor propôs o termo “*HK scars*” (“*Hypertrophic Keloid scars*”), no sentido de reunir esses distúrbios cicatriciais como sendo um único processo patológico.

MUIR (1990) estabeleceu uma classificação dessas cicatrizes patológicas em relação à faixa etária dos pacientes, localização, tempo de evolução e intensidade da atividade clínica das lesões. Correlacionou esses parâmetros, de forma preditiva, deixando implícita uma natureza patogênica comum a esses distúrbios cicatriciais. Com esse intuito, TREDGET *et al.* (1997) também

unificaram essas lesões cicatriciais sob a denominação genérica de “distúrbios fibroproliferativos dérmicos” (“*dermal fibroproliferative disorders*”), e RAHBAN & GARNER (2003) fizeram o mesmo sob a designação de “cicatrices fibroproliferativas” (“*fibroproliferative scars*”).

HOCHMAN et al. (2004c, 2004d) reuniram essas cicatrizes sob uma conceituação sindrômica de “disfunção cicatricial hiperproliferativa”. Para tanto, basearam o enquadramento do quelóide e da cicatriz hipertrófica como sindrômico, pois, apesar de ambos apresentarem um conjunto de sinais e sintomas parecidos, além das mesmas preferências anatômicas e de fatores predisponentes e desencadeantes similares, e de poderem coexistir simultaneamente no mesmo paciente ou no mesmo trajeto cicatricial, possuem evoluções clínicas distintas com condutas terapêuticas próprias. Seriam, assim, manifestações diferentes de um mesmo processo patogênico, inserindo-se em um conceito sindrômico.

O presente estudo, além de ter demonstrado maior quantidade de fibras nervosas no quelóide em relação à pele, apresentou 33,33% dos diagnósticos histopatológicos com laudo de cicatriz hipertrófica (incluindo o laudo de fibrose intersticial), confirmando a dificuldade conceitual em realizar o diagnóstico diferencial clínico e histopatológico (Apêndice 6). Portanto, esses resultados, em conformidade com os obtidos por PARKHOUSE *et al.* (1992) e CROWE *et al.* (1994) em relação às fibras nervosas em cicatrizes hipertróficas, e de acordo com os outros resultados obtidos pelos autores citados, que preconizam uma origem

em comum para as cicatrizes hiperproliferativas, vêm contribuir para a perspectiva da unificação conceitual e nosológica desses distúrbios cicatriciais.

6.4.2. Investigação da participação das fibras nervosas no quelóide

Na lesão cutânea, a recuperação das fibras nociceptivas amielínicas, importantes participantes no desencadeamento do processo cicatricial, é incompleta ou imperfeita em mais de 50% dos casos. Assim, podem resultar em processos cicatriciais patológicos que podem ser acompanhados por disestesias, geralmente hiperálgicas (TAHERZADEH *et al.*, 2003). Essa peculiar suscetibilidade das fibras nervosas nociceptivas impõe que essas fibras sejam mais profundamente investigadas em relação à patogenia das disfunções cicatriciais hiperproliferativas.

Assim, em pesquisas relativas à fisiopatologia do quelóide, não se deveria estudar esse tecido sem a influência de sua inervação, a fim de evitar um provável viés amostral ou de método. Esse viés, teoricamente, esteve presente nas pesquisas experimentais *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais.

Em relação às pesquisas *in vitro*, apesar das importantes informações fisiopatológicas fornecidas pelos estudos em culturas de fibroblastos queiloideais, principalmente quanto ao envolvimento dos fatores de crescimento e citocinas, não houve, até o presente momento, uma elucidação patogênica definitiva acerca

desse distúrbio cicatricial (BASSETT & HERRMANN, 1968; KIKUCHI *et al.*, 1995; BETTINGER *et al.*, 1996; UEDA *et al.*, 1999; GRAGNANI *et al.*, 2003; KEIRA *et al.*, 2004a, 2004c).

Em relação às pesquisas experimentais *in vivo* realizadas em camundongos atímicos, seja na tentativa de formação de um quelóide (CAMPANER, 2005), ou da enxertia dessa lesão nesses modelos animais (SHETLAR *et al.*, 1991), ou na bolsa jugal do *hamster* (HOCHMAN *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, 2005a; FERREIRA & HOCHMAN, 2005; FERREIRA *et al.*, 2005; CEMBRANELLI *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2005; TERASAKA *et al.*, 2005), apesar também dos importantes subsídios de fisiopatologia e bioquímicos *in vivo* fornecidos, apresentaram fatores limitantes comuns. Tais limitações consistiram na falta de criar uma fibrose com arquitetura histológica típica do quelóide no camundongo atímico (CAMPANER, 2005), ou da falta de preservação da composição bioquímica e da arquitetura histológica original após determinado tempo de enxertia, a saber, 60 dias no camundongo atímico (SHETLAR *et al.*, 1991) e 40 dias no *hamster* (HOCHMAN *et al.*, 2003, 2005a). Apesar de esses animais terem permitido a integração do heteroenxerto de quelóide, esse processo de “desqueloidização” não pôde ser explicado pelos pesquisadores. Entretanto, a interrupção de um mecanismo trófico no quelóide, provocado pela sua desnervação no ato da enxertia, poderia explicar o processo involutivo. Por isso, é necessário realizar estudos quanto à interação vaso-nervosa no quelóide. Ainda, apesar da dificuldade imposta pelo fato de o quelóide ser uma doença

exclusiva do ser humano, o presente estudo também demonstra a necessidade de desenvolver meios de investigação, diagnóstica e terapêutica, *in vivo*, no humano, na perspectiva de não isolar o quelóide de sua inervação.

No presente estudo, além da maior quantidade de fibras nervosas no quelóide, houve a nítida impressão de que tais fibras eram mais finas e alongadas que as da pele, embora não tenha sido feita a medição de seus calibres. Essa impressão morfológica coincidiu com aquela apresentada por KADANOFF (1969), possivelmente decorrente da compressão pela intensa compactação fibrótica. Esse aspecto das fibras nervosas, observadas no quelóide, poderia abrir um horizonte de investigação em relação à deflagração do prurido e da dor no quelóide. Portanto, seriam necessários novos estudos relativos à mensuração dimensional dessas fibras, inclusive por método estereológico, bem como estudos qualitativos a respeito dessas mesmas fibras.

6.4.3. Investigação da participação do fator melanocítico no quelóide

Existe um amplo consenso da literatura afirmando que áreas naturalmente mais pigmentadas do corpo humano são mais suscetíveis à formação de quelóide (RAMAKRISHNAN *et al.*, 1974; OLUWASANMI, 1974; ROCKWELL, 1989, SAHL & CLEVER, 1994, O'SULLIVAN *et al.*, 1996). SLOMINSKI *et al.* (2004) afirmam, inclusive, que hipermelanoses podem ser associadas a respostas

inflamatórias, como ocorreria no quelóide. Porém, STARICCO & PINKUS (1957) pesquisaram a quantidade média de melanócitos em pele normal, por área, das diversas regiões do corpo de indivíduos brancos e não-brancos. Relataram, por exemplo, que a média na região torácica anterior foi de 860 melanócitos por mm^2 , região essa com elevada prevalência de quelóide. Em contrapartida, no membro inferior, a média foi de 1.031 melanócitos por mm^2 , região na qual a ocorrência de quelóide é mais rara. Esse aparente contra-senso, em que o local mais freqüente de surgimento de quelóide apresenta menor quantidade de melanócitos que outra região com rara ocorrência, ainda não tem recebido contestação.

Nesse sentido, STARICCO & PINKUS (1957) já haviam chamado a atenção para o fato de que os melanócitos se concentram mais na epiderme, ao longo da junção dermo-epidérmica, sobre as cristas (ou “cumes”) das papilas dérmicas, em relação aos vãos (ou “vales”) interpapilares. Assim, em regiões corporais com revestimento cutâneo mais espesso, e que apresentem maior amplitude das cristas papilares, se originará um efeito óptico no sentido de visualizar essa região como sendo mais pigmentada, ou melhor, mais “pseudopigmentada”. Dessa forma, estudos devem ser realizados no futuro, em relação ao quelóide, a fim de analisar se esse fenômeno óptico poderia ocorrer nas áreas preferenciais onde se desenvolve o quelóide, principalmente na região torácica.

Assim, o presente estudo apresenta uma expectativa de contestar, ao quase dogmático consenso da literatura, a preferência do quelóide de se localizar em áreas mais pigmentadas. Tal contestação tem o intuito de gerar uma reflexão científica a respeito; portanto, pesquisas tornam-se necessárias para esclarecer e encerrar a questão do fator melanocítico no quelóide e, inclusive, quanto à inter-relação entre os melanócitos e fibras nervosas.

6.4.4. Investigação da epiderme no quelóide

Existe também um consenso de que o quelóide seja um distúrbio da camada reticular da derme (OLUWASANMI, 1974; TREDGET *et al.*, 1997). Porém, a epiderme é a camada mais exposta e a primeira a ser atingida por agentes mecânicos ou estressantes ambientais, como a radiação UV, fator envolvido na formação do quelóide (O'SULLIVAN *et al.*, 1996).

Células epidérmicas, como queratinócitos e melanócitos, quando estimuladas, por exemplo, por radiação UV, são fontes parácrinas de NGF para o crescimento e desenvolvimento das fibras nervosas, notadamente as fibras nociceptivas do tipo C e A- δ , participantes primárias no processo cicatricial cutâneo. Assim, em pele exposta à radiação UV, o número de terminações nervosas intra-epidérmicas torna-se maior que na pele protegida. Na face, por exemplo, essa proporção pode ser até dez vezes maior (SLOMINSKI *et al.*, 1993;

TOYODA *et al.*, 1999; TAHERZADEH *et al.*, 2003). Dessa forma, o envolvimento da radiação UV, na predisposição em desenvolver o quelóide, seria pela via do alfa-MSH em promover um aumento da inervação cutânea, e não sobre sua ação pigmentante nos melanócitos. Por isso, a epiderme também deve ser pesquisada em um possível envolvimento na formação do quelóide, conforme também preconizado por RABHAN & GARNER (2003).

As fibras nervosas também constituem a principal fonte de energia bioelétrica na pele, tendo a corrente de lesão um papel primário no processo de cicatrização cutânea (FOULDS & BARKER, 1983; YAMAMOTO, 1994). Portanto, este estudo também projeta a perspectiva de desenvolver pesquisas relativas às funções físico-químicas da barreira epidérmica relacionadas ao desenvolvimento do quelóide.

6.4.4.1. Investigação das fibras nervosas no epitélio do quelóide

O presente estudo analisou as fibras nervosas no tecido conjuntivo do quelóide, por causa da especificidade da reação da proteína S-100. Entretanto, em decorrência da maior quantidade de fibras nervosas encontrada no tecido conjuntivo, e da importância de investigar a participação do epitélio na formação do quelóide, o presente estudo viabiliza a análise das fibras nervosas também nessa camada. Portanto, são necessários novos estudos, no epitélio cutâneo,

utilizando reagentes com maior especificidade, por exemplo, anticorpo monoclonal anti-proteína de neurofilamentos (ZHANG & LAATO, 2001), ou para *Protein Gene Product 9,5* (PGP 9,5) (ALTUN *et al.*, 2001; LIANG *et al.*, 2004).

6.4.5. Investigação neural em cicatrizes hipertróficas pós-queimadura

Considerando uma origem nosológica comum entre o quelóide e a cicatriz hipertrófica, e ambas as lesões possuindo maior quantidade de fibras nervosas que a pele, permanece uma incógnita o fato de cicatrizes hipertróficas por queimadura serem menos inervadas (ALTUN *et al.*, 2001). Cogitou-se num distinto controle da cicatrização, pela maior destruição de fibras nervosas remanescentes na pele circunjacente à área queimada (MUIR, 1990; ALTUN *et al.*, 2001). Nesse contexto, WARD *et al.* (2004) também encontraram menor quantidade de fibras reinervando enxertos de pele sobre áreas queimadas, possivelmente em consequência da destruição neural local. E, de fato, em cicatrizes hipertróficas, decorrentes de incisões cirúrgicas ou ferimentos, sem o acréscimo dos efeitos lesivos pela ação térmica, existe maior abundância de fibras nervosas (PARKHOUSE *et al.*, 1992; ZHANG & LAATO, 2001; LIANG *et al.*, 2004).

Dessa forma, a cicatriz hipertrófica e o quelóide poderiam ter um mecanismo patogênico diferente da cicatriz por queimadura. Por conseguinte, poderia ser preciso criar, futuramente, uma denominação nosológica específica para as cicatrizes hipertróficas advindas por queimadura, para serem passíveis de ter um diagnóstico diferencial com as outras cicatrizes hipertróficas, de caráter francamente neuro-inflamatório. Entretanto, ainda não há na literatura esclarecimentos a respeito. Portanto, o presente estudo abre uma perspectiva, no sentido de investigar diferenças, inclusive na estrutura neural, nas cicatrizes hipertróficas, em relação aos fatores causais, e as possíveis implicações clínicas e terapêuticas pertinentes.

6.5. Considerações finais

O quelóide apresenta uma prevalência que oscila em torno de 1,5% em relação à população, segundo estatísticas nos Estados Unidos. Na África, esse índice atinge cifras de mais de 6% (DUSTAN, 1995). No Brasil, sabe-se que o quelóide é freqüente, apesar de não existirem cálculos precisos a respeito (CANARY *et al.*, 1990; HOCHMAN *et al.*, 2004d). Na Cirurgia Plástica, o quelóide assume sua maior relevância, apesar da crescente tendência da maioria das especialidades cirúrgicas também se preocupar com a estética dos resultados (CANARY *et al.*, 1990; FERREIRA, 1995).

A despeito da primeira documentação científica referente à formação do quelóide ser datada de 1806, por Jean Louis Alibert, e por outros exaustivos trabalhos de pesquisa até o presente momento, a elucidação de sua patogênese ainda é um desafio. Torna-se mister a exploração de novos rumos, sendo essa filosofia a bússola do presente estudo. A impressão final deixada por este trabalho é entusiástica, pela eventualidade de ter encontrado um possível fator neurogênico no quelóide.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

1. O quelóide apresenta maior quantidade de fibras nervosas na derme que a pele.
2. Em nível subepitelial, as fibras nervosas situam-se a uma profundidade maior no quelóide, em relação às da pele.
3. O epitélio do quelóide apresenta menor quantidade de melanócitos em relação ao da pele.
4. O epitélio do quelóide apresenta menor quantidade de tirosinase que o da pele.

Referências

8. Referências

Alaish SM, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. Hyaluronic acid metabolism in keloid fibroblasts. *J Pediatr Surg.* 1995;30(7):949-52.

Altun V, Hakvoort TE, van Zuijlen PP, van der Kwast TH, Prens EP. Nerve outgrowth and neuropeptide expression during the remodeling of human burn wound scars. A 7-month follow-up study of 22 patients. *Burns.* 2001;27(7):717-22.

Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. *J Invest Dermatol.* 1983;81(2):144-8.

Ancans J, Tobin DJ, Hoogduijn MJ, Smit NP, Wakamatsu K, Thody AJ. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2001;268(1):26-35.

Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenic inhibitors. *J Invest Dermatol.* 1993;100(2 Suppl):150S-155S.

Appleton I, Brown NJ, Willoughby DA. Apoptosis, necrosis, and proliferation: possible implications in the etiology of keloids. *Am J Pathol.* 1996;149(5):1441-7.

Bassett CAL, Herrmann I. The effect of electrostatic fields on macromolecular synthesis by fibroblasts in vitro [abstract]. *J Cell Biol.* 1968;39(2 Pt 2):A9.

Basson MD, Burney RE. Defective wound healing in patients with paraplegia and quadriplegia. *Surg Gynecol Obstet.* 1982;155(1):9-12.

Berman B, Bielek HC. Adjunct therapies to surgical management of keloids. *Dermatol Surg.* 1996;22(2):126-30.

Besné I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol*. 2002;138(11):1445-50.

Bettinger DA, Yager DR, Diegelmann RF, Cohen IK. The effect of TGF-beta on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(5):827-33.

Borgens RB. Voltage gradients and ionic currents in injured and regenerating axons. *Adv Neurol*. 1988a;47:51-66.

Borgens RB. Stimulation of neuronal regeneration and development by steady electrical fields. *Adv Neurol*. 1988b;47:547-64.

Bork K, Nagel C. Long-standing pigmented keloid of the ears induced by electrical torture. *J Am Acad Dermatol*. 1997;36(3 Pt 1):490-1.

Campaner AB. TGF- β_1 ativo na formação de fibrose de pele em camundongos atímicos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2005. 147p.

Canary PCV, Fillippo R, Pinto LHP, Aidar S. Papel da radioterapia no tratamento de quelóides: análise retrospectiva de 267 casos. *Rev Bras Cir*. 1990;80(5):291-5.

Carley PJ, Wainapel SF. Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil*. 1985;66(7):443-6.

Cembranelli FAM, Terasaka OA, Martins JL, Michalany NS, Ferreira LM. Quelóide no *hamster* (*Mesocricetus auratus*): início da vascularização na fase de integração [CD-ROM]. In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP; 2005 Jun 20-22; São Paulo. Anais. São Paulo: Pró-Reitoria de Graduação da Universidade Federal de São Paulo; 2005.

Chen W, Fu X, Sun X, Sun T, Zhao Z, Sheng Z. Analysis of differentially expressed genes in keloids and normal skin with cDNA microarray. *J Surg Res*. 2003;113(2):208-16.

Craig RD, Schofield JD, Jackson DS. Collagen biosynthesis in normal and hypertrophic scars and keloid as a function of the duration of the scar. *Br J Surg.* 1975;62(9):741-4.

Crowe R, Parkhouse N, McGrouther D, Burnstock G. Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol.* 1994;130(4):444-52.

Darzi MA, Chowdri NA, Kaul SK, Khan M. Evaluation of various methods of treating keloids and hypertrophic scars: a 10-year follow-up study. *Br J Plast Surg.* 1992;45(5):374-9.

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

Dressler J, Busuttill A, Koch R, Harrison DJ. Sequence of melanocyte migration into human scar tissue. *Int J Legal Med.* 2001;115(2):61-3.

Dustan HP. Does keloid pathogenesis hold the key to understanding black/white differences in hypertension severity? *Hypertension.* 1995;26(6 Pt 1):858-62.

Duve S, Schmoeckel C, Burgdorf WH. Melanocytic hyperplasia in scars. A histopathological investigation of 722 cases. *Am J Dermatopathol.* 1996;18(3):236-40.

Dyer RF, Enna CD. Ultrastructure of keloid: an unusual incident involving lepromatous leprosy. *Int J Dermatol.* 1975;14(10):743-54.

Erdmann WS. Geometric and inertial data of the trunk in adult males. *J Biomech.* 1997;30(7):679-88.

Esteves Junior I, Ferreira LM, Liebano RE. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. *Acta Cir Bras.* 2004;19(6):626-9.

Ferreira LM, editor. Manual de Cirurgia Plástica. São Paulo: Atheneu; 1995.

Ferreira LM, Ferreira LRK. Experimental model. Historic and conceptual revision. Acta Cir Bras. 2003;18(n.spe):1-3.

Ferreira LM, Hochman B. Modelos experimentais para pesquisa em Cirurgia Plástica. In: Marques RG. Técnica operatória e cirurgia experimental. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 833-41.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(supl.2):28-34.

Foulds IS, Barker AT. Human skin battery potentials and their possible role in wound healing. Br J Dermatol. 1983;109(5):515-22.

Fuller BB, Spaulding DT, Smith DR. Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. Exp Cell Res. 2001;262(2):197-208.

Garcia JR, Miranda X, Calderon JA, Cardona M. Resistencia eléctrica de la piel como método auxiliar en el diagnóstico de la depresión. Rev Hosp Psiquiat Habana. 1990;31(2):189-96.

Gorczyca W, Markiewski M, Kram Al. Immunohistochemical analysis of bcl-2 and p53 expression in breast carcinomas: their correlation with Ki-67 growth fraction. Virchows Arch. 1995;426:229-33.

Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Experimental model of cultured keratinocytes. Acta Cir Bras. 2003;18(n.spe):4-14.

Gragnani A, Morgan J, Ferreira LM. Experimental model of cultured skin graft. Acta Cir Bras. 2004;19 Suppl 1:4-10.

Grützkau A, Henz BM, Kirchhof L, Luger T, Artuc M. alpha-Melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000;278(1):14-9.

Haller JA, Billingham RE. Studies of the origin of the vasculature in free skin grafts. *Ann Surg*. 1967;166(6):896-901.

Hazrati BGE, Hoomand A. The keloidal diathesis, a resistant state to malignancies? *Plast Reconstr Surg*. 1977;59(4):555-9.

Hochman B. Integração do enxerto heterólogo de pele humana e quelóide no subepitélio da bolsa jugal do *hamster* [dissertação Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2002.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Investigação do transplante heterólogo de quelóide na bolsa jugal do *hamster* (*Mesocricetus auratus*). *Acta Cir Bras*. 2003a;18(4):266-71.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Integração do enxerto heterólogo de pele humana no subepitélio da bolsa jugal do *hamster* (*Mesocricetus auratus*). *Acta Cir Bras*. 2003b;18(5):415-30.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Experimental model in hamster (*Mesocricetus auratus*) to study heterologous graft of scars and cutaneous diseases in plastic surgery. *Acta Cir Bras*. 2004a;19(supl.1):69-78.

Hochman B, Ferreira LM, Vilas Bôas FC, Mariano M. Hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch as an experimental model to investigate human skin and keloid heterologous graft. *Acta Cir Bras*. 2004b;19(supl.1):79-88.

Hochman B, Ishizuka CK, Ferreira LM, Oliveira LQR, Locali RF. Disfunções cicatriciais hiperproliferativas: cicatriz hipertrófica. *Estima*. 2004c;2(3):32-9.

Hochman B, Locali RF, Oliveira LQR, Ferreira LM. Disfunções cicatriciais hiperproliferativas: quelóide. *Estima*. 2004d;2(4):33-9.

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras*. 2005a;20(supl.2):2-9.

Hochman B, Vilas Bôas FC, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch. *Acta Cir Bras.* 2005b;20(3):200-12.

Horikoshi T, Balin AK, Carter DM. Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1991;96(6):841-4

Hunt TK, Conolly WB, Aronson SB, Goldstein P. Anaerobic metabolism and wound healing: an hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. *Am J Surg.* 1978;135(3):328-32.

Jimbow K, Quevedo WC Jr, Fitzpatrick TB, Szabo G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol.* 1976;67(1):72-89.

Kadanoff D. Über die neurotisation ind innervation der narbenkeloide beim menschen. *Z Haut Geschlechtskr.* 1969;44(21):925-30.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.

Keira SM. Hipóxia em fibroblastos humanos cultivados de derme normal e de quelóide [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2003. 140p.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Barbosa J. Experimental model for collagen estimation in cell culture. *Acta Cir Bras.* 2004a;19 Suppl 1:17-22.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Campaner AB, Durão Jr MS. Experimental model for establishment of hypoxia in 75 cm² culture flasks. *Acta Cir Bras.* 2004b;19 Suppl 1:23-7.

Keira SM, Ferreira LM, Gragnani A, Duarte IS, Santos, IAN. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras.* 2004c; 19 Suppl 1:11-6.

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

Kischer CW, Thies AC, Chvapil M. Perivascular myofibroblasts and microvascular occlusion in hypertrophic scars and keloids. *Hum Pathol*. 1982;13(9):819-24.

Kitchen S, Bazin S. Estimulação elétrica para a cicatrização de feridas. In: Watson T. *Eletroterapia de Clayton*. São Paulo: Manole; 1996. p. 312-36.

Lee SS, Yosipovitch G, Chan YH, Goh CL. Pruritus, pain, and small nerve fiber function in keloids: a controlled study. *J Am Acad Dermatol*. 2004;51(6):1002-6.

Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, et al. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns*. 2004;30(1):57-64.

Liebano RE, Ferreira LM, Sabino Neto M. Experimental model for transcutaneous electrical nerve stimulation on ischemic random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2003;18(n.spe):54-9.

Luger TA. Neuromediators, a crucial component of the skin immune system. *J Dermatol Sci*. 2002;30(2):87-93.

Martins JL, Terasaka OA, Cembranelli FAM, Hochman B, Michalany NS, Ferreira LM. Enalapril no quelóide: estudo experimental em *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) [CD-ROM]. In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP; 2005 Jun 20-22; São Paulo. Anais. São Paulo: Pró-Reitoria de Graduação da Universidade Federal de São Paulo; 2005.

McGrouther DA. Hypertrophic or keloid scars? *Eye*. 1994;8(Pt 2):200-3.

Misery L. The neuro-immuno-cutaneous system and ultraviolet radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000;16(2):78-81.

Morelli JG, Norris DA. Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol*. 1993;100(2 Suppl):191S-195S.

Morgan JE, Gilchrest B, Goldwyn RM. Skin pigmentation. Current concepts and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1975;56(6):617-28.

Muir IFK. On the nature of keloid and hypertrophic scars. *Br J Plast Surg*. 1990;43(1):61-9.

Mukouyama YS, Shin D, Britsch S, Tanigushi M, Anderson DJ. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell*. 2002;109(6):693-705.

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

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

Panescu D, Cohen KP, Webster JG, Stratbucker RA. The mosaic electrical characteristics of the skin. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1993;40(5):434-9.

O'Sullivan ST, O'Shaughnessy M, O'Connor TP. Aetiology and management of hypertrophic scars and keloids. *Ann R Coll Surg Engl*. 1996;78(3 Pt 1):168-75.

Parkhouse N, Crowe R, McGrouther DA, Burnstock G. Painful hypertrophic scarring and neuropeptides [letter]. *Lancet*. 1992;340(8832):1410.

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

Rahban SR, Garner WL. Fibroproliferative scars. *Clin Plast Surg*. 2003;30(1):77-89.

Ramakrishnan KM, Thomas KP, Suandararajan CR. Study of 1.000 patients with keloids in south India. *Plast Reconstr Surg*. 1974;53(3):276-80.

Reis ALN. Principais características das cicatrizes queloidianas. *An Bras Dermatol.* 1994;69(6):495-7.

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

Ronnen M, Sokol MS, Huszar M, Kahana M, Schewach-Millet M. Pseudomelanoma following treatment with surgical excision and intralesional triamcinolone acetonide to prevent keloid formation. *Int J Dermatol.* 1986;25(8):533-4.

Rudolph R. Wide spread scars, hypertrophic scars, and keloids. *Clin Plast Surg.* 1987;14(2):253-60.

Sahl Jr, Clever H. Cutaneous scars: part 1. *Int J Dermatol.* 1994;33(10):681-91.

Santos VNS, Ferreira LM, Horibe EK, Duarte IS. Electric microcurrent in the restoration of the skin undergone a trichloroacetic acid peeling in rats. *Acta Cir Bras.* 2004;19(5):466-70.

Schierle HP, Scholz D, Lemperle G. Elevated levels of testosterone receptors in keloid tissue: an experimental investigation. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(2):390-4.

Shetlar MR, Shetlar CL, Kischer CW, Pindur J. Implants of keloid and hypertrophic scars into the athymic nude mouse: changes in the glycosaminoglycans of the implants. *Connect Tissue Res.* 1991;26(1-2):23-6.

Slominski A, Paus R, Schadendorf D. Melanocytes as "sensory" and regulatory cells in the epidermis. *J Theor Biol.* 1993;164(1):103-20.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1155-228.

Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000;21(5):457-87.

Staricco RJ, Pinkus H. Quantitative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1957;28(1):33-45.

Suetake T, Sasai S, Zhen YX, Ohi T, Tagami H. Functional analyses of the stratum corneum in scars. Sequential studies after injury and comparison among keloids, hypertrophic scars, and atrophic scars. *Arch Dermatol.* 1996;132(12):1453-8.

Taherzadeh O, Otto WR, Anand U, Nanchahal J, Anand P. Influence of human skin injury on regeneration of sensory neurons. *Cell Tissue Res.* 2003;312(3):275-80.

Terasaka AO, Cembranelli FAM, Martins JL, Suchecki D, Michalany NS, Hochman B, et al. Quelóide submetido a estresse na bolsa jugal do *hamster*- estudo morfológico [CD-ROM]. In: XIII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP; 2005 Jun 20-22; São Paulo. Anais. São Paulo: Pró-Reitoria de Graduação da Universidade Federal de São Paulo; 2005.

Toyoda M, Luo Y, Makino T, Matsui C, Morohashi M. Calcitonin Gene-Related Peptide upregulates melanogenesis and enhances melanocyte dendricity via induction of keratinocyte-derived melanotrophic factors. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1999;4(2):116-25.

Tredget EE, Nedelec B, Scott PG, Ghahary A. Hypertrophic scars, keloids and contractures. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):701-31.

Ueda K, Furuya E, Yasuda Y, Oba S, Tajima S. Keloids have continuous high metabolic activity. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104(3):694-8.

Velangi SS, Rees JL. Why are scars pale? An Immunohistochemical study indicating preservation of melanocyte number and function in surgical scars. *Acta Derm Venereol.* 2001;81(5):326-8.

Ward RS, Tuckett RP, English KB, Johansson O, Saffle JR. Substance P axons and sensory threshold increase in burn-graft human skin. *J Surg Res.* 2004;118:154-60.

Weiss DS, Eaglstein WH, Falanga V. Exogenous electric current can reduce the formation of hypertrophic scars. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989;15(12):1272-5.

Weiss DS, Kirsner R, Eaglstein WH. Electrical stimulation and wound healing. *Arch Dermatol.* 1990;126(2):222-5.

Yamamoto Y. Measurement and analysis of skin electrical impedance. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh).* 1994;185:34-8.

Yoshida M, Hirotsu S, Nakahara M, Uchiwa H, Tomita Y. Histamine is involved in ultraviolet B-induced pigmentation of guinea pig skin. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):255-60.

Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H₂ receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol.* 2000;114(2):334-42.

Zhang LQ, Laato M. Innervation of normal and hypertrophic human scars and experimental wounds in the rat. *Ann Chir Gynaecol.* 2001;90 Suppl 215:29-32.

Normas e fontes consultadas

NORMAS E FONTES CONSULTADAS

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [base de dados na Internet]. São Paulo: BIREME; [citado 2005 Nov 17]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Eckert RL, Broome AM, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123(1):23-33.

Haddad N. Metodologia de estudos em ciências da saúde: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico. São Paulo: Roca; 2004.

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. *Acta Cir Bras*. 2005;20(supl.2):19-25.

Houaiss A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0 [CD-ROM]. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the Internet]. Vancouver (CA); update 2004 Oct [cited 2005 Nov 1]. Available from: <http://www.icmje.org/>

Lewin J. Estatística aplicada a ciências humanas. 2a ed. São Paulo: Harbra; 1987.

Michaelis A. Dicionário inglês-português. 25a ed. São Paulo: Melhoramentos; 1997.

National Library of Medicine. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [text on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); c2003 [updated 2005 Sept 19; cited 2005 Nov 17]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

National Library Medicine. List of journals indexed for MEDLINE [monograph on the Internet]. Washington: National Library of Medicine; 2005 Jun [cited 2005 Nov 1]. Available from: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>

Netter FH. Atlas interativo de anatomia humana 2.0 [CD-ROM]. Porto Alegre: Artmed; 1998.

Pellizzon RF, Población DA, Goldenberg S. Pesquisa na área da saúde: seleção das principais fontes para acesso à literatura científica. *Acta Cir Bras*. 2003;18(6):493-6.

Pérez D'Gregorio, R. Sistema Internacional de Unidades SI. *Gac Med Caracas*. 2002;110(4):541-64.

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Como elaborar uma tese [CD-ROM]. São Paulo: CEDCP; 2004.

Remington RD, Schork MA. *Statistics with applications to biological and health sciences*. New Jersey: Prentice-Hall; 1970.

Rey L. *Planejar e redigir trabalhos científicos*. 2a ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1998.

Siegel S, Castellan NJ Jr. *Nonparametric statistics*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 1988.

Federative Committee on Anatomical Terminology. *Terminologia anatômica Internacional*. Tradução da Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia. São Paulo: Manole; 2001.

Spector N. *Manual para a redação de teses, dissertações e projetos de pesquisa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Apêndices

APÊNDICE 1

A.1. ESTRATÉGIAS DE PESQUISA NA LITERATURA

Terminologia: Descritores da Ciência da Saúde (DeCS)

Medical Subject Headings (MeSH)

Atualização mais recente: 10/11/2005

A.1.1. PubMed® (NLM - *National Library of Medicine*)

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi

A.1.1.1. Estratégia: “nerve fibers x keloid”

"keloid" [MeSH Terms] OR "keloid"[All Fields] OR hypertrophic cicatrix OR Cicatrix, Hypertrophic OR "scar hypertrophy"[All Fields] OR ("hypertrophic scar"[All Fields] OR "hypertrophic scar fibroblasts"[All Fields] OR "hypertrophic scar growth"[All Fields] OR "hypertrophic scar keloid formation"[All Fields] OR "hypertrophic scar skin"[All Fields] OR "hypertrophic scar tissues"[All Fields] OR "hypertrophic scars"[All Fields])

AND

nerve fibers OR neural conduction OR nervous system physiology OR neurons OR afferent pathways OR axons OR presynaptic terminals OR synapses OR innervation OR neurons OR neurons afferent OR afferent neurons OR receptors sensory OR sensory receptors OR presynaptic terminals OR nerve endings OR neural conduction OR nerve regeneration

A.1.1.2. Estratégia: “Clinical trial x keloid”

"keloid" [MeSH Terms] OR "keloid"[All Fields] OR hypertrophic cicatrix OR Cicatrix, Hypertrophic OR "scar hypertrophy"[All Fields] OR ("hypertrophic scar"[All Fields] OR "hypertrophic scar fibroblasts"[All Fields] OR "hypertrophic scar growth"[All Fields] OR "hypertrophic scar keloid formation"[All Fields] OR "hypertrophic scar skin"[All Fields] OR "hypertrophic scar tissues"[All Fields] OR "hypertrophic scars"[All Fields])

AND

"clinical trial"[All Fields] OR "clinical trials"[MeSH Terms] OR "controlled clinical trials"[MeSH Terms] OR "controlled clinical trials"[All Fields] OR "prospectives studies"[All Fields] OR "prospective studies"[All Fields] OR "prospective study"[All Fields] OR "randomized"[All Fields] OR "randomized/455"[All Fields] OR "randomized/58"[All Fields] OR "randomized controlled trials"[MeSH Terms] OR "randomized controlled trials/therapeutic use"[MeSH Terms] OR "randomized controlled trials/therapy"[MeSH Terms] OR "randomized controlled trials/utilization"[MeSH Terms] OR "double blind method"[MeSH Terms] OR "double blind clinical trial"[All Fields] OR "double blind comparative clinical trial"[All Fields] OR "double blind comparative multicentre study"[All Fields] OR "double blind comparative study"[All Fields] OR "double blind controlled clinical trial"[All Fields] OR "double blind controlled cross"[All Fields] OR "double blind controlled study versus placebo"[All Fields] OR "double blind controlled trail"[All Fields] OR "double blind controlled trial"[All Fields] OR "double blind controlled trials"[All Fields] OR "double blind crossover"[All Fields] OR "double blind crossover clinical trial"[All Fields] OR "double blind crossover study"[All Fields] OR "double blind crossover trail"[All Fields] OR "double blind crossover trial"[All Fields] OR "double blind method"[All Fields] OR "double blind multi centre trial"[All Fields] OR "double blind multicenter clinical trial"[All Fields] OR "double blind multicenter comparative study"[All Fields] OR "double blind multicenter study"[All Fields] OR "double blind multicenter trial"[All Fields] OR "clinical trials"[MeSH Terms] OR "meta analysis"[MeSH Terms] OR "meta analysis"[All Fields] OR "review literature"[MeSH Terms] OR "meta analysis"[Publication Type] OR "review"[Publication Type]

A.1.1.3. Estratégia: “keloid x melanocyte”

"keloid" [MeSH Terms] OR "keloid"[All Fields] OR hypertrophic cicatrix OR Cicatrix, Hypertrophic OR "scar hypertrophy"[All Fields] OR ("hypertrophic scar"[All Fields] OR "hypertrophic scar fibroblasts"[All Fields] OR "hypertrophic scar growth"[All Fields] OR "hypertrophic scar keloid formation"[All Fields] OR "hypertrophic scar skin"[All Fields] OR "hypertrophic scar tissues"[All Fields] OR "hypertrophic scars"[All Fields])

AND

("melanocyte"[All Fields] OR "melanocyte/fibroblast"[All Fields] OR "melanocyte/melanoma"[All Fields]) OR "melanocytes"[All Fields] OR "melanin"[All Fields] OR "melanine"[All Fields] OR "melanosoma"[All Fields] OR "melanosome"[All Fields] OR "melansomes"[All Fields] OR ("melanophore"[All Fields] OR "melanophores"[All Fields] OR "melanophoro"[All Fields])

A.1.1.4. Estratégia: “tyrosinase x keloid”

"keloid" [MeSH Terms] OR "keloid"[All Fields] OR hypertrophic cicatrix OR Cicatrix, Hypertrophic OR "scar hypertrophy"[All Fields] OR ("hypertrophic scar"[All Fields] OR "hypertrophic scar fibroblasts"[All Fields] OR "hypertrophic scar growth"[All Fields] OR "hypertrophic scar keloid formation"[All Fields] OR "hypertrophic scar skin"[All Fields] OR "hypertrophic scar tissues"[All Fields] OR "hypertrophic scars"[All Fields])

AND

Monophenol Monooxygenase

A.1.2. Outras bases de dados

Estratégia: “busca pelo descritor “quelóide”, seguida por triagem pelos abstracts, ou na ausência dos mesmos, pelos títulos dos artigos, um a um, pelo pesquisador”.

SciELO (*Scientific Electronic Library Online*)

<http://www.scielo.org/index.php?lang=pt>

Lilacs (*Literatura Latinoamericana e do Caribe em Ciências da Saúde*)

<http://www.bireme.br/bvs/P/pbd.htm>

Web of Sciences (*Institute for Scientific Information - ISI*)

<http://www.periodicos.capes.gov.br>

Cochrane (*Biblioteca Cochrane*)

<http://www.centrocochranedobrasil.org/>

OldMedline (1953 a 1965)

http://www.nlm.nih.gov/databases/databases_oldmedline.html

Embase (*Excerpta Médica*) (1996-1997)

<http://www.embase.com/>

PsycInfo (*American Psychological Association*)

<http://www.periodicos.capes.gov.br>

Cynahl

<http://www.cinahl.com/>

APÊNDICE 2

A.2. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa . .
Hospital São Paulo

São Paulo, 28 de maio de 2004.
CEP 0403/04

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) BERNARDO SÉRGIO HOCHMAN RZESZETKOWSKI
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Inervação do quelóide: estudo elétrico-funcional e morfométrico".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Apresentar primeiro relatório parcial em **24/novembro/2004**.
5. Apresentar segundo relatório parcial em **23/maio/2005**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

APÊNDICE 3

A.3. FICHA CLÍNICA DO PROTOCOLO



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Departamento de Cirurgia
Disciplina de Cirurgia Plástica

Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica Reparadora
Coordenadora: Prof^a Dr^a Lydia Masako Ferreira



FIBRAS NERVOSAS E MELANÓCITOS NO QUELÓIDE

IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE

NOME: _____ No _____

DATA NASCIMENTO: ___ / ___ / _____ IDADE: _____ anos RG: _____

ENDEREÇO: _____ No _____ COMPL. _____

BAIRRO: _____ CEP: _____ - _____ CIDADE: _____ UF: _____

TELEFONES: RESID. _____ COM. _____ CEL. _____

E-MAIL: _____

ANAMNESE

ANTECEDENTES PESSOAIS: _____

MEDICAMENTOS: _____

QUELÓIDE

LOCALIZAÇÃO:

() **médio-esternal:** () metade cranial () metade caudal

() **mama:** lado: () D () E

quadrante: () QSL () QSM () QIL () QIM

() **região infraclavicular:** lado: () D () E

() **região deltóide:** lado: () D () E

() **região escapular:** lado: () D () E

Tamanho (> compr. x > largura): _____ x _____ cm

FOTOGRAFIA

CAUSA: _____ **TEMPO DE EVOLUÇÃO:** _____

ATIVIDADE DA LESÃO: () inatividade () atividade:

LEGENDA

0 = ausente
+ = pouco (1 x semana)
++ = médio (alguns dias da semana)
+++ = muito (todos os dias)

CRESCIMENTO REFERIDO

() estável
() crescimento

DOR

() 0
() +
() ++
() +++

PRURIDO

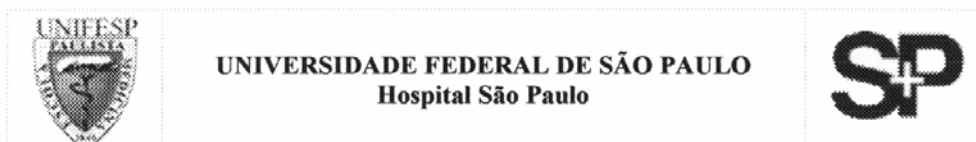
() 0
() +
() ++
() +++

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO (HE): (N^o cadastro Hospital São Paulo: _____)

APÊNDICE 4

A.4. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto de pesquisa

"Fibras nervosas e melanócitos no quelóide"

Informações gerais da pesquisa

Você é portadora de um distúrbio da cicatrização chamado quelóide, e está sendo convidado a participar de um estudo científico. Apesar dos avanços da Medicina, a causa desse tipo de cicatrização volumosa ainda não está esclarecida. Os tratamentos atuais geralmente são apenas preventivos ou corretivos, porém não curativos. Dentre alguns fatores predisponentes, sabe-se que o quelóide é principalmente dependente de características próprias da pessoa.

Entretanto, a Medicina já aceita que as terminações nervosas cutâneas e outras células nervosas da pele possam influenciar o processo de cicatrização. Esse tipo de pesquisa ainda não foi suficientemente esclarecida em trabalhos científicos a nível mundial.

O objetivo desta pesquisa é realizar uma investigação da quantidade de fibras nervosas e melanócitos (células com o pigmento responsável pela cor da pele) existentes num fragmento do quelóide e da pele ao lado da lesão, após a operação.

Você procurou a ambulatório da "Casa da Cirurgia Plástica" ou o ambulatório geral da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) para tratar seu(s) quelóide(s). Você será submetida à retirada cirúrgica do quelóide na parede torácica anterior, seguindo a conduta e técnica operatória consagrada na Cirurgia Plástica e de rotina do serviço, de forma igual a qualquer outro paciente. A seguir, você será encaminhada da mesma maneira a qualquer paciente, ao ambulatório de beta-terapia para continuar o tratamento, em várias sessões, a fim de diminuir a probabilidade do quelóide voltar.

Esta pesquisa científica é um estudo clínico primário (ou seja, original), observacional (ou seja, não é invasivo e não ocorrerá nenhum tipo de intervenção diferente em você, a não ser a retirada cirúrgica do quelóide), analítico (ou seja, os dados coletados serão analisados e comparados de forma estatística) e transversal (ou seja, não haverá continuação ou seguimento posterior). Os avanços na área da saúde ocorrem graças a estudos como este; por isso, a sua participação é importante.

Procedimentos realizados na pesquisa

Você deve chegar uma hora antes do horário previsto para a realização da operação. Após a operação, dois fragmentos (biópsias) da peça operatória serão encaminhados a laboratório externo a UNIFESP-EPM, para realizar exames microscópicos especiais. A peça será então encaminhada para a realização do exame microscópico de rotina, no laboratório de Anatomia-Patológica da UNIFESP-EPM, para confirmação do diagnóstico. Não haverá nenhum tipo de custo econômico para você.

Na seqüência, o médico que lhe operar encaminhará você ao serviço de beta-terapia, e lhe orientará em relação aos curativos, retirada dos pontos e retornos pós-operatórios.

Informações gerais aos pacientes

- Em relação à retirada cirúrgica convencional do quelóide, a operação transcorrerá em regime ambulatorial e sob anestesia local. Os riscos e possíveis complicações são semelhantes aos de qualquer outro procedimento cirúrgico de similar porte. É possível dor (geralmente de intensidade suportável e responsiva aos analgésicos comuns), vermelhidão, inchaço na região, limitação temporária à movimentação, infecção e até abertura da sutura (deiscência). Apesar da boa técnica cirúrgica, dos cuidados pós-operatórios adequados, da beta-terapia e de outros procedimentos complementares, como compressão elástica contínua, aplicação de cremes e/ou pomadas medicamentosas e infiltrações com corticosteroide, pode ocorrer uma recidiva (retorno) do quelóide.
- A princípio, por tratar-se de pesquisa de fatores causais do quelóide e não de possível agente terapêutico, não se espera que o procedimento experimental de medição da impedância bioelétrica possa trazer alguma vantagem na evolução pós-operatória.

- Pelo mesmo motivo, esse procedimento experimental não acarretará prejuízo na evolução pós-operatória.
- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Bernardo Sergio Hochman Rzeszetkowski, CRM-SP 48.986, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, 715, 4º andar, Hospital São Paulo - Disciplina de Cirurgia Plástica, ou pelos telefones (0xx11) 5576-4118 e 5576-4065.
- Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – Cj. 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br
- É garantida a liberdade da retirada deste consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
- O paciente tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- Existe o compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.
- Poderão ser obtidas fotografias do quelóide na parede torácica, sem incluir a face do paciente, que eventualmente serão publicadas em trabalhos científicos impressos ou na Internet, ou expostas em reuniões ou eventos de cunho apenas científico.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Inervação e melanócitos no quelóide: estudo quantitativo".

Eu discuti com o Dr. Bernardo Hochman sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é impresso em duas vias de igual conteúdo, devendo ser assinado pelo pesquisador principal e pelo paciente ou responsável, ficando uma via com cada um.

Assinatura do paciente / representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

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

Dr. Bernardo Hochman
(médico e pesquisador responsável pelo estudo)

Data ____ / ____ / ____

APÊNDICE 5

A5. SOBRE A CASUÍSTICA

Paciente	Idade (anos)	Tempo (anos)	Atividade	Crescimento	Prurido	Dor	Laudo
1	31	10	1	0	1	1	Q
2	32	20	0	0	0	0	Q
3	25	8	1	1	1	1	Q
4	39	6	1	1	0	1	Q
5	34	1	1	1	1	1	CH
6	50	1	1	1	1	1	Q
7	19	3	1	1	1	0	FI
8	46	30	1	0	1	0	Q
9	30	3	1	1	1	1	Q
10	35	20	1	1	1	0	CH
11	35	3	1	1	1	0	Q
12	42	5	1	1	1	1	Q
13	27	10	0	0	0	0	CH
14	27	10	1	1	1	1	Q
15	18	8	1	1	1	0	CH
16	28	12	1	1	1	1	Q
17	26	3	1	0	1	0	Q
18	24	6	1	0	1	0	Q
19	53	1	1	1	1	0	Q
20	25	12	1	1	1	0	CH
21	23	5	1	1	1	1	CH
22	27	7	1	0	0	1	Q
23	48	5	1	1	1	1	Q
24	26	14	1	1	1	1	CH
25	36	10	1	1	1	1	CH
26	16	3	1	1	1	1	Q
27	55	2	1	0	0	1	Q

A.5.1. Sinopse dos pacientes e das lesões.

Descreve-se a idade das pacientes, tempo de evolução das lesões, atividade clínica e os parâmetros de crescimento referido, prurido e dor, e o diagnóstico histopatológico ou laudo.

Legenda:

0 = ausência

1 = presença

Q = quelóide

CH = cicatriz hipertrófica

FI – fibrose intersticial

Idade pacientes (anos)	(n)	(%)	Média	Mediana
15 a 30	14	51,9		
31 a 50	12	44,4		
51 a 55	1	3,7		
Total	27	100,0	32,5	30,0

A.5.2. Distribuição etária das pacientes

Região Torácica Anterior				Região Deltóidea		Região Escapular	
Região Esternal		Região Mamária					
(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
18	66,7	3	11,1	3	11,1	3	11,1

A.5.3. Localização das lesões

Atividade das lesões					
Ativas			Inativas		
(n)		(%)	(n)		(%)
25		92,6	2		7,4
Parâmetros da atividade					
Prurido		Dor		Crescimento	
(n) (%)		(n) (%)		(n) (%)	
22 81,5		16 59,3		19 70,4	

A.5.4. Perfil de distribuição dos parâmetros de atividade clínica das lesões.

Tempo de evolução das lesões	
(Intervalo: 1 a 30 anos)	
Média	Mediana
8 anos	6 anos

A.5.5. Tempo de evolução das lesões

APÊNDICE 6

A.6. FOTOGRAFIA DAS LESÕES

A numeração de cada paciente está assinalada sob a fotografia, com o motivo deflagrador do quelóide no Apêndice A.6.1. (a idade das pacientes e o tempo de evolução das lesões estão descritos no Apêndice A.5.1.). Uma seta aponta a lesão que foi analisada quando houver mais de uma, ou a extremidade da lesão donde se retirou a amostra.



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



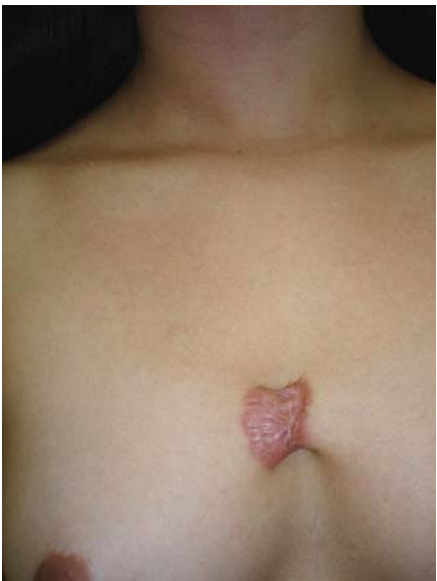
12



13



14



15



16



17



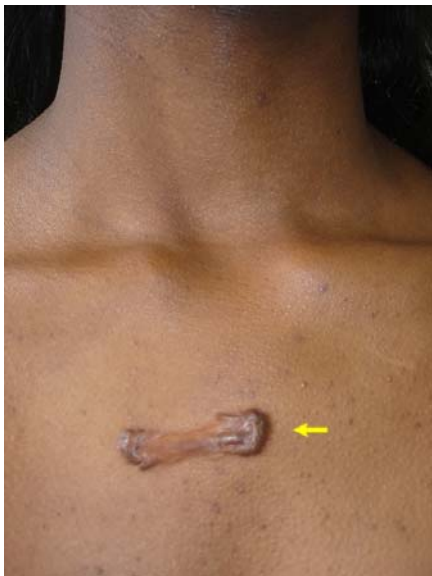
18



19



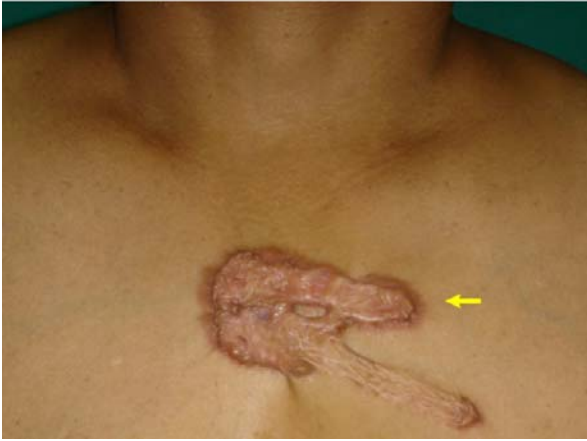
20



21



22



23



24



25



26



27

Paciente	Motivo
1	acne
2	acne
3	depilação com lâmina de barbear
4	acne
5	toracotomia por estenose mitral
6	queimadura com bolsa de água quente
7	acne
8	ferimento por queda acidental
9	acne
10	acne
11	ressecção de nevo
12	acne
13	toracotomia por troca de valva cardíaca
14	acne
15	acne
16	acne
17	acne
18	acne
19	queimadura
20	ferimento com arame
21	acne
22	acne
23	acne
24	acne
25	acne
26	acne
27	queimadura

A.6.1. Motivo deflagador do quelóide em cada paciente.

Anexos

ANEXO 1

Descrição do reagente imuno-histoquímico para proteína S-100

Texto completo disponível em:

http://dist.dako.com/prod_downloadpackageinsert.pdf?objectid=104721002



Polyclonal Rabbit

Anti-S100

Code No./ Code/ Code-Nr. Z 0311

Edition/ Edition/ Ausgabe 13.08.03

Intended use

For in vitro diagnostic use.

Polyclonal Rabbit Anti-S100 is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels cells expressing S100 and is a useful tool for the identification of S100-positive neoplasms, such as malignant melanoma (1, 2), Langerhans' histiocytosis (3), chondroblastoma (4), and schwannoma (5). For differential identification the use of a panel of antibodies is mandatory. A panel of antibodies including Polyclonal Anti-S100, code N^o. Z 0311, has also been applied by the International Lymphoma Study Group for the classification of tumours of suspected histiocytic/dendritic cell type (6). Interpretation of results must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a certified professional.

Introduction

S100 is a multigene family of low molecular weight (Mr between 9 000 and 13 000) Ca²⁺-binding proteins. The family comprises 19 members that are differentially expressed in a large number of cell types. Thus, S100B (previously S100β) is most abundant in glial cells of the central and peripheral nervous system, in melanocytes, chondrocytes, and adipocytes, whereas S100A1 (previously S100A/S100α) is most abundant in cardio-myocytes, slow twitch skeletal muscle cells, salivary epithelial cells, and renal cells. Additionally, S100B is found in tumour cells and subpopulations of neurons, while S100A1 has also been detected in hippocampal neurons. S100A6 is expressed by fibroblasts and smooth and heart muscle cells (5).

Members of the S100 family have been implicated in the Ca²⁺-dependent regulation of a variety of intracellular activities, e.g. protein phosphorylation, cell proliferation (including neoplastic transformation), and differentiation (7).

Reagent provided

Purified immunoglobulin fraction of rabbit antiserum provided in liquid form. In 0.1 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN₃, pH 7.2.

Protein concentration g/L: See label on vial.

The antibody titre variation between different lots is less than 10% as measured by single radial immunodiffusion. This is achieved by adjusting the titre of each individual lot to match the titre of a reference preparation kept at -80 °C.

Immunogen

S100 isolated from cow brain.

Specificity

The antibody has been solid-phase absorbed with human plasma and cow serum proteins.

In crossed immunoelectrophoresis using 50 µL antibody per cm² gel area, no reaction with 2 µL human plasma and 2 µL cow serum is observed. The antibody shows one distinct double peak (S100) with human and cow brain extracts. Staining: Coomassie Brilliant Blue.

In indirect ELISA, the antibody shows no reaction with human plasma and cow serum.

In Western blotting of purified human recombinant S100 proteins, the antibody labels S100B strongly, S100A1 weakly, and S100A6 very weakly. No reaction was observed with the other S100 proteins tested, S100A2, S100A3 and S100A4 (8).

As demonstrated by immunocytochemistry on formalin-fixed tissues, the antibody cross-reacts with the S100 equivalent protein in cat, horse, mouse, rat, and swine. Additionally it reacts strongly with human and cow S100.

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN₃), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.

Storage

Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls

should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.

Specimen preparation

Paraffin sections: The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval Solution, code N^o: S 1700, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0, is recommended. The tissue sections should not dry out during the treatment or the following immunocytochemical staining procedure.

Frozen sections and cell preparations: In frozen sections the highly soluble S100 molecule tends to show aberrant distribution or elute from the tissue.

Staining procedure

Dilution: Polyclonal Rabbit Anti-S100, code N^o: Z 0311, may be used at a dilution of 1:400 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in DakoCytomation Target Retrieval Solution, code N^o: S 1700, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Rabbit Immunoglobulin Fraction (Solid-Phase Absorbed), code No. X 0936, diluted to the same protein concentration as the primary antibody. Unless the stability in the actual test system has been established, it is recommended to dilute the product immediately before use or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code N^o: S 0809.

Visualization: DAKO LSABTM+/HRP kit, code No. K 0679, and DAKO EnVisionTM+ /HRP kits, code N^{os}: K 4008 and K 4010, are recommended.

Automation: The antibody is well suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation Autostainer.

Performance characteristics

Cells labelled by the antibody display staining confined to the cytoplasm.

Normal tissues: Positive labelling with the antibody is observed in some Langerhans' cells and melanocytes of the skin, interdigitating reticulum cells in lymph nodes, medullary epithelial reticular cells in the thymus, chondrocytes in cartilagenous tissue, adipocytes in some, but not other biopsies, myoepithelial cells in salivary glands and breast, folliculostellate cells of the pituitary gland, and Schwann cells and glial cells of nervous tissue. Weak labelling is found in epithelial cells of the mammary and sweat glands. A negative reaction with the antibody is observed in normal hepatocytes, bile duct epithelium, gall bladder epithelium, oesophagus, stomach, and small and large intestinal epithelia, renal epithelia, and urothelial and endothelial cells (9).

Abnormal tissues: Of malignant melanomas, 31/31 (100%) conventional cutaneous, 23/24 (96%) metastatic, including 10 amelanotic, 6/6 desmoplastic, and 1/1 myxoid malignant melanomas were labelled by the antibody. In 30 benign and 15 dysplastic naevi, universal homogenous labelling was seen in all cases (1). In another study of primary malignant cutaneous melanomas (2), 67/67 (100%) were positive with the antibody, including 5/5

spindle cell and desmoplastic tumours. In 27 cases of Langerhans' histiocytosis, 88.5% were labelled by the antibody, this included localized as well as disseminated disease (3). Of 30 chondroblastomas examined, all demonstrated a strong labelling of the chondroblasts with the antibody (4). Of typical benign schwannomas, 12/12 were positive with the antibody, as also 2/4 malignant schwannomas. Of neurofibromas, 6/6 showed weak expression of S100, except for some isolated cells and a number of eel-like cell processes which were distinctively positive (5). Of note is that S100 was expressed by 15 of 133 non-melanocytic primary cutaneous neoplasms, i.e. 7/16 eccrine carcinomas, 2/8 metastatic visceral carcinomas, 2/2 malignant schwannomas, and 4/5 leiomyosarcomas (2). Of primary adenocarcinomas, 24/25 (84%) ovary, 12/15 (80%) salivary gland, 28/36 (78%) endometrium, 15/23 (65%) renal, 12/20 (60%) breast, 7/28 (25%) colon/rectum, 2/10 (20%) stomach, and 2/27 (7%) lung adenocarcinomas were positively labelled by the antibody. Adenocarcinomas of the oesophagus, gallbladder, pancreas and prostate were all negative in this study. Most of the primary neoplasms that expressed S100 were also positive for this protein in metastatic foci (10). Of rhabdomyosarcomas, 7/60 (12%) were labelled by the antibody. The S100-positive tumours were also positive for vimentin and desmin (11).

References

1. Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000;32:475-81.
2. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988;15:201-7.
3. Ye F, Huang S-W, Dong H-J. Histiocytosis X. S-100 protein, peanut agglutinin, and transmission electron microscopy study. *Am J Clin Pathol* 1990;94:627-31.
4. Edel G, Ueda Y, Nakanishi J, Brinker KH, Roessner A, Blasius S, et al. Chondroblastoma in bone. A clinical, radiological, light and immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1992;421:355-66.
5. Gould VE, Moll R, Moll I, Lee I, Schwechheimer K, Franke WW. The intermediate filament complement of the spectrum of nerve sheath neoplasms. *Lab Invest* 1986;55:463-74.
6. Pileri SA, Grogan TM, Harris NL, Banks P, Campo E, Chan JKC, et al. (review). Tumours of histiocytes and accessory dendritic cells: an immunohistochemical approach to classification from the International Lymphoma Study Group based on 61 cases. *Histopathology* 2002;41:1-29.
7. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type (review). *Biochim Biophys Acta* 1999;1450:191-231.
8. Ilg EC, Schäfer BW, Heizmann CW. Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 1996;68:325-32.
9. Vanstapel M-J, Gatter KC, de Wolf-Peters C, Mason DY, Desmet VD. New sites of human S-100 immunoreactivity detected with monoclonal antibodies. *Am J Clin Pathol* 1986;85:160-8.
10. Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Lott RL. S-100 protein expression by primary and metastatic adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 1988;89:168-76.
11. Coindre J-M, de Mascarel A, Trojani M, de Mascarel I, Pages A. Immunohistochemical study of rhabdo-myosarcoma. Unexpected staining with S100 protein and cytokeratin. *J Pathol* 1988;155:127-32.

ANEXO 2

Descrição do reagente imuno-histoquímico para tirosinase

Texto disponível em:

<http://www.labvision.com/pdf/800.pdf>



DATA SHEET Rev 030802F

Tyrosinase Ab-1 (Clone T311) Mouse Monoclonal Antibody

Cat. #MS-800-P0, -P1, or -P (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200 g/ml) (Purified Ab with BSA and Azide)

Cat. #MS-800-P1ABX or -PABX (0.1ml or 0.2ml at 1.0mg/ml) (Purified Ab without BSA and Azide)

Cat. #MS-800-B0, -B1, or -B (0.1ml, 0.5ml, or 1.0ml at 200 g/ml) (Biotin-labeled Ab with BSA and Azide)

Cat. #MS-800-R7 (7.0ml) (Ready-to-Use for Immunohistochemical Staining)

Cat. #MS-800-PCS (5 Slides) (Positive Control for Histology)

Description: Tyrosinase is a copper-containing metalloglycoprotein that catalyzes several steps in the melanin pigment biosynthetic pathway; the hydroxylation of tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa), and the subsequent oxidation of dopa to dopaquinone. Mutations of the tyrosinase gene occur in various forms of albinism. Tyrosinase is one of the targets for cytotoxic T-cell recognition in melanoma patients.

Comments: Ab-1 shows no cross-reaction with MAGE-1 and tyrosinase-related protein 1, TRP-1/gp75.¹ Staining of melanomas with Ab-1 showed tyrosinase in melanotic as well as amelanotic variants.¹ Ab-1 is a useful marker for melanocytes and melanomas. Occasionally a minor band at 55kDa is also detected in Western Blotting.¹

Mol. Wt. of Antigen: 70-80kDa

Epitope: aa 1-433

Species Reactivity: Human, Dog and Cat. Weakly cross-reacts with Mouse. Others-not known.

Clone Designation: T311

Ig Isotype: IgG2a₁

Immunogen: Recombinant tyrosinase protein.¹

Applications and Suggested Dilutions:

- Immunocytology¹
- Immunofluorescence¹
- Western Blotting (Ab 1-2µg/ml for 2hrs at RT)¹
- Immunohistology (Formalin/paraffin)
(Use Ab 2-4µg/ml for 30min at RT)

* Staining of formalin-fixed tissues REQUIRES boiling tissue sections in 1mM EDTA, pH 8.0 (**NEOMARKERS'** Cat. #AP-9004), for 10-20 min followed by cooling at RT for 20 min.)

The optimal dilution for a specific application should be determined by the investigator.

Positive Control: Melanoma cell lines and Melanoma.¹

Cellular Localization: Cytoplasmic

Supplied As: 200 µg/ml of antibody purified from ascites fluid by Protein A chromatography. Prepared in 10mM PBS, pH 7.4, with 0.2% BSA and 0.09% sodium azide. Also available without BSA and azide at 1mg/ml, or Prediluted antibody which is ready-to-use for staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.

Storage and Stability:

Ab with sodium azide is stable for 24 months when stored at 2-8°C. Antibody WITHOUT sodium azide is stable for 36 months when stored at below 0°C.

Key References:

1. Chen Y-T, et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92:8125-8129.

Limitations and Warranty:

Our products are intended FOR RESEARCH USE ONLY and are not approved for clinical diagnosis, drug use or therapeutic procedures. No products are to be construed as a recommendation for use in violation of any patents. We make no representations, warranties or assurances as to the accuracy or completeness of information provided on our data sheets and website. Our warranty is limited to the actual price paid for the product. NeoMarkers is not liable for any property damage, personal injury, time or effort or economic loss caused by our products.

Material Safety Data:

This product is not licensed or approved for administration to humans or to animals other than the experimental animals. Standard Laboratory Practices should be followed when handling this material. The chemical, physical, and toxicological properties of this material have not been thoroughly investigated. Appropriate measures should be taken to avoid skin and eye contact, inhalation, and ingestion. The material contains 0.09% sodium azide as a preservative. Although the quantity of azide is very small, appropriate care should be taken when handling this material as indicated above. The National Institute of Occupational Safety and Health has issued a bulletin citing the potential explosion hazard due to the reaction of sodium azide with copper, lead, brass, or solder in the plumbing systems. Sodium azide forms hydrazoic acid in acidic conditions and should be discarded in a large volume of running water to avoid deposits forming in metal drainage pipes.

For Research Use Only