

VALERIA BERTON LIGUORI ZACCHI

**Estudo da estrutura fibrilar do colágeno nos compartimentos
dérmicos: correlações com perfis epigenéticos em queloides**

SÃO PAULO

2025

VALERIA BERTON LIGUORI ZACCHI

Estudo da estrutura fibrilar do colágeno nos compartimentos dérmicos: correlações com perfis epigenéticos em queloides

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientadora: Dra. Walcy Paganelli Rosolia
Teodoro

SÃO PAULO

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Zacchi, Valeria Berton Liguori

Estudo da estrutura fibrilar do colágeno nos compartimentos
dérmicos : correlações com perfis epigenéticos em queloides / Valeria
Berton Liguori Zacchi; Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, orientador. --
São Paulo, 2025.

Tese (Doutorado) -- Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético. Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo, 2025.

1. Pele 2. Colágeno 3. Queloides 4. Escore histológico 5. Fibrose
6. microRNAs I. Teodoro, Walcy Paganelli Rosolia, orient. II. Título

USP/FM/DBD-557/25

Responsável: Daniela Amaral Barbosa, CRB-8 7533

Nome: ZACCHI, Valeria Berton Liguori

Título: Estudo da estrutura fibrilar do colágeno nos compartimentos dérmicos: correlações com perfis epigenéticos em queloides

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico este estudo primeiramente a Deus, meu guia em todos os momentos e situações de minha vida, alegres ou tristes, fáceis ou desafiadores e que me dá suporte espiritual para seguir na caminhada da vida.

Aos meus amados pais, Gilberto e Bartira, as melhores pessoas que conheço, que são meu esteio, meu exemplo de família, de caráter, de resiliência e de bondade, e que me seguiram desde meus primeiros passos, me formando, apoiando e amando de modo incondicional.

À minha querida irmã Cíntia, que me ensina, todos os dias, sobre saber aceitar as diferenças e ver a felicidade nas pequenas coisas.

Ao meu namorado, Marcelo, exemplo de equilíbrio, dedicação, persistência e resiliência, que me inspira a ser uma profissional e um ser humano melhor a cada dia.

Aos meus avós paternos (“i miei nonni”), Iginio e Gemma, imigrantes italianos, que vieram em busca de um futuro melhor para si e seus descendentes, e que criaram uma linda família em solo brasileiro, cercada de amor (“in memoriam”).

À minha saudosa e amada avó materna, Eponina, uma mulher forte e à frente de seu tempo, que participou ativamente da minha criação, com muito amor, carinho e ensinamentos valiosos, não encontrados em livros (“in memoriam”).

Em especial, à minha querida orientadora Dra. Walcy, exemplo de dedicação à ciência, justiça, retidão, comprometimento e profissionalismo ímpares, que me recebeu e acolheu em seu laboratório, sempre de modo cordial e solícito, me guiando pelos caminhos da pesquisa científica, sem soltar minhas mãos um dia sequer...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Walcy Rosolia Teodoro, que me provocou a descobrir caminhos novos na pesquisa científica, sempre de modo criterioso, carinhoso e didático, acreditando em meu potencial em todos os momentos, e me conduzindo com maestria neste universo.

À doce Dra. Ana Paula Pereira Velosa, pesquisadora dedicada, que com seu espírito calmo e conciliador teve papel fundamental em me ajudar nas pesquisas, revisões, sempre de modo sereno, tornando mais fácil e preciso todo o trabalho científico.

À Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi, que me ajudou na compreensão dos aspectos histopatológicos de meu estudo, sempre de modo brilhante, paciente e cooperativo.

À Dra. Camila Machado, pela parceria e amizade, tendo me auxiliado incansavelmente na elaboração de toda a análise estatística do estudo.

À Dra. Aritania S. Santos, que, com seu vasto conhecimento de biologia molecular, me ajudou a desvendar os mecanismos epigenéticos envolvidos em meu estudo.

Ao Dr. Luiz Henrique Gomes Matheus que, sempre de modo diligente e prestativo, me auxiliou com as análises laboratoriais e estatísticas da expressão dos genes e microRNAs estudados.

Às queridas MSc. Lizandre Keren Ramos da Silveira Ferreira, Thays de Matos Lobo, MSc. Zelita Aparecida de Jesus Queiroz Gama, Jaíne Alves Almeida e MSc. Vitória Elias Contini, pela incansável disponibilidade em repartir conhecimento, por todo o auxílio na realização de análises laboratoriais e na elaboração de partes do estudo, sempre de modo paciente, atencioso e carinhoso.

À Dra. Elita Cruz Silva, querida colega e amiga, que acreditou em meu estudo e tanto me apoiou e me auxiliou com a casuística dos pacientes participantes deste.

Ao Dr. César Isaac, por ter aberto caminhos que permitiram a realização de meu projeto de pesquisa nesta universidade.

Às secretárias da Disciplina de Reumatologia, Mayra de Carvalho e Cláudia Reis de Oliveira, pela colaboração no esclarecimento de dúvidas administrativas da Pós-Graduação.

À Disciplina de Reumatologia, pela oportunidade da realização da execução de meu trabalho.

Aos pacientes que participaram dos grupos de estudo, fornecendo material de grande valia, sem o qual este estudo não teria sido possível.

A todos que, de alguma forma, ajudaram na realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Zacchi VBL. **Estudo da estrutura fibrilar do colágeno nos compartimentos dérmicos: correlações com perfis epigenéticos em queloides.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2025.

Queloides são alterações fibroproliferativas da pele, resultantes de um processo anormal de reparação tecidual, em resposta a fatores causadores de dano cutâneo. Caracterizam-se por uma fibrose dérmica exuberante, com deposição descontrolada de matriz extracelular e remodelamento tecidual persistente. Estima-se que, anualmente, cerca de 10% das novas cicatrizes correspondam a queloides, os quais acometem aproximadamente 2 a 4% da população mundial. Essas lesões causam impacto funcional e estético significativo aos indivíduos afetados e apresentam altas taxas de recorrência, quando tratadas apenas por ressecção cirúrgica. Nosso objetivo foi caracterizar os padrões morfológicos e moleculares associados à fibrogênese queloidiana, integrando análises histológicas, imuno-histoquímicas, bem como perfis de expressão gênica e de microRNAs, em amostras de pele humana. Foram incluídos 26 indivíduos, sendo 20 com diagnóstico clínico e histológico de quelóide e 6 controles com pele normal. A análise histológica revelou espessamento acentuado da derme, substituição da arquitetura normal por feixes de colágeno espessos, hialinizados e predomínio de padrões misto e nodular, conforme o *Keloid Histologic Score (KHS)* proposto. Os maiores escores foram observados para vascularização, alterações epidérmicas e desorganização fibrilar, indicando remodelamento ativo da matriz e interação dermoepidérmica. As lesões queloidianas apresentaram aumento significativo da expressão do colágeno dos tipos I, III e V, especialmente nas regiões papilares, acompanhado pelo aumento da expressão dos genes, *COL1A1*, *COL3*, *COL5A1* e *COL5A2* mRNAs, bem como dos microRNAs miR-21-5p e miR-199a-3p. O colágeno tipo V se destacou como um marcador diferencial entre pele normal e quelóide, correlacionando-se com escores elevados de desorganização, hialinização e celularidade. As correlações positivas entre os tipos de colágeno dérmico, microRNAs e genes fibrogênicos, sugerem um eixo de regulação coordenada da fibrose dérmica, no qual o miR-21-5p e o miR-199a-3p potencializariam a expressão de genes estruturais e contribuiriam para o remodelamento persistente da matriz

dérmica. O gradiente morfo-molecular identificado, da matriz rica em colágeno tipo III, até a hialinizada, com predomínio de colágeno tipos I/IV, reflete diferentes estágios de maturação do quelóide. Nossos achados demonstram que o escore KHS é um indicador sensível da atividade histológica e molecular do quelóide e reforçam o papel do colágeno tipo V e dos microRNAs miR-21-5p e miR-199a-3p como potenciais biomarcadores de progressão fibrótica e alvos terapêuticos no remodelamento dérmico patológico.

Palavras-chave. Pele. Colágeno. Quelóide. Escore histológico. Fibrose. microRNAs.

ABSTRACT

Zacchi VBL. **Study of the fibrillar structure of collagen in dermal compartments: correlations with epigenetic profiles in keloids.** [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2025.

Keloids are fibroproliferative skin scars, resulting from an abnormal tissue repair process in response to skin damage. They represent an exuberant form of dermal fibrosis characterized by uncontrolled extracellular matrix deposition and persistent tissue remodeling. Keloids account for approximately 10% of new scars annually, affecting roughly 2 to 4% of the world's population. These scars have a significant negative impact, both functionally and aesthetically, on those affected, and exhibit high recurrence rates after surgical resection alone. This study aimed to characterize the morphological and molecular patterns associated with keloid fibrogenesis by integrating histological and immunohistochemical analyses, as well as gene expression and microRNA profiles in human skin samples. The cohort comprised 26 individuals, including 20 with clinically and histologically confirmed keloids and 6 controls with normal skin. Histological evaluation revealed marked dermal thickening, replacement of normal architecture by thick, hyalinized collagen bundles, and predominance of mixed and nodular patterns according to the proposed *Keloid Histologic Score (KHS)*. The highest scores were observed for vascularization, epidermal alterations and fibrillar disorganization, consistent with active matrix remodeling and epidermal–dermal interaction. Keloid lesions showed significant overexpression of types I, III and V collagen, particularly in papillary dermis, accompanied by upregulation of *COL1A1*, *COL3*, *COL5A1*, and *COL5A2* mRNAs, as well as the microRNAs miR-21-5p and miR-199a-3p. Type V collagen emerged as the most characteristic biomarker between keloid and normal skin, correlating with higher scores of disorganization, hyalinization, and cellularity. The positive correlations among dermal collagen types, microRNAs and fibrogenic genes suggest a coordinated regulatory axis of dermal fibrosis, in which miR-21-5p and miR-199a-3p would enhance structural gene expression and contribute to persistent extracellular matrix remodeling. The identified morpho-molecular gradient, from a loose, type III collagen-rich matrix to a densely hyalinized matrix dominated by types I and V collagen, represents sequential

stages of keloid maturation. Taken together, these findings show that the KHS score is a sensitive indicator of keloid histologic and molecular activity and highlight type V collagen and microRNAs miR-21-5p and miR-199a-3p as potential biomarkers of fibrotic progression and therapeutic targets in pathological dermal remodeling.

Keywords: Skin. Collagen. Keloid. Histological score. Fibrosis. microRNAs.

LISTA DE IMAGENS

<i>Figura 1 - Cicatrizes queloidianas em diferentes topografias</i>	25
<i>Figura 2 - Principais fatores etiopatogênicos dos queloides</i>	26
<i>Figura 3 - Desenho esquemático da anatomia cutânea.</i>	29
<i>Figura 4 - Desenho esquemático da montagem das fibras de colágeno tipo I.</i>	37
<i>Figura 5 - Classificação dos tipos de colágeno com base nas principais formas de organização supramolecular.</i>	38
<i>Figura 6 - Ilustração esquemática da síntese, secreção e reticulação de fibrilas de colágeno.</i>	40
<i>Figura 7 - Estrutura molecular do Colágeno tipo I.</i>	43
<i>Figura 8 - Estrutura molecular do Colágeno Tipo III</i>	45
<i>Figura 9 - Estrutura molecular do Colágeno Tipo V</i>	48
<i>Figura 10 - Alterações na MEC e potenciais alvos terapêuticos.</i>	54
<i>Figura 11 - Representação esquemática do mecanismo de ação do microRNA.</i>	64
<i>Figura 12A - Representação histológica dos critérios morfológicos utilizados para a atribuição dos escores de epiderme, vascularização e inflamação na pele</i>	81
<i>Figura 12B - Representação histológica dos critérios morfológicos utilizados para a atribuição dos escores de organização, espessura, hialinização e celularidade da derme em cortes corados com Tricrômico de Masson.</i>	82
<i>Figura 13 - Quantificação das fibras de colágeno pela imunofluorescência.</i>	85
<i>Figura 14 - Análise histológica das amostras de pele com quelóide e pele normal.</i>	96
<i>Figura 15 - Fotos representativas da imunofluorescência para colágeno dos tipos I (Col I), III (Col III) e V (ColV)</i>	109
<i>Figura 16 - Representação gráfica da relação entre a expressão dos marcadores moleculares de interesse nos grupos estudados</i>	113
<i>Figura 17 - Representação gráfica da relação entre o padrão de organização das fibras colágenas e a expressão proteica e gênica de colágeno tipo V nos grupos estudados</i>	114
<i>Figura 18 - Representação gráfica da relação entre a espessura das fibras colágenas e a expressão proteica de colágeno tipo III nos grupos estudados</i>	115
<i>Figura 19 - Representação gráfica da relação entre o padrão de hialinização do colágeno e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados</i>	116
<i>Figura 20 - Representação gráfica da relação entre a celularidade (células mesenquimais) e a expressão proteica nos grupos estudados</i>	117
<i>Figura 21 - Representação gráfica da relação entre o padrão de vascularização cutânea e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados</i>	119

<i>Figura 22 - Representação gráfica da relação entre o padrão de infiltrado inflamatório e a expressão gênica nos grupos estudados</i>	<i>120</i>
<i>Figura 23 - Representação gráfica da relação entre o padrão de alteração epidérmica e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados</i>	<i>121</i>
<i>Figura 24 - Correlograma mostrando correlações de Spearman entre os tipos de colágeno dérmicos, microRNAs e genes codificadores de colágeno no grupo quelóide</i>	<i>123</i>

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nos estudos de imunofluorescência</i>	84
<i>Tabela 2 - Componentes utilizados na reação de transcrição reversa e seus respectivos volumes.</i>	87
<i>Tabela 3 - Protocolo de ciclagem das amostras de MIX, primer e RNA para a reação de RT.</i>	87
<i>Tabela 4 - Ensaio (alvos /endógenos) do estudo.</i>	88
<i>Tabela 5 - Componentes utilizados para a reação da PCR e seus respectivos volumes.</i>	88
<i>Tabela 6 - Protocolo de processamento da reação RT-qPCR.</i>	89
<i>Tabela 7 - Componentes utilizados na reação de transcrição reversa e seus respectivos volumes.</i>	89
<i>Tabela 8 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados, por RT-qPCR</i>	90
<i>Tabela 9 - Componentes utilizados para a reação qRT-PCR e seus respectivos volumes</i>	91
<i>Tabela 10 - Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo</i>	94
<i>Tabela 11 - Distribuição dos escores individuais do KHS</i>	97
<i>Tabela 12 - Distribuição do escore de organização das fibras colágenas segundo características clínicas</i>	99
<i>Tabela 13 - Distribuição do escore de espessura das fibras colágenas segundo características clínicas</i>	100
<i>Tabela 14 - Distribuição do escore de hialinização segundo características clínicas</i>	101
<i>Tabela 15 - Distribuição do escore de celularidade segundo características clínicas</i>	102
<i>Tabela 16 - Distribuição do escore de vascularização segundo características clínicas</i>	104
<i>Tabela 17 - Distribuição do escore de infiltrado inflamatório segundo características clínicas</i>	105
<i>Tabela 18 - Distribuição do escore de alterações epidérmicas segundo características clínicas</i>	106
<i>Tabela 19 - Expressão mediana de colágeno e marcadores moleculares na coorte estudada</i>	111
<i>Tabela 20 - Expressão mediana dos marcadores nos diferentes grupos de estudo</i>	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
ALDH1	Aldeído desidrogenase 1
AT1	Receptores de angiotensina I
AT2	Receptores de angiotensina II
BSA	Albumina Sérica Bovina
CALU	Calumenina
CD	Células dendríticas
CD20	Marcador específico de linfócitos B
CD3	Marcador de linfócitos T
CDK17	Quinase 17 dependente de ciclina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
circRNA	RNA circular
Col I	Colágeno tipo I
Col III	Colágeno tipo III
Col V	Colágeno tipo V
Col	Colágeno
<i>COL1A1</i>	Gene do colágeno tipo I cadeia alfa 1
<i>COL1A2</i>	Gene do colágeno tipo I cadeia alfa 2
<i>COL3A1</i>	Gene do colágeno tipo III cadeia alfa 1
<i>COL4A2</i>	Gene do colágeno tipo IV cadeia alfa 2
<i>COL5A1</i>	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 1
<i>COL5A2</i>	Gene do colágeno tipo V cadeia alfa 2

CXCL1	Ligante 1 da quimiocina com motivo C-X-C
CXCR2	Receptor 2 de quimiocina com motivo C-X-C
D2-40	Podoplanina
DM2	Diabetes tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Derme papilar
DR	Derme reticular
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ES	Esclerose sistêmica
<i>FBN1</i>	Gene codificador da proteína fibrilina-1
FGF- β	Fator de crescimento do fibroblasto β
Fn-EDA	Extra domínio A da fibronectina
FPI	Fibrose pulmonar idiopática
<i>GAPDH</i>	Gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HE	Hematoxilina e Eosina
Hh	Hedgehog
HIF-1 α	Fator induzível por hipóxia 1 alfa
HLA	Antígeno leucocitário humano
IGF-I	Fator de crescimento insulina-símile
IL	Interleucina
INF- α	Interferon alfa
INF- β	Interferon beta

INF- γ	Interferon gama
IQR	Intervalo interquartil
IRF5	Fator Regulador de Interferon 5
JAK	Janus quinase
JAK/STAT	Janus Quinase / Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KHS	<i>Keloid Histologic Scar</i>
<i>LAMA1</i>	Gene da laminina $\alpha 1$
LEF	Fator intensificador linfoide
lncRNA	RNA não codificador de cadeia longa
LOX	Lisil-oxidase
LOXL	Semelhante à lisil oxidase
LYVE-1	Receptor 1 de hialuronan do endotélio de vasos linfáticos
MAP3K11	Proteína quinase 11 ativada por mitógenos, do tipo MAP3K
MAPK	Proteína quinase mitógeno ativada
MEC	Matriz Extracelular
miR	microRNA
miRNA	microRNA
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	Alvo mecanístico da Rapamicina
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NICD	Domínio intracelular do Notch

PA	Pró-análise
p-AKT	Via AKT fosforilada
PBS	Solução salina tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>PDCD</i>	Gene da morte celular programada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRL	Proteína receptora-símile de fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PPI	Interações proteína-proteína
Pro- α 1(III)	Cadeia pró-alfa-1 do colágeno tipo III
Pro- α 1(V)	Cadeia pró-alfa-1 do colágeno tipo V
Pró- α 2(I)	Cadeia pró-alfa-2 do colágeno tipo I
PRP	Plasma rico em plaquetas
<i>PTEN</i>	Gene fosfatase e tensina homólogo deletadas no cromossomo 10
RCN	Reticulocalbina
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real por transcriptase reversa
siRNA	RNA de interferência pequeno
SLRP	Proteoglicano pequeno rico em leucina
STAP	Proteína associada à ativação de células estreladas
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição

TCF	Fator de célula T
TG	Transglutaminase
TGF β	Fator de crescimento transformador beta
Th	Linfócito T auxiliar
TIAM1	Invasão e metástase do linfoma de células T1
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF	Fator de necrose tumoral
<i>TPM1</i>	Gene da tropomiosina 1
Treg	Células T reguladoras
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas
UVB	Radiação ultravioleta B
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
XBP1	Proteína ligadora de X-box 1
YAP–mTOR	Via de sinalização <i>Yes-associated protein / mammalian target of rapamycin</i>
α 1(V)	Cadeia alfa 1 do colágeno tipo V
α 1(V) ₃	Homotrímero do colágeno tipo V
α 2(V)	Cadeia alfa 2 do colágeno tipo V
α MSH	Hormônio estimulador de α -melanócitos
α -SMA	Alfa actina de músculo liso

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
α1	Cadeia alfa 1
α2	Cadeia alfa 2
γ	Gama
mm	Milímetro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
N	Normalidade (mol)
μL	Microlitro
ng	Nanograma
μg	Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	23
1.2. ARQUITETURA CUTÂNEA E COMPOSIÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC).....	27
1.2.1. EPIDERME	30
1.2.2. DERME	31
1.2.3. HIPODERME	33
1.2.4. ANEXOS EPIDÉRMICOS	33
1.2.5. A MATRIX EXTRACELULAR NA PELE	33
1.2.5.1. Colágeno: Estrutura e Função na Pele Humana	36
1.2.5.1.1. Características gerais	36
1.2.5.1.2. O Colágeno dos Tipos I, III e V na Homeostase Tecidual	42
1.3. PATOGÊNESE E A MEC NOS QUELOIDES	49
1.3.1. ASPECTOS GERAIS	49
1.3.2. FIBRILOGÊNESE DO COLÁGENO NO TECIDO QUELOIDIANO	59
1.3.3. REGULAÇÃO EPIGENÉTICA - MICRORNAs E O PROCESSO DE FIBROSE TECIDUAL	62
1.3.3.1. Os microRNAs 21 (miR-21) e 199 (miR-199) e sua relação com as cicatrizes queloidianas	69
1.4. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	72
2. OBJETIVOS DO ESTUDO.....	77
2.1. OBJETIVO GERAL	77
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	77
3. MATERIAL E MÉTODOS	78
3.1. LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	78
3.2. ASPECTOS ÉTICOS	78
3.3. SELEÇÃO DE PACIENTES	78
3.4. COLETA E PROCESSAMENTO DO TECIDO	79
3.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	79
3.5.1. SCORE HISTOLÓGICO SEMIQUANTITATIVO	80
3.6. IMUNOMARCAÇÃO PARA COLÁGENO.....	83
3.6.1. IMUNOFLOUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPOS I, III E V	83

3.6.2. AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	84
3.7. EXPRESSÃO GÊNICA	85
3.7.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	85
3.7.2. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E GRAU DE PUREZA DAS AMOSTRAS.....	86
3.7.3. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA – MICRORNAS (RT).....	87
3.7.4. REAÇÃO PCR EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	88
3.7.5. METODOLOGIA RT (TRANSCRIÇÃO REVERSA) – MRNA (CDNA).....	89
3.7.6. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR.....	90
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	91
 <u>4. RESULTADOS</u>	 <u>93</u>
 4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES	 93
4.2. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE QUELOIDE.....	94
4.2.1. ESCORES HISTOLÓGICOS	97
4.2.1.1. Escores histológicos e características clínicas.....	98
4.2.1.1.1. Organização das fibras colágenas	98
4.2.1.1.2. Espessura das fibras colágenas	99
4.2.1.1.3. Hialinização do colágeno	100
4.2.1.1.4. Celularidade (células mesenquimais fusocelulares)	101
4.2.1.1.5. Vascularização.....	103
4.2.1.1.6. Infiltrado inflamatório.....	104
4.2.1.1.7. Alterações epidérmicas.....	105
4.3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO DOS TIPOS I, III E V NOS QUELOIDES	106
4.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>COL1A1</i> , <i>COL3A1</i> , <i>COL5A1</i> E <i>COL5A2</i> , E DOS MICRORNAS 21-5P E 199A-3P NO TECIDO QUELOIDIANO	110
4.5. ANÁLISE COMPARATIVA DO COLÁGENO, MARCADORES MOLECULARES E MICRORNAS ...	111
4.6. CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E MARCADORES MOLECULARES .	114
4.7. ASSOCIAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS	122
 <u>5. DISCUSSÃO</u>	 <u>124</u>
 <u>6. CONCLUSÕES</u>	 <u>148</u>
 <u>REFERÊNCIAS</u>	 <u>149</u>
 <u>ANEXO.....</u>	 <u>173</u>

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

As cicatrizes queloidianas (ou queloides), em conjunto com as cicatrizes hipertróficas, constituem alterações fibroproliferativas da pele resultantes de um processo anormal de reparação tecidual dérmico, frente a um trauma ou irritação local [1], com consequente deposição excessiva de matriz extracelular (MEC) [2,3].

Os queloides, anteriormente conhecidos como tumores “cancróides da pele” foram renomeados para “cheloïde” ou “keloïde” por Jean Louis Alibert, pai da Dermatologia francesa, em referência à palavra grega “χηλι” (khçlçé) ou “garra de caranguejo”, acrescida do sufixo -oide, com significado de “semelhante à”[4] ocorrem, exclusivamente, na espécie humana [5], sendo mais frequentes entre indivíduos de etnia africana subsaariana [6], seguido por asiáticos e hispânicos, e menos comum em caucasianos [7]. As taxas registradas em diferentes países variam amplamente: 0,09% na Inglaterra, 0,10% no Japão, 8,5% no Quênia, 9% na Zâmbia e 16% no Zaire, situando-se entre 4,5% e 16% em populações hispânicas e afro-americanas, respectivamente [6].

Estudos anteriores demonstram que essas alterações cicatriciais apresentam prevalência de aproximadamente 2,4% em populações negras, 1,1% em asiáticos e 0,4% em caucasianos [8]. Estimativas mais recentes, de 2023, sugerem que essa condição afete de 2 a 4% da população mundial, o que corresponde a cerca de 150 a 300 milhões de pessoas [9]. Além disso, calcula-se que aproximadamente 100 milhões de pessoas desenvolvam novas cicatrizes a cada ano, sendo que, em torno de 10% desses casos, evoluem para a formação de queloides.

Há evidências que apontam uma maior predisposição ao desenvolvimento de queloides em mulheres. Quanto à faixa etária, a maioria dos casos ocorre em adolescentes e adultos jovens, especialmente entre 10 e 30 anos [8], sendo menos frequente em bebês e crianças pequenas [6]. Além disso, alguns estudos sugerem um aumento na prevalência dessas cicatrizes durante a gestação [10,11]. Essas cicatrizes podem se desenvolver em tempo bastante variável,

desde dentro do primeiro ano após a lesão cutânea, o que ocorre na maior parte dos casos, até cerca de 25 anos após [12].

A literatura indica que as cicatrizes queloidianas constituem uma condição de origem multigênica, envolvendo diferentes genes, que podem variar entre distintas populações [13]. Tsai et al., 2019, sugerem que a predisposição genética para o desenvolvimento dessas cicatrizes, pode seguir um padrão de herança autossômica dominante com penetrância incompleta [1]. Além disso, há indícios de associação entre algumas condições sistêmicas como hipertensão, deficiência de vitamina D e dermatite atópica, com um maior risco de formação de cicatrizes queloidianas [8,14–16].

As cicatrizes queloidianas se caracterizam, clinicamente, por exceder os limites do sítio inicial da ferida que as originaram, muitas vezes, após vários meses ou anos do evento inicial [17,18], devido ao acúmulo de componentes da matriz extracelular (MEC), especialmente de colágeno [18], com áreas de fibras espessadas, que conferem as características clínicas presentes nos indivíduos acometidos [19]. São descritos, pelo menos, dois fenótipos das cicatrizes queloidianas, o queiloide mais plano, superficial e espalhado, com aspecto de placa, e o abaulado/elevado, com aspecto de pápula ou nódulo [4,20]. São cicatrizes de consistência usualmente endurecida, [19], com coloração vermelho brilhante ou lilás [21].

Os queloides ocorrem, frequentemente e de modo imprevisível, após episódios de trauma ou inflamação [17]. Apesar de histologicamente benignos, são proeminentes em tamanho e coloração, podendo ser pruriginosos, dolorosos e causar sensação de formigamento [21], queimação, além de importantes alterações estéticas e funcionais, incluindo, nestas últimas, limitação do movimento articular, nos casos mais graves [7,18,22]; deste modo, embora o óbito decorrente desta doença possa ser descartado, sua morbidade é alta [18]. Além dos sintomas físicos, muitos pacientes com queloides de grandes dimensões apresentam quadros de ansiedade, depressão e dificuldades em suas relações interpessoais [20].

Sitaniya et al., 2022, observaram que a gravidade do queiloide apresenta uma correlação moderada, porém significativa, com a qualidade de vida dos

pacientes. Sintomas como prurido, dor e limitação de mobilidade contribuem de forma relevante para o impacto negativo nessa qualidade de vida [23]. As áreas de maior ocorrência destas cicatrizes anômalas são a parede anterior do tórax, ombros, dorso superior, região cervical posterior e lóbulos de orelhas (Figura 1 A e 1 B) [10,18].

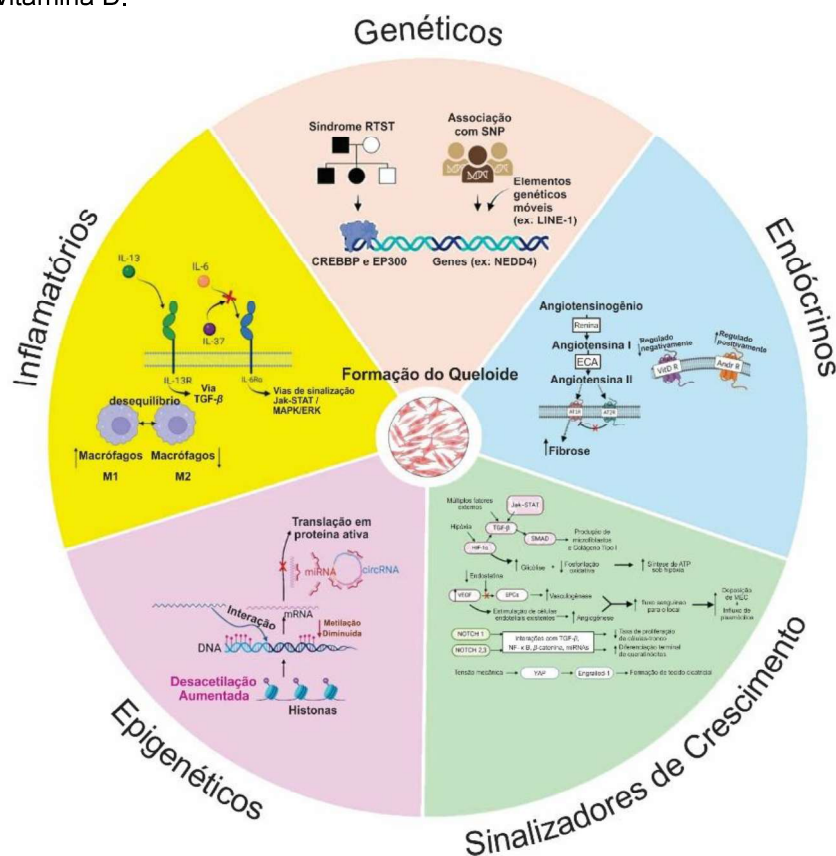
Figura 1 - Cicatrizes queloidianas em diferentes topografias - Em (A): Cicatriz queloidiana em região pré-esternal em paciente do grupo de estudo. Nota-se fenótipo mais achatado, hiperêmico, brilhante e espalhado desta cicatriz, com grande impacto estético local; em (B): verifica-se outro fenótipo, de característica multinodular e acastanhada, de origem em lóbulo de orelha esquerda, porém se estendendo por quase todo o pavilhão auricular ipsilateral, igualmente com grande deformidade e impacto estético negativo local.



Os queloides não regredem com o tempo e tendem a recidivar após ressecção cirúrgica. Dados da literatura apontam que a ressecção isolada da cicatriz queloidiana, sem tratamentos adjuvantes, apresenta taxa de recorrência de 55-100%, com possibilidade de evolução para uma cicatriz de pior qualidade após exérese [4,10]. Embora não apresentem metástase, esses tecidos compartilham diversas características de tumores, como suscetibilidade genética, proliferação celular descontrolada, comportamento agressivo, resistência a tratamentos e altas taxas de recorrência. Dessa forma, podem assumir uma condição patológica mais complexa, deixando de ser consideradas apenas simples cicatrizes [6].

Sabe-se que não há um único mecanismo responsável pelo desenvolvimento dessa doença. Trata-se de uma condição de etiologia multifatorial, na qual se reconhecem a participação de fatores mecânicos, hipóxia tecidual, hipersensibilidade tardia, disfunções metabólicas, resposta inflamatória crônica, bem como componentes autoimunes, vasculares e genéticos. Além disso, destacam-se o envolvimento de fatores de transcrição, e crescimento, citocinas, proteínas da matriz extracelular e seus respectivos reguladores, que atuam na manutenção e progressão da doença (**Figura 2**) [14,19].

Figura 2 - Principais fatores etiopatogênicos dos queloides - O diagrama ilustra os 5 principais fatores patogênicos que contribuem para a formação de queloides: genética (interação de genes e elementos genéticos móveis), sistema endócrino (papel da angiotensina e do receptor de vitamina D), sinalização de fatores de crescimento (interação entre as vias Jak-STAT, TGFβ e HIF-1α), epigenética (modificação de histonas, metilação de DNA, miRNAs, lncRNAs e circRNAs) e inflamação (papel de IL-6, IL-37, IL-13 e macrófagos M1 e M2). ECA, enzima conversora de angiotensina; AndR, receptor de andrógeno. AT1R, receptor de angiotensina tipo 1; AT2R, receptor de angiotensina tipo 2; circRNA, RNA circular; MEC, matriz extracelular; EPC, célula progenitora endotelial; lncRNA, RNA não codificante longo; miRNA, microRNA; RTST, Síndrome de Rubinstein-Taybi; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; VitD R, receptor de vitamina D.



Fonte: Adaptado de Latoni et al., 2024 [24].

Diversos tratamentos cirúrgicos e não cirúrgicos são propostos para o tratamento dos queloides. Uso de placas de silicone, aplicação de corticoesteroides tópicos (isoladamente ou laser-assistidos), infiltração intralesional de corticoesteroides (Ex: triancinolona acetonida), injeção intralesional de toxina botulínica tipo A, 5-fluorouracil, verapamil, bleomicina ou interferon (IFN)- α 2b [14,25], finasterida [24], laserterapia, criocirurgia intralesional e monoterapia com radiação, são descritos na literatura. Quanto à corticoterapia, tópica ou intralesional, se encontra, até os dias atuais, dentre os principais tratamentos clínicos utilizados para essa doença, podendo ser utilizada de modo profilático, em pacientes com histórico de cicatrizes aumentadas após trauma ou cirurgias, ou terapêutico. O tratamento cirúrgico destas cicatrizes envolve, na maior parte dos casos, sua ressecção, seguida de radioterapia e/ou aplicação local de corticoesteroides. Outras opções terapêuticas incluem a utilização de aloenxertos, provenientes de engenharia tecidual, uso de plasma rico em plaquetas [14,25], terapias mais atuais, propostas para atuação em vias moleculares específicas, por meio do uso de outras drogas [26], por exemplo, com alvo em enzima conversora de angiotensina (ECA) / receptores de Angiotensina II (AngII) / receptores de Angiotensina 1 (AT1) [24], substâncias biológicas, pequenas moléculas inibitórias, RNA de interferência e terapia gênica, objetivando interromper a proliferação excessiva de fibroblastos e a produção de colágeno, dentre outras, que vêm sendo estudadas [8].

No entanto, mesmo com tantas opções terapêuticas disponíveis até o presente momento, não há tratamentos que, isoladamente, sejam efetivos no combate à essa anomalia cicatricial [10,27,28], uma vez que seus mecanismos etiopatogênicos ainda precisam ser esclarecidos.

1.2. Arquitetura cutânea e composição da matriz extracelular (MEC)

A pele humana, considerada o maior e mais acessível órgão do corpo, atua como uma barreira protetora contra a desidratação, a invasão por patógenos e diversos tipos de traumas, incluindo agressões térmicas, químicas

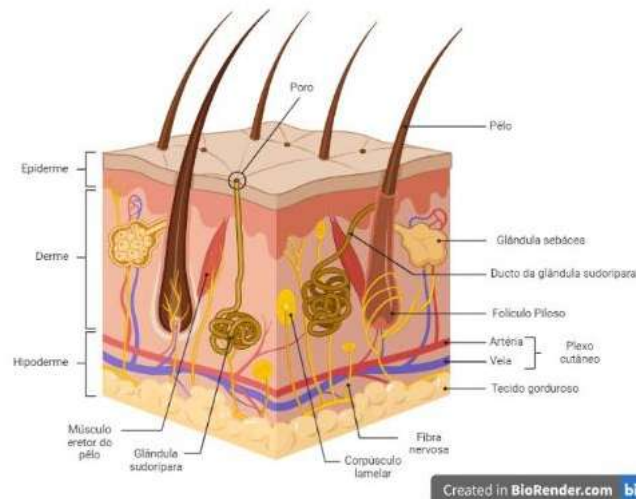
e radiação ultravioleta, contribuindo, assim, para a manutenção da homeostase. Além disso, desempenha funções metabólicas importantes e participa ativamente da síntese de vitamina D [29,30].

Em geral, a pele corresponde de 15-20% do peso corporal e apresenta em torno de 1,5 – 2,0 m² de superfície em adultos [31]. Constitui, por vezes, fonte de informação sobre certas doenças sistêmicas, que podem causar manifestações cutâneas, tais como rubor, sudorese, palidez e alterações de coloração da pele [30].

Diversas variações estruturais na pele podem ser observadas entre distintos grupos étnicos, as quais envolvem não apenas diferenças na pigmentação cutânea, mas também na proporção, no tipo e na distribuição da melanina nos tecidos [30]. Além disso, a pele mantém uma integração anatômica e funcional com o sistema fascial subjacente, à qual se conecta por meio de septos fibrosos, que são faixas de tecido conjuntivo que ancoram a derme e o tecido subcutâneo à fáscia muscular e, em determinadas regiões, ao periósteo. Esses septos, juntamente com vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos, asseguram a sustentação mecânica, a irrigação e a inervação adequadas da pele [30].

Do ponto de vista mecânico, é um órgão extremamente dinâmico, sujeito a forças de estiramento em várias direções, compressão, fricção e deslizamento, características importantes e comumente negligenciadas, percebidas, muitas vezes, somente durante o processo de envelhecimento, doenças com acometimento cutâneo ou após injúria tissular [30]. É morfológicamente dividida em 3 camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme, com diversos componentes e graus de especialização em cada uma dessas camadas (**Figura 3**) [30].

Figura 3 - Desenho esquemático da anatomia cutânea.



Fonte: Adaptado de BioRender.com

Estudos recentes do perfil proteômico da pele apontam a presença de 155 à 174 diferentes proteínas, dentre as quais a maior parte são de colágeno dos tipos I, II, III, VI, XII e XIV, e de outras proteínas da matriz extracelular (elastina, lumican, mimecan, prolargina, periostina e decorina), queratinas ([citoesqueleto tipo I - 9, 10, 13, 14, 15 e 16] e [citoesqueleto tipo II - 1, 2, 5 e 75]), além de proteínas celulares (vimentina, desmoplaquina, actina, miosina, tubulina, laminina, histonas, anexinas e proteína 14-3-3) [30].

Adicionalmente, Fredman et al., 2022, elaboraram um atlas sobre proteínas da pele humana, a partir do estudo de proteômica baseado em espectrometria de massa, objetivando ampliar o conhecimento de estudos prévios, que ficaram limitados devido à complexidade celular da pele. Este estudo identificou 10.701 proteínas, que inclui as proteínas de todas as camadas celulares cutâneas (estrato córneo, epiderme interna, derme e tecido celular subcutâneo), seus subconjuntos celulares (fibroblastos, queratinócitos, melanócitos e células endoteliais) e as proteínas de 5 diferentes células imunes associadas à pele (macrófagos, células dendríticas, mastócitos, células T epidérmicas e células T dérmicas) [32].

1.2.1. Epiderme

É a camada mais superficial da pele [30] responsável pela cor, textura e umidade desta, além de atuar como barreira protetora e permitir sua flexibilidade e mobilidade sobre o corpo [33]. A espessura da epiderme pode variar de acordo com a topografia, medindo, em média, 75-150 μm , podendo alcançar 600 μm nas regiões palmares e plantares [30]. É composta por um epitélio escamoso estratificado [34] que se divide em quatro ou cinco estratos (a depender da região), entremeados por apêndices cutâneos, tais como unidades pilosebáceas e glândulas sudoríparas. Na maior parte da superfície corpórea, o tegumento apresenta quatro estratos ou camadas: basal, espinhoso, granuloso e córneo. Nas áreas com maior atrito, como nas pontas dos dedos, regiões palmares e plantares, um estrato a mais é evidenciado, o estrato lúcido [33,35].

É formada, em sua maior parte, por queratinócitos (cerca de 90% das células), melanócitos, células dendríticas de Langerhans apresentadoras de antígenos (macrófagos intraepidérmicos) e células de Merkel (táteis), e sua nutrição se dá por difusão dos fluidos intercelulares provenientes dos vasos dérmicos [33–35]. As 3 primeiras camadas epidérmicas são nucleadas, sendo que a primeira delas possui íntimo contato com a membrana basal. A replicação destas células sofre limitação pelo íntimo contato entre elas, promovendo o padrão epidérmico característico conhecido. A região mais superficial da epiderme contém células anucleadas e cornificadas (estrato córneo), diversamente às células de formato hexagonal no estrato basal (ou camada basal). As células epidérmicas ligam-se umas às outras por meio das *tight junctions*, que formam uma barreira à entrada de elementos prejudiciais à homeostase tecidual [30].

A camada basal é composta por uma camada de queratinócitos cuboídes ou colunares; no estrato espinhoso, 8 a 10 camadas de queratinócitos poliédricos encontram-se justapostos, conferindo resistência e flexibilidade à pele; no estrato granuloso estão presentes 3 a 5 camadas de queratinócitos achatados, que passam pelo processo de apoptose; nas áreas que apresentam estrato lúcido, 3 a 5 camadas de queratinócitos claros e achatados são encontrados, contendo grandes quantidades de queratina; por fim, o estrato córneo é composto por 25 a 30 camadas de queratinócitos achatados [35].

Os queratinócitos se deformam com os movimentos transmitidos através da rede fibrilar dérmica subjacente e formam linhas topográficas, que podem receber diferentes denominações, tendo sido descritas mais de 40, dentre linhas e dobras [30]. Um exemplo são as cristas (ou cones) epiteliais, projeções da epiderme na derme [36]. Estas células produzem um filamento proteico chamado queratina, e os 4 estratos mais prevalentes descritos representam estágios de maturação destas células, da camada mais profunda para a mais superficial [33]. Além da queratina, outra importante proteína produzida pelos queratinócitos são os tipos de colágeno, como, mas não exclusivamente, o IV, VII, VIII e XVII, importantes na fisiologia cutânea [37].

Como funções dos queratinócitos, estão sua proliferação no processo de cicatrização de feridas, o transporte de água e ureia por meio das aquaporinas, o recebimento de melanina dos melanócitos, o controle da permeabilidade cutânea à água por meio da secreção de peptídeo antimicrobiano e a participação na imunidade inata e adaptativa, através das células de Langerhans [34].

A camada basal da epiderme se conecta à derme por meio de uma membrana basal, chamada de junção dermo-epidérmica [33]; esta membrana se caracteriza por ser uma camada fina, com cerca de 40nm a 120nm de espessura, flexível e constituída por proteínas da matriz extracelular. Essas proteínas atuam como suporte de todas as células do tecido, além de funcionarem como proteínas de ligação, como é o caso da caderina, que tem a função de ligar célula-célula, e das integrinas, que facilitam as ligações célula-membrana [38,39]. Por sua vez, os melanócitos estão restritos à camada basal da epiderme e sua função primária é a produção de melanina, um pigmento que protege o núcleo celular das lesões induzidas por radiação ultravioleta (U.V) [17].

1.2.2. Derme

Do ponto de vista embriológico, a derme se origina do mesoderma da placa lateral e, no terceiro trimestre da gestação, já apresenta características semelhantes às da pele adulta [40]. Se situa entre a epiderme e o tecido celular subcutâneo e é responsável pela variação regional da espessura cutânea, bem

como pela resistência mecânica desta, evitando seu cisalhamento [30,33,34]. Nela está presente o suprimento neurovascular da pele [33].

É composta, primariamente, por colágeno, mas também por elastina, vasos sanguíneos, nervos e glândulas sudoríparas [33]. Seu principal e mais abundante tipo celular é o fibroblasto, gerado a partir de células-tronco dérmicas, e responsável pela síntese, secreção e remodelamento da matriz extracelular (MEC), e também pela comunicação com outros tipos celulares, incluindo células do sistema imune [41]; estas células produzem colágeno, elastina, proteínas extracelulares estruturais e glicosaminoglicanos, sendo as duas primeiras as mais abundantes na pele humana [33,34,41,42].

A derme é dividida morfológicamente em duas camadas, papilar e reticular [33]. Cada uma delas é formada por linhagens diferentes de fibroblastos, com capacidades proliferativas, morfologia e marcadores de superfície celular próprios, o que pode explicar a diferença em sua arquitetura fibrilar [30,42].

Estudos recentes em ratos e humanos apontaram a presença de diferentes subpopulações de fibroblastos na derme, que compreendem fibroblastos papilares, fibroblastos reticulares e fibroblastos da papila dérmica na base do folículo piloso, com base nas diferenças dos perfis transcricionais de cada um destes [36].

A derme papilar se encontra logo abaixo da junção dermo-epidérmica, e se caracteriza pela presença de fibras finas e esparsas, com uma frouxa rede de fibrócitos, fibras colágenas finas e vasos sanguíneos; abaixo desta camada, se situa a derme reticular, mais sólida e espessa, contendo menor número de fibrócitos que a anterior, porém com rede mais densa de colágeno [33,34,42].

A derme papilar apresenta marcadores específicos, tais como podoplanina, fator intensificador de ligação linfóide tipo 1 e corina, além de aumento da expressão de *NANOG*, um marcador indiferenciado de células-tronco e de certos genes colagênicos, como *COL5A1*, *COL9A2* e *COL23A1* [42].

O tecido dérmico apresenta, como principal componente estrutural, o colágeno fibrilar, que desempenha, como funções primordiais, as de conferir

resistência mecânica, elasticidade e suporte para processos de proliferação, adesão e diferenciação celular na pele [41].

1.2.3. Hipoderme

É formada por tecido conjuntivo frouxo, rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que atraem fluidos para o tecido. Apresenta células adiposas, fibroblastos e macrófagos. Estes últimos desempenham papel na homeostase dos adipócitos na obesidade, associados ao remodelamento tecidual, e estão também envolvidos no controle da termogênese da gordura, estimulando-a durante a exposição ao frio e à atividade física [30].

1.2.4. Anexos epidérmicos

Constituídos pelos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, que estão em constante renovação para substituir células senescentes e as células descamadas da superfície cutânea [34]. Atualmente, é sabido que, as células foliculares desempenham papel fundamental na regeneração da pele traumatizada, sendo recrutados para sintetizar todas as linhagens celulares da pele, processo complexo, que envolve interações entre o epitélio e o mesênquima [34].

1.2.5. A matrix extracelular na pele

A matriz extracelular (MEC) é definida como estruturas não celulares distribuídas por todo o corpo de formas de vida multicelulares [43]. Suas funções incluem a organização das células em tecidos, guiar a polarização celular e conferir as propriedades mecânicas dos órgãos e tecidos, além de fornecer e transmitir sinais mecânicos e bioquímicos; esses sinais, traduzidos para as células, por meio de seus receptores de superfície, modulam diversos processos celulares, que incluem adesão, migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação celulares [44]. Nos mamíferos, estima-se que haja centenas de componentes na MEC, incluindo cerca de 40 tipos de colágeno, aproximadamente 30 diferentes tipos de proteoglicanos identificados e quase

200 glicoproteínas distintas [43]. Na espécie humana, de acordo com Naba A., 2024, sugere-se que potenciais componentes da MEC sejam codificados por cerca de 1.000 genes [44].

Ela pode ser dividida em 2 tipos principais, que diferem em composição molecular, arquitetura, localização e funções: a intersticial dos tecidos conjuntivos e a das membranas basais [44].

A MEC intersticial tem aspecto de malha ou rede [44] e é composta de proteínas fibrilares, proteoglicanos / glicosaminoglicanos e proteínas matricelulares. A MEC das membranas basais (ou junção dermo-epidérmica), por outro lado, se constitui em estrutura fina, delicada e flexível [45], de dupla camada, em forma de lâminas, uma composta por um conjunto rico em laminina e outra ancorada por uma moldura de colágeno IV, com proteoglicanos de sulfato de heparana e nidogênios, completando os componentes mais onipresentes dessas membranas. A membrana basal fornece substrato para a adesão celular, e promove tanto a locomoção, quanto uma ancoragem estável para as células, entre outras funções. As células polarizadas epiteliais e endoteliais se associam à membrana basal, por meio de sua superfície basal. A composição desses 2 tipos de MEC varia consideravelmente em cada tecido, a depender de sua forma e função, mas ambas servem como provedoras de informação mecano sensorial [43].

A MEC apresenta características físicas de densidade, orientação das fibras, porosidade, rigidez e elasticidade; propriedades bioquímicas, que permitem sua comunicação com as células nativas do tecido [45], por meio de sinais de adesão celular, promovendo liberação ou inibição de fatores de crescimento, propriedades que também permitem o remodelamento dinâmico, por meio da secreção, degradação (proteases), reorientação ou reorganização de fibras, além de propriedades que permitem a alteração de sua composição, decorrente da progressão da idade ou de doenças [44]. Como já descrito, suas principais funções incluem fornecimento de integridade estrutural e manutenção das propriedades mecânicas do tecido, definindo sua forma e arquitetura [44]; a regulação do fenótipo celular, por meio do controle da proliferação, sobrevivência, migração, diferenciação [45] e apoptose celular [44]; a interação com as células residentes, por meio de receptores de superfície, promovendo o

ajuste das funções e do comportamento celular [45]; a transmissão de sinais bioquímicos e mecânicos, com sinalização via integrinas; função de barreira, dada por meio da lâmina basal, e de filtro, por meio dos glomérulos renais; ademais, participa de processos fisiológicos e patológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, a cicatrização, o remodelamento, o envelhecimento, a fibrose e o câncer [44].

Os principais componentes da MEC, conhecidos como estruturais, são o colágeno, os proteoglicanos e as glicoproteínas da matriz. Dentre essas últimas, cita-se a fibronectina, fibrilinas, e a proteína ligante ao TGF- β latente, que atuam na formação de fibrilas; a elastina que, associada a outras proteínas, forma as fibras elásticas; as lamininas, típicas da membrana basal, compostas por 16 combinações conhecidas de cadeias α , β e γ ; e as proteínas matricelulares, glicoproteínas não fibrilares, incorporadas à MEC, que desempenham funções regulatórias, sendo estas as tenascinas, as trombospondinas, as fibulinas, a periostina, o nidogênio (entactina) SPARC, entre outros [44].

Além destes, existem outras proteínas associadas à MEC, sendo estas 171 proteínas afiliadas à MEC (ex.: ficolinas, colectinas, galectinas, mucinas, proteínas do surfactante), 238 reguladores da MEC (ex. famílias de proteases, metaloproteinases (MMPs), e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)), e 344 fatores secretados (ex. fatores de crescimento, morfógenos e citocinas) [44].

A elastina, uma glicoproteína estrutural, como já mencionado, é componente de fundamental importância na MEC. Na pele, é responsável por manter a arquitetura dérmica que suporta o crescimento celular. Ela controla diversas atividades celulares de fibroblastos, células musculares lisas e queratinócitos, tais como proliferação, migração e diferenciação celular, além de atuar na cascata da coagulação, no transporte do cálcio, na renovação e sobrevivência celulares, na regulação dos fenótipos celulares e na produção da matriz e de citocinas. As fibras elásticas correspondem entre 0,6% e 7,9% da MEC, e de 2-4% do peso seco sem gordura da derme. Conferem resistência, retração e elasticidade à pele. Na derme papilar, as fibras elásticas finas estão dispostas perpendicularmente às fibras da derme reticular, e posteriormente, se fundem em microfibrilas ricas em fibrilina na junção dermoepidérmica; na derme

reticular inferior, as fibras elásticas se organizam como fibras horizontais espessas. São classificadas em 3 tipos, a depender da quantidade de elastina associada às microfibrilas: oxitalânicas, elaunínicas e fibras elásticas maduras [41]. Já, o colágeno cutâneo, proteína de crucial importância na constituição da matriz extracelular, merece destaque, e será pormenorizado a seguir.

1.2.5.1. Colágeno: Estrutura e Função na Pele Humana

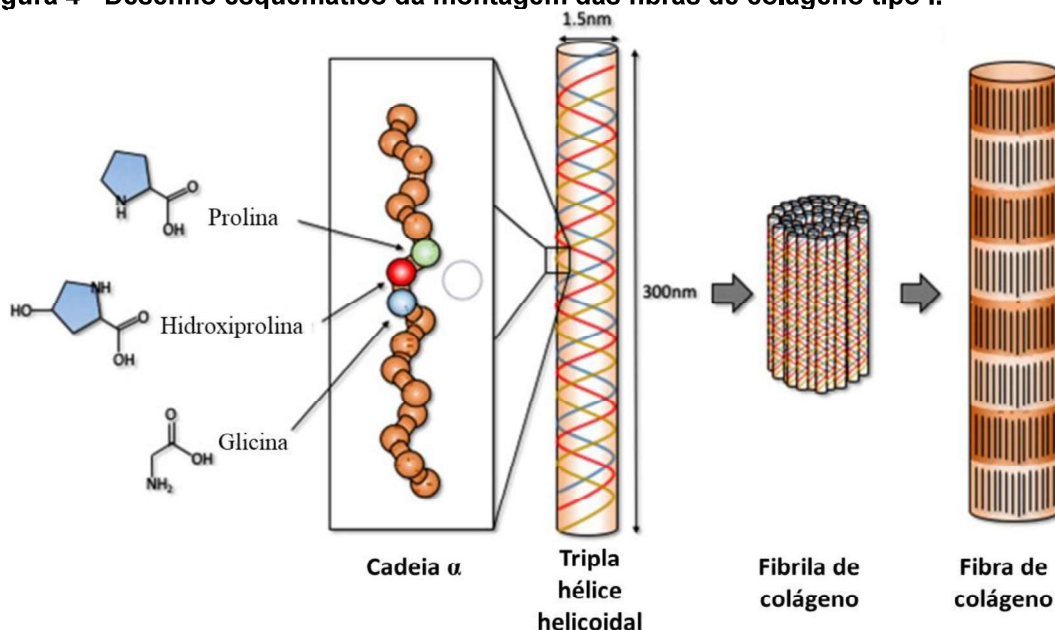
1.2.5.1.1. Características gerais

O colágeno, pertencente à classe das proteínas fibrosas [46], constitui cerca de 30% da massa total proteica dos mamíferos e é a proteína mais abundante no corpo humano, correspondendo a aproximadamente 50 a 90% do tegumento, além de ser o maior componente da matriz extracelular [41,47]; compreende uma família de proteínas encontrada na pele e no tecido conjuntivo do corpo humano [34]. Atualmente, são conhecidos 28 tipos de colágeno [37], numerados com algarismos romanos (I-XXVIII) [48]. Esses tipos de colágeno são classificados em diversas subcategorias, de acordo com critérios de homologia de domínio e funcional [37], e são codificados por 44 genes [44]. Suas moléculas são formadas pelo entrelaçamento de três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , arranjadas em tríplice hélice, que se estabiliza por pontes de hidrogênio intercadeia, conferindo à molécula alta estabilidade, rigidez e forma de bastão [49]. Essas cadeias podem ser idênticas (homotriméricas) ou distintas (heterotriméricas), sendo essas últimas mais frequentes no parênquima tecidual.

As cadeias α da molécula de colágeno apresentam grande variação em número de aminoácidos, de 662 a 3152 e, portanto, em tamanho, cada qual com uma sequência específica e característica desses aminoácidos [50,51].

A cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo I, o tipo mais abundante no corpo humano, se caracteriza por uma composição específica de aminoácidos. A glicina corresponde a aproximadamente 26,7% da sua estrutura, enquanto a prolina representa cerca de 19% (**Figura 4**) [44]. Ainda, a 4-hidroxiprolina ocorre em uma proporção de 9–10% em cada cadeia α desse colágeno [52,53].

Figura 4 - Desenho esquemático da montagem das fibras de colágeno tipo I.



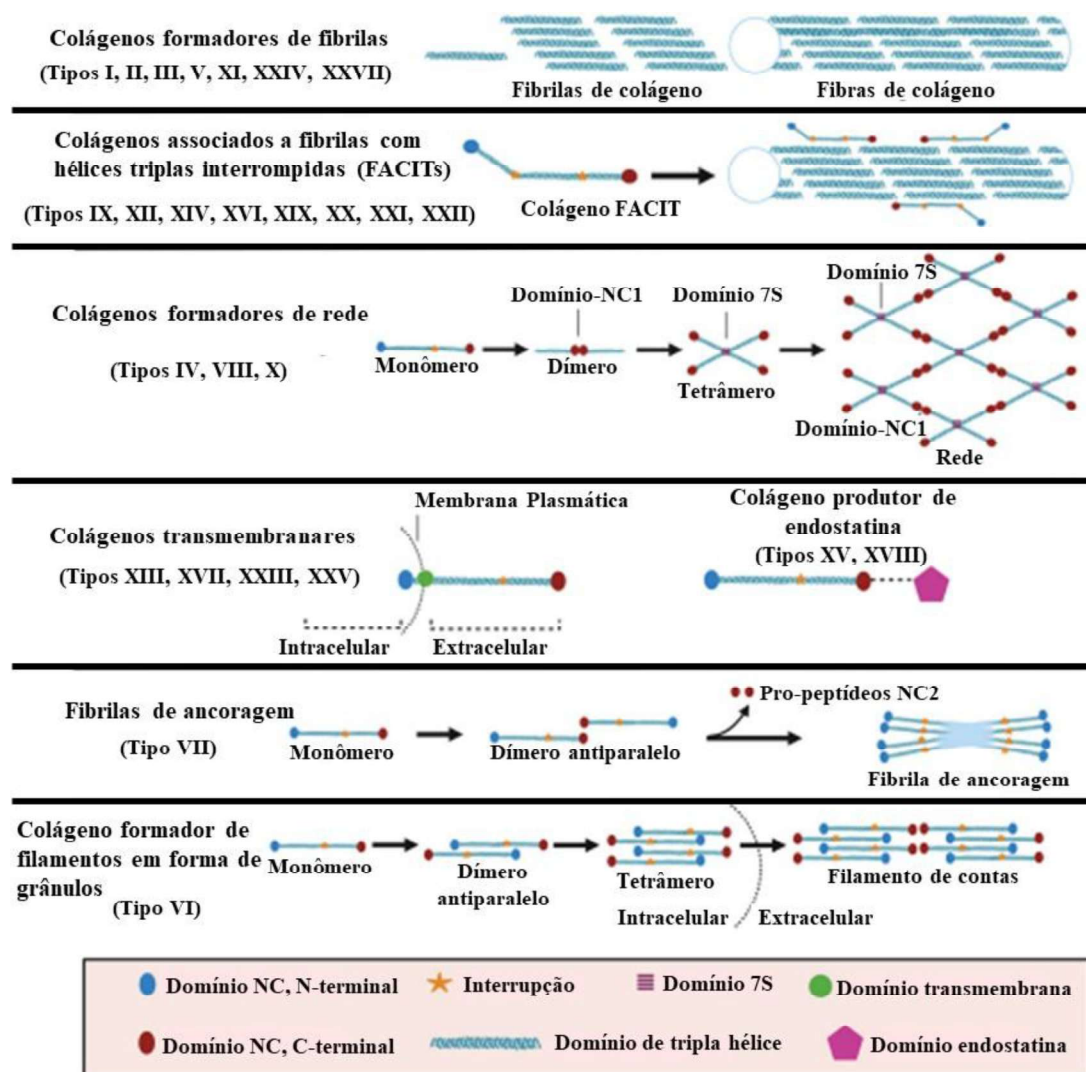
Fonte: Adaptado de Sicari et al., 2023 [54].

A molécula de colágeno é produzida no retículo endoplasmático de fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, e outras células produtoras de proteínas da MEC [55]. Ainda, o colágeno pode ser classificado como intersticial, periférico ou pertencente à membrana basal, de acordo com a sua localização no organismo [46].

As cadeias de colágeno, codificadas por genes distintos, podem ser classificadas, quanto ao seu tipo, em seis grupos: tipos de colágeno formadores de fibrilas ou fibrilares (I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII), tipos de colágeno associados a fibrilas com hélices triplas ininterruptas (FACITs; IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI e XXII), tipos de colágeno formadores de rede (IV, VIII e X), tipos de colágeno transmembrana (XIII, XVII, XXIII e XXV), multiplexinas (XV e XVIII), e um grupo de 4 tipos de colágeno caracterizados pela presença de múltiplos domínios do fator A de von Willebrand (colágeno VI formando microfibrilas, colágeno VII formando fibrilas de ancoragem, e colágeno dos tipos XXVI e XXVIII). Enquanto alguns tipos de colágeno são codificados por um só gene, formando proteínas homotriméricas, outros são codificados por diferentes genes, gerando cadeias distintas e, consequentemente, proteínas heterotrímeras [44]. Dentre os tipos

mencionados, as principais categorias são os fibrilares, os formadores de rede, e os tipos de colágeno associados a fibrilas com interrupções em suas triplas hélices (FACIT) (**Figura 5**) [37,56].

Figura 5 - Classificação dos tipos de colágeno com base nas principais formas de organização supramolecular.



Fonte: Adaptado de Onursal et al., 2021 [57].

Os tipos de colágeno fibrilares têm como característica seu agrupamento em estruturas maiores, as fibras colágenas, como exemplificado na **Figura 4** [37,56]. Sua conformação em tripla-hélice se deve à presença de um resíduo do aminoácido glicina a cada 3 aminoácidos, numa sequência de cerca de 1.000 aminoácidos, formando uma repetição (Gly-Xaa-Yaa)_n [58]. Além disso, essas cadeias possuem sequências adicionais de 15 a 20 aminoácidos que não fazem

parte da tripla hélice e são denominadas de telopeptídeos, também conhecidos como extensão não colagenosa (NC) da molécula. Existem duas extensões, a NH₂ (amino terminal) e COOH (carboxi terminal). Há evidências de que o domínio COOH contém informações essenciais para a formação da tríplice hélice, enquanto o NH₂-terminal apresenta dados importantes para a regulação final do diâmetro das fibrilas [59,60].

Estima-se que, no corpo humano, cerca de 90% do colágeno existente, seja dos tipos I e III [61].

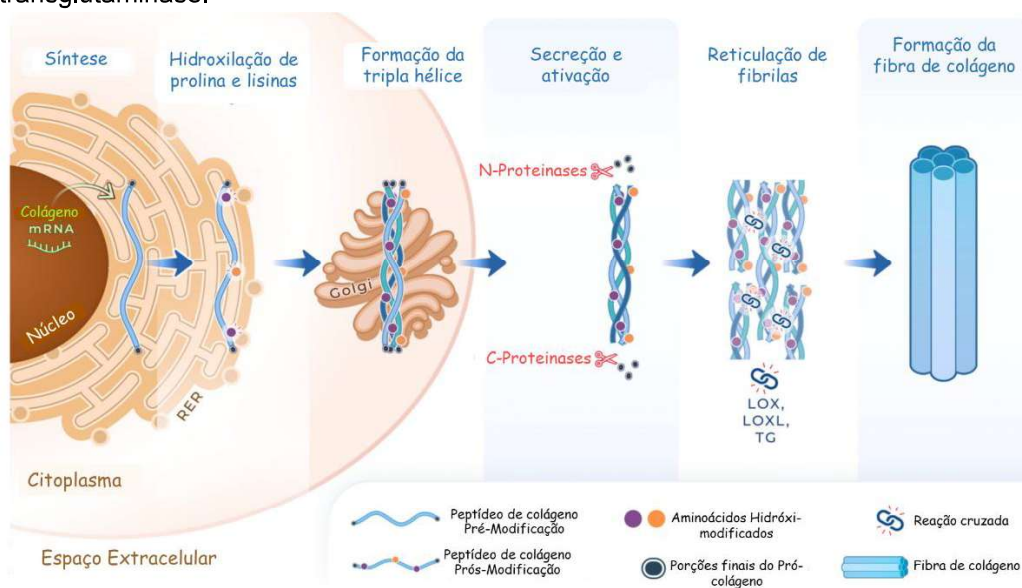
Na pele humana, o colágeno é fundamental para manter a integridade estrutural e as funções fisiológicas [62]. Ademais, sabe-se, atualmente, que esta proteína é muito importante no processo de sinalização celular [37]. Suas propriedades incluem baixa antigenicidade, biocompatibilidade e habilidade de promover adesão e migração celular, o que os confere papel chave no processo cicatricial [62].

Na pele normal, as fibras de colágeno se organizam na forma de uma rede tridimensional, formando feixes compostos por fibrilas paralelas e compactas. Esta conformação é resultado de um longo processo de maturação tecidual [19].

Durante a etapa inicial da biossíntese do colágeno, ocorre a translação dos precursores da cadeia alfa para formação da molécula de procolágeno; os resíduos de lisina e prolina são, então, hidroxilados com auxílio da vitamina C, e a hidroxilisina é glicosilada. Após a formação da tripla hélice, o procolágeno é secretado pelos fibroblastos para o meio extracelular, onde seus propeptídeos N e C terminais são clivados por peptidases específicas, originando o tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno associam-se para formar fibrilas que apresentam um padrão periódico característico, denominado período D, um arranjo deslocado por um quarto do comprimento da molécula. Esse período varia de 64 a 67 nm e, quando observado por microscopia eletrônica, manifesta-se como bandas alternadas claras e escuras [55,63]. Na sequência, a enzima lisil-oxidase (LOX) catalisa a formação de ligações cruzadas (*crosslinks*) entre as fibrilas, conferindo resistência e força tênsil [55]. Além da LOX, processos não enzimáticos mediados por SLRPs (Proteoglicanos Pequenos Ricos em Leucina) também participam da formação de *crosslinks*, sendo que o biglican, a decorina

e o lumican estão entre os principais representantes dessas cinco classes de SLRPs [19]. As fibrilas colágenas, posteriormente, se organizam em fibras colágenas, compondo a matriz extracelular cutânea [33]. Cada molécula de colágeno é formada por três cadeias alfa entrelaçadas, que originam a estrutura helicoidal tripla característica [17,46]; a sequência específica de aminoácidos dessas cadeias é o que determina a estrutura final e o tipo de colágeno sintetizado (**Figura 6**) [46].

Figura 6 - Ilustração esquemática da síntese, secreção e reticulação de fibrilas de colágeno. RER, retículo endoplasmático rugoso; LOX, lisil oxidase; LOXL, semelhante à LOX; TG, transglutaminase.



Fonte: Adaptado de Nizamoglu & Burgess, 2021 [64].

O processo de degradação do colágeno ocorre por vias extra e intracelulares. As vias extracelulares envolvem ligações à membrana e a secreção de enzimas proteolíticas; já as vias intracelulares envolvem a internalização de fibrilas colágenas inteiras e de colágeno fragmentado, que são quebrados enzimaticamente. Deste modo, alterações neste processo podem ocasionar condições patológicas, tais como a fibrose. Neste processo de degradação, diferentes tipos de metaloproteinases são responsáveis pela clivagem de diferentes tipos de colágeno. Na pele, as metaloproteinases (MMPs) 1, 2, 8, 13 e 14 degradam, primariamente, os colágenos tipos I e III; já as MMPs

3 e 9 são incapazes de degradar as moléculas de tropocolágeno, mas a MMP-9 consegue degradar o colágeno tipo IV [41].

O colágeno tipo I (Col I), fibrilar, é o mais abundante no organismo humano de adultos [11], mais especificamente no tecido conjuntivo [62], podendo ser encontrado nos dentes [46], ossos, pele, tendão, córnea, sistema cardiovascular [56], pulmão [46], cápsulas de órgãos (ex: fígado – [65]) e nas fáscias, exceto de tecidos cartilagosos [66]. No sistema cardiovascular, está presente no miocárdio, na corda tendínea, na lâmina fibrosa valvular e na adventícia vascular [67]. Este colágeno, de característica mais endurecida, confere força tênsil aos tecidos [46]. No tecido conjuntivo distensível (ex: pele, pulmão, sistema vascular) o Col I, geralmente, está associado ao colágeno tipo III (Col III), tendo uma taxa de renovação mais baixa que este último [46]. Representa aproximadamente 80-85% da derme [41], e possui três cadeias peptídicas, das quais duas são idênticas entre si (α -1) e uma é diferente (α -2). A diferença entre essas cadeias está na sequência de aminoácidos [10].

O colágeno tipo III, inicialmente identificado e descrito em 1971, se constitui em importante proteína estrutural e um dos principais colágenos fibrilares, correspondendo a cerca de 5-20% do colágeno total do corpo humano [58]. É encontrado no retículo endoplasmático, e está presente em tecidos com alta celularidade [10]. Encontra-se frequentemente associado ao colágeno tipo I, na pele, útero, intestino e vasos sanguíneos [56], e também é encontrado na medula óssea, na sinóvia, no baço, nos linfonodos [68], e no fígado [65], sendo o segundo colágeno mais abundante, e participando de processos de regeneração celular e cicatrização de feridas [62], bem como conferindo força tênsil e qualidade óssea [55]. Representa cerca de 8-11% da derme [41], conferindo maleabilidade cutânea [33]. Este colágeno, um homotrímero constituído por três cadeias α -1 [11], é a forma predominante de colágeno no feto em desenvolvimento, frequentemente referido como colágeno fetal [33].

O colágeno tipo V (Col V), isolado inicialmente na placenta humana e na pele adulta [37] e, posteriormente, identificado em outros órgãos, principalmente na pele, na córnea, no fígado, no baço, no pulmão [69], nos ossos, no cabelo e nas superfícies celulares [56], é classificado como uma proteína, membro da família de tipos de colágeno fibrilares, representando um colágeno menor em

termos quantitativos em tecidos conjuntivos abundantes em colágeno tipo I [37,69]. Compreende por volta de 4 a 5% do colágeno da matriz dérmica [33], e tem como característica ser pericelular, envolvendo os fibroblastos (além de células do músculo liso e outras células mesenquimais) [11], apresentando importante papel em vários processos fisiopatológicos no corpo humano.

O colágeno dos tipos IV e VII formam, respectivamente, uma rede estrutural e fibrilas de ancoragem na junção dermo-epidérmica ou membrana basal [17].

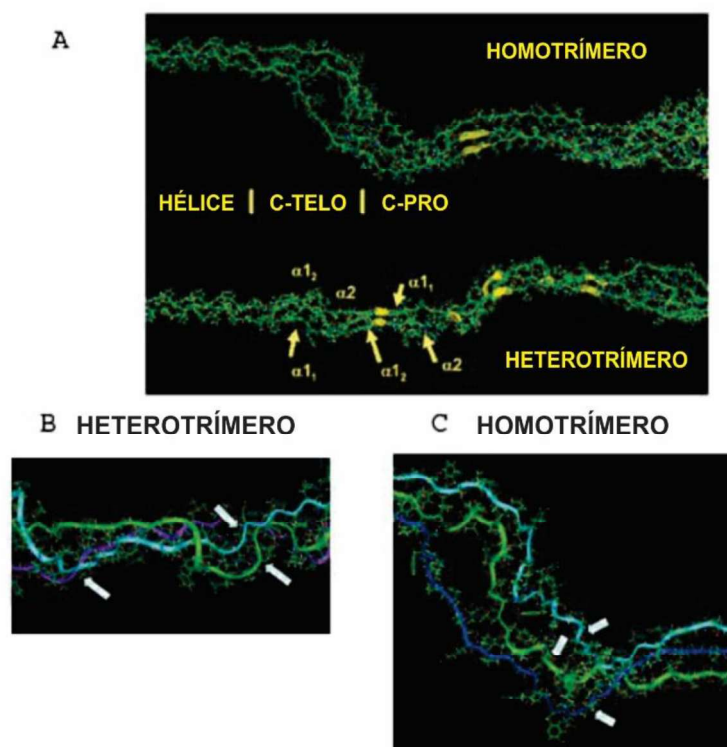
O colágeno tipo VI é um colágeno não fibrilar, expresso em muitos tecidos conjuntivos e implicado na organização da matriz extracelular (MEC). Theocharidis et. al., 2016, mostraram que o colágeno tipo VI foi expresso em toda a derme humana normal, nas margens em expansão de amostras de tecido queloidiano, e no tecido de granulação da MEC em um modelo de cicatrização de feridas, em ratos [70]. O colágeno tipo VI é um regulador chave na composição e na estruturação da matriz dérmica e do comportamento de seus fibroblastos, e pode desempenhar um papel importante no processo de cicatrização das feridas e regeneração tecidual [70]. Destes, de especial interesse em nosso estudo, o colágeno dos tipos I, III e V atuam como protagonistas nos processos fisiopatológicos cutâneos, participando, também, de várias doenças extra-cutâneas.

1.2.5.1.2. O Colágeno dos Tipos I, III e V na Homeostase Tecidual

O colágeno I é o mais prevalente na MEC cutânea, em situações de homeostase [41]. É constituído por mais de 1.000 aminoácidos, podendo alcançar comprimento de cerca de 300 nm e largura de 1-5 nm [66]. Como todos os tipos de colágeno fibrilares, o colágeno I é trimérico, composto de 3 subunidades alfa, formando uma longa e ininterrupta estrutura tripla em forma de haste helicoidal, gerada por uma série de aminoácidos Gly-XY (Glicina-X-Y) repetidos em cada subunidade de colágeno, dentro dos quais resíduos de glicina são incorporados no centro da hélice e os aminoácidos mais volumosos, como prolina/hidroxiprolina (X-Y), ficam voltados para fora, estabilizando esta estrutura [43]. A glicina na terceira posição garante a formação helicoidal; posteriormente,

esta estrutura sofrerá uma compactação em uma dimensão diferente de formas hexagonais e quase hexagonais, para formar o colágeno fibrilar [66]. A forma heterotrimérica do colágeno tipo I, composta por 2 cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , é a mais comum, embora em algumas situações, como no feto e em algumas condições patológicas, ele possa se apresentar como um homotrímico, composto por 3 cadeias α_1 (**Figura 7**) [62].

Figura 7 - Estrutura molecular do Colágeno tipo I. (A) Comparação das regiões de conexão C-telo-C-pro do homotrímico (acima) e do heterotrímico (abaixo). No heterotrímico, as cadeias α_1 e α_2 são indicadas pelas setas finas. (B) Vista ampliada da junção entre as sequências de telopeptídeo e propeptídeo do heterotrímico. As setas mostram os pontos de clivagem da C-proteinase. (C) Vista ampliada da junção entre o telopeptídeo e o propeptídeo no homotrímico. As setas mostram os pontos de clivagem da C-proteinase.



Fonte: Adaptado de Malone, Alvares e Veis, 2005 [71].

A formação desse tipo de colágeno ocorre a partir de 2 genes, o *COL1A1*, localizado em 17q21.3-q22 (braço longo), e o *COL1A2*, localizado em 7q21.3-22.1 (braço longo) [66]. A cadeia α_1 do Col I é composta por 1.464 aminoácidos, com as porcentagens de glicina e prolina presentes conforme já mencionado [44]. É descrito que o colágeno I, naturalmente, em sua forma heterotrimérica, possui alta resistência à degradação proteolítica; contudo, algumas proteases,

como as metaloproteinases 1 e 8 (MMP-1 e MMP-8), conhecidas como collagenases neutrofílicas, são capazes de degradá-lo. Sua forma homotrimérica, contudo, é altamente resistente às collagenases, o que dificulta seu processo de clivagem [66].

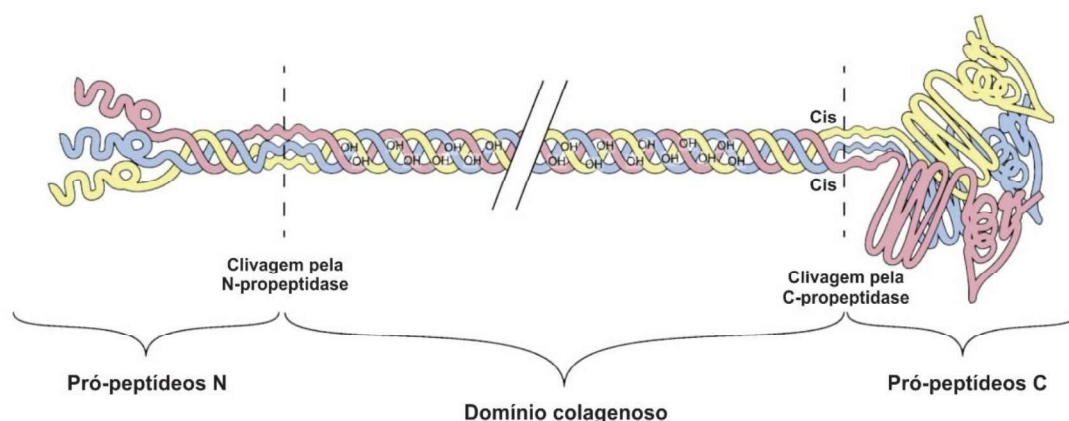
O colágeno I apresenta papel fundamental na regeneração tecidual e na cicatrização de feridas, promovendo proliferação, migração e diferenciação celulares, além de angiogênese [62], e participando da fase mais tardia do processo cicatricial [46]; outrossim, confere integridade estrutural de órgãos e tecidos, por meio da organização tecidual e de sua contribuição para as características mecânicas teciduais [62], promovendo a estabilidade, no caso da pele [46]. É sugerido que este tipo de colágeno pode participar do controle da nucleação e do desenvolvimento de cristais minerais ósseos e na formação de osso sacrificial, o que leva a um aumento da resistência óssea [66]. Proporciona, deste modo, resistência e força aos tecidos onde está presente [55].

Alguns autores sugeriram que o uso de colágeno do tipo I recombinante em hidrogel, preenchido com exossomos de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano, pode promover a regeneração cutânea e o fechamento de feridas, com grande potencial terapêutico nessas situações. Este colágeno também pode inibir o acúmulo de mitocôndrias danificadas em células tratadas com radiação ultravioleta B (UVB), além de que, o pré-revestimento de placas de cultura com colágeno I pode reduzir a apoptose de células HaCaT induzida por UVB. Ainda, pode inibir a autofagia, ao aumentar a regulação da via YAP-mTOR, com contribuição para a melhora do metabolismo lipídico e da glicose, por meio do eixo YAP-autofagia [62].

O colágeno tipo III, homotrímero, é codificado pelo gene *COL3A1*, que se localiza no braço longo do cromossomo 2, possui 38 kb de comprimento e 51 exons. O gene *COL3A1* está orientado em sequência com outro gene codificador de colágeno fibrilar, o *COL5A2*; a sequência entre esses dois genes tem cerca de 22 kb [58]. O processo de formação do colágeno tipo III se inicia com a clivagem de um peptídeo sinal, com formação da molécula de procolágeno. Em seguida, três cadeias idênticas de procolágeno tipo III se reúnem por meio de suas extremidades C-terminais, estabilizadas por ligações dissulfídicas. Cada cadeia, individualmente, forma uma hélice voltada para a esquerda; estes

monômeros, então, passam por processos pós-translacionais de hidroxilação (fundamental para a estabilização da tripla hélice), e de glicosilação ou desaminação oxidativa (catalisada pela enzima lisil-oxidase), com posterior reunião das três cadeias, resultando na formação da tripla-hélice [58]. Após a formação da tripla-hélice, os domínios globulares em ambas as pontas da molécula de procolágeno III são removidos por proteinases C e amino (N) terminais, no meio extracelular [68], com produção de monômeros de colágeno tipo III de hélice tripla, conhecidos como tropocolágeno, e posterior formação de ligações cruzadas entre resíduos específicos de lisina e hidroxilisina. A seguir, então, os monômeros de colágeno tipo III se agregam em fibrilas e, posteriormente, em fibras, conferindo suporte estrutural tecidual. No processo de biossíntese do colágeno III, assim como ocorre com outros tipos de colágeno fibrilares, os propeptídeos C desempenham papel crucial, uma vez que estes direcionam a seleção da cadeia, estabilizam as cadeias alfa associadas por meio de ligações dissulfídicas, e facilitam a formação da tripla-hélice (**Figura 8**). Ainda, na molécula deste tipo de colágeno, a sequência de aminoácidos (Gly-Xaa-Yaa) se repete 343 vezes [58].

Figura 8 - Estrutura molecular do Colágeno Tipo III - Domínios estruturais da molécula de procolágeno tipo III. Três cadeias α formam um homotrímero, constituindo a molécula de procolágeno tipo III. Os grandes domínios globulares da molécula são removidos por proteinases carboxi-terminais (C) e amino-terminais (N) para formar o colágeno tipo III.



Fonte: Adaptado de Kuivaniemi e Tromp, 2019 [58].

O colágeno do tipo III possui estrutura molecular similar ao colágeno tipo I, em termos de composição de aminoácidos, porém este tipo de colágeno é caracterizado por ser um pouco mais flexível [43] e ter fibras mais finas em

relação ao tipo I e, quando presente em conjunto com este, auxilia na regulação do diâmetro fibrilar [58]. Quando em grandes quantidades em tecidos específicos, se associa à maior complacência e fibrilas menores, especialmente aquelas em tecidos em desenvolvimento [43], e nas fases iniciais do processo cicatricial [46]. Este colágeno forma uma rede elástica que funciona como uma mola, armazenando a energia do movimento e a devolvendo rapidamente, como um rebote [46]. Além disso, o colágeno do tipo III, confere força tênsil e forma aos tecidos, desempenhando, nestes, um papel de suporte [55] e, assim, mantendo a integridade de vários órgãos [58]. A proporção tecidual entre os tipos de colágeno I:III nas fibrilas heterotípicas, compostas por mais de um tipo de colágeno, regula a elasticidade e a força tênsil destes tecidos [55]. O Col III também influencia a agregação plaquetária em humanos, além da adesão, migração, proliferação e diferenciação celulares, por meio de sua interação com as integrinas, receptores de superfície celular [58]; como exemplo, pode-se citar sua participação na MEC do endométrio, onde promove viabilidade e migração das células endometriais estromais [62]. Desempenha papel importante no desenvolvimento do sistema cardiovascular [62] e atua de modo essencial no processo de cicatrização tecidual, marcado pelo aumento significativo de níveis de propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo III, após procedimentos cirúrgicos [58]. Em conjunto com o colágeno tipo I o colágeno III, ainda, apresenta uma importante ação nos processos de retardo da dor e envelhecimento [62]. Ainda, como o colágeno I, sua degradação geralmente é realizada pela ação de metaloproteinases, como a MMP-1 (conhecida como collagenase-1) e MMP-8 (collagenase-2) [46].

O colágeno tipo V, fibrilar, apesar de ocorrer em menor proporção em relação aos outros tipos de colágeno, desempenha papel de extrema importância nos processos de proliferação e reparação tecidual, por meio da nucleação e fibrilação do colágeno de tipos I e III [37,69], e de agregação de outras cadeias colagênicas, incluindo cadeias de colágeno XI, formando moléculas heterotípicas (com 1 cadeia $\alpha 1$ (V) e 2 cadeias $\alpha 1$ (XI)), e participando de processos fisiológicos, com papel central na fibrilogênese do colágeno [72]. Outrossim, está presente na membrana basal de vasos e em alguns tecidos mesenquimatosos, com extrema importância na ligação entre o colágeno IV

presente nesta membrana e o tecido conjuntivo frouxo dos órgãos (Carla de Oliveira et al., 2006; Sun et al., 2025b).

Além de sua interação com outros tipos de colágeno da matriz, o colágeno V interage com as proteínas estruturais, tanto nos casos de normalidade, como em doenças nas quais participa. Morfologicamente, o Col V se apresenta como fibrilas heterotípicas associadas ao Col I, microfilamentos, ou fibrilas de 12 nm de espessura; também se associa, na MEC, ao Col III e ao Col VI filamentosos, conferindo integridade estrutural aos tecidos [73].

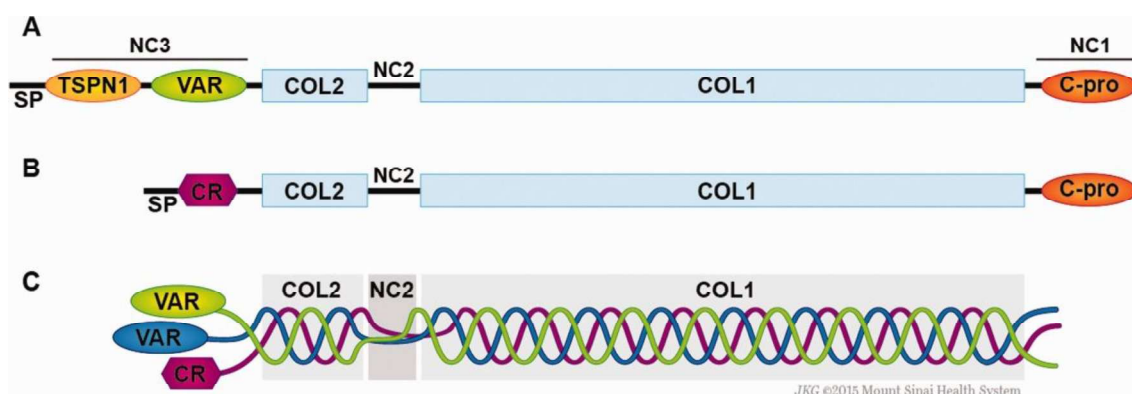
A síntese do colágeno tipo V se inicia sob forma de procolágeno com os N- e C-propeptídeos terminais, os quais, na matriz extracelular, são clivados enzimaticamente, para a produção da molécula de colágeno. Os N- e C-propeptídeos do colágeno tipo V diferem dos outros tipos de colágeno fibrilares [49,74,75]; no processo de síntese desta proteína, o domínio globular propeptídeo amino (NH₂)-terminal de sua cadeia $\alpha 1$ é preservado, o que não ocorre com a maioria dos outros tipos de colágeno fibrilares [76]. Desse modo, a retenção de uma grande porção do propeptídeo N-terminal em moléculas de colágeno V maduras dificulta a adição de colágeno I, regulando negativamente o diâmetro dessas fibras, sendo, portanto, considerado um colágeno fibrilar regulador. Assim, existe uma relação direta entre as proporções de colágeno V e de colágeno I, sendo que o aumento da proporção de colágeno V condiciona diâmetros fibrilares menores [77].

Até o momento, são conhecidas três isoformas moleculares diferentes de colágeno V, $\alpha 1(V)2 \alpha 2(V)$, $3\alpha 1(V)$ e $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$, formadas por combinações de três polipeptídeos com cadeias alfa diferentes, $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$ e $\alpha 3(V)$ [78]codificadas, respectivamente, pelos genes *COL5A1*, *COL5A2* e *COL5A3* [37]; cada isoforma fornece uma composição de cadeia e distribuição tecidual, com funções, possivelmente, diferentes. O homotrímero $\alpha 1(V)$ ocorre como microfilamentos de 5 a 10 nm de diâmetro na derme, e serve como conexão entre o Col VI e o Col IV na membrana basal epidérmica, auxiliando na estabilização da junção dermoepidérmica [73]. A isoforma de Col V contendo as cadeias heterotriméricas $\alpha 1(V)2\alpha 2(V)$ é a mais comum e referida como sendo a representante do Col V, e forma fibrilas heterotípicas com outros tipos de

colágeno, em especial com o colágeno I, sendo amplamente distribuída nos tecidos (**Figura 9**) [73,77].

Na pele humana, 2 tipos de isoformas foram descritas: a primeira homotrimérica, constituída por três cadeias $\alpha 1$ idênticas $[\alpha 1(V)]_3$ e, a segunda, heterotrimérica, que possui duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ $[\alpha 1(V)]_2, \alpha 2(V)$ [79–81].

Figura 9 - Estrutura molecular do Colágeno Tipo V – Desenho esquemático das estruturas das cadeias pró- $\alpha 1(V)$ e pró $\alpha 2(V)$ e isoforma heterotrimérica madura $\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$ do Col V. (A) Cadeia pró- $\alpha 1(V)$: a cadeia é composta por um domínio principal de colágeno flanqueado por um propeptídeo globular N-terminal e um propeptídeo globular C-terminal. (B) Cadeia pró- $\alpha 2(V)$. (C) Isoforma $\alpha 1(V)_2 \alpha 2(V)$ do Col V madura. COL: domínios colagenosos tripla hélice. NC: domínios não colagenosos. TSPN-1: trombospondina-1 semelhante ao domínio N-terminal. SP: peptídeo de sinalização. CR: subdomínio rico em cisteína. Neste esquema, as duas cadeias $\alpha 1(V)$ são coloridas de verde ou azul, e a cadeia $\alpha 2(V)$ é colorida de roxo.



Fonte: Adaptado de Mak, Png e Lee, 2016 [73].

Estudos prévios identificaram o colágeno V heterotrimérico, sob a isoforma $\alpha 1(V)\alpha 2(V)\alpha 3(V)$, na placenta e em outros tecidos, como nas ilhotas pancreáticas, no útero, nas membranas sinoviais, e na pele [73]. Recentemente, Labarrade et al., 2025, mostraram, em seu estudo, a produção exacerbada da cadeia $\alpha 3$ do Col V pelos queratinócitos basais (junto à membrana basal da epiderme) e na bainha radicular externa do fio capilar; este estudo também mostrou que a expressão da $\alpha 3$ (V) do colágeno diminui com a idade, na pele e em queratinócitos diferenciados, e que a inibição desta cadeia, nos queratinócitos, ocasiona aumento da MMP-9 (metaloproteinase 9). Ainda, estes autores sugeriram um provável papel sinalizatório da cadeia $\alpha 3$ do colágeno V,

uma vez que, localizada na membrana basal epidérmica, pode ser responsável pela manutenção da população de células-tronco, bem como pelos mecanismos de controle de qualidade de eliminação de células inadequadas [37].

O Col V pode ser encontrado, em grande parte, no tecido conjuntivo, sendo considerado importante na formação deste; é sintetizado por várias células mesenquimais, e apresenta expressão gênica modulada por TGF- β e outros fatores de crescimento [73,77].

1.3. Patogênese e a MEC nos queloides

1.3.1. Aspectos gerais

As alterações dérmicas hiperproliferativas e fibróticas queloidianas fazem com que essas cicatrizes se assemelhem, fenotipicamente, a tumores benignos [19]. Do ponto de vista histológico, há heterogeneidade das cicatrizes queloidianas entre si, e dentro de uma mesma cicatriz, o que pode ocasionar alterações na interpretação dos resultados obtidos e as discrepâncias existentes entre os estudos [4]

Vários tipos celulares foram identificados como participantes do processo de fibrose observada nas cicatrizes queloidianas, seja de forma primária, como os fibroblastos, ou indiretamente, estimulando-os [18]. Por fibrose, entende-se o acúmulo de componentes do tecido conjuntivo em um órgão, após a ocorrência de injúria tecidual, ou após exposição a estímulos lesivos persistentes, o que desencadeia eventos moleculares e celulares, com consequente deposição excessiva de componentes da matriz extracelular; em última instância, esse processo culmina com formação de cicatriz, alteração da arquitetura tecidual original e, conseqüentemente, alterações funcionais do órgão acometido [26].

Morfologicamente, Limandjaja et al., 2017, 2020, demonstraram em diferentes estudos [4,78], que os queloides apresentam espessura epidérmica maior, associada ao “achatamento” epidérmico, quando comparados à pele normal, cicatrizes normotróficas e hipertróficas, possivelmente devido à diferenciação precoce da epiderme desencadeada pela involucrina, com consequente alteração da formação do estrato córneo, e não à sua

hiperproliferação; essa alteração epidérmica já havia sido demonstrada previamente em alguns casos por Ehrlich et al., 1994, tanto em queloides quanto em cicatrizes hipertróficas, porém sem achados consistentes à época [82]. Na epiderme do queleide, os queratinócitos e melanócitos presentes também desempenham importante papel. Sugere-se que os queratinócitos interajam com os fibroblastos dérmicos, uma vez que queratinócitos extraídos de queloides parecem induzir comportamento anômalo em fibroblastos normais, além de contribuírem para a diminuição das taxas de apoptose dos fibroblastos [18]. Mais recentemente, este achado foi corroborado por outro estudo, que apontou a participação dos queratinócitos no desencadeamento das cicatrizes queloidianas, por meio de sua participação na transição epitélio-mesenquimal [83]. Quanto aos melanócitos, áreas corpóreas com maior densidade dessas células parecem apresentar maior tendência à ocorrência de queloides, e estudo de revisão de literatura sobre essas lesões mostrou que os melanócitos aumentam a expressão de colágeno tipo I e de TGF- β , ao mesmo tempo em que os efeitos supressores da produção de colágeno, pelo hormônio estimulador de α -melanócitos (α MSH), se mostraram desregulados em indivíduos com essas cicatrizes [18].

Na derme queloidiana, hipercelular, encontram-se fibroblastos em número aumentado e mais ativos, aumento do infiltrado de mastócitos e macrófagos [10], além de linfócitos, em quantidade variável [4,14].

Outras linhagens celulares também estão presentes e apresentam relação com essas cicatrizes, como as de miofibroblastos e fibrócitos, aumentados quantitativamente [4], além das células-tronco mesenquimais, que foram associadas com a recorrência da doença [14].

Os fibroblastos são responsáveis pela maior parte da produção do colágeno e da deposição da MEC, tanto na cicatrização normal, quanto na anômala. Essa produção é estimulada por fatores de crescimento fibrogênicos, como fator de crescimento tecidual β (TGF- β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento do fibroblasto β (FGF- β) e fator de crescimento insulina-símile (IGF-I) [18]. Outrossim, os fibroblastos queloidianos apresentam importante crescimento quando estimulados pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), ocasionando maior produção de propeptídeo

carboxiterminal de procolágeno tipo I [84]. A ativação dos fibroblastos por estresse mecânico, sinais imunológicos e citocinas pró-fibróticas, os converte em miofibroblastos [26], causando inflamação persistente e acúmulo excessivo de MEC, conforme já relatado [8,19]; ademais, ao mesmo tempo em que a proliferação de fibroblastos e sua densidade estão aumentadas nas cicatrizes queloidianas, suas taxas de apoptose estão reduzidas, o que, em última instância, contribui para o aspecto fenotípico dos queloides [18].

Os miofibroblastos, que, segundo estudos prévios, apresentavam pequeno papel nos queloides, diferentemente das cicatrizes hipertróficas, parecem ter importância na patogênese das cicatrizes queloidianas, uma vez que foram identificados, nessas lesões, marcadores característicos de ativação dos mesmos, como transglutina, citoglobina/STAP e prolil 4-hidroxilase β , os quais estão implicados em processos fibróticos, bem como miofibroblastos com alfa actina de músculo liso (α SMA) [18]. A expressão da α SMA promove a relatada transição dos fibroblastos para miofibroblastos, com função secretória e contrátil [26].

Quanto à vascularização do tecido queloidiano, estudos prévios demonstraram que o número de vasos sanguíneos é significativamente reduzido na pele de pacientes com quelóide. Mais recentemente, no entanto, outros relatos da literatura sobre a densidade vascular das cicatrizes queloidianas afirmam que essa é variável, tanto reportando aumento, quanto diminuição [4]. Um destes estudos, apontou que indivíduos com predisposição à formação de queloides tendem a ter um aumento da microvasculatura da pele, e que pacientes portadores de cicatrizes queloidianas apresentam aumento da densidade de vasos sanguíneos, aumento da oclusão capilar e aumento dos marcadores endoteliais endotelina e HIF-1 α [85]. Quanto à densidade de fibras nervosas no quelóide, esta foi relatada como aumentada [4].

Sabe-se que outro elemento importante no mecanismo de formação vascular é o TGF- β , que será pormenorizado mais à frente. Este age, também, em outras moléculas efetoras, como as fibronectinas (Fn-EDA), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o PDGF, acentuando a angiogênese [18]

Além do TGF- β , os mastócitos também são responsáveis pela liberação de VEGF. Estas células estão presentes dentro e na periferia do tecido queloidiano, tanto ao redor de vasos como nos feixes de colágeno anômalo, produzindo, também, vários outros fatores pró-angiogênicos, incluindo o fator de crescimento do fibroblasto-2, o fator de crescimento derivado de plaquetas, interleucina 6 (IL-6), triptase e quimase; a triptase, uma protease sérica, é uma potente indutora de angiogênese tecidual, e está relacionada positivamente com as cicatrizes queloidianas [14]

Ao contrário das alterações vasculares sanguíneas presentes no tecido queloidiano, bem conhecidas e reportadas, pouco se sabe sobre o comportamento dos vasos linfáticos nesses tecidos. Os vasos linfáticos diferem dos vasos sanguíneos sadios de várias maneiras. Os capilares linfáticos são constituídos de paredes finas e tubos endoteliais cegos que, ao contrário dos capilares sanguíneos, não apresentam pericitos e uma lâmina basal contínua, mas apresentam grandes aberturas valvares interendoteliais [86,87]. As células endoteliais linfáticas contêm filamentos de ancoragem que os conectam à matriz extracelular e contribuem para a manutenção da permeabilidade dos vasos durante o aumento da pressão tecidual e inflamação [87,88]. Devido à maior permeabilidade, capilares linfáticos, na maioria dos órgãos, são mais eficazes do que os capilares sanguíneos na drenagem de fluido rico em proteínas, com depuração de macromoléculas. Zhang et al., 2018 [89], avaliaram, em seu estudo, a atividade linfangiogênica na pele queloidiana e em controles saudáveis, através dos marcadores endoteliais linfáticos D2-40 (podoplanina) e LYVE-1, e constataram que o número de vasos linfáticos nos pacientes com queleide foi significativamente menor em relação aos controles ($p < 0.05$), indicando uma possível relação entre a linfangiogênese e a patogênese destas cicatrizes.

Em relação à proteômica das cicatrizes queloidianas, objetivando o desenvolvimento de novos e mais efetivos tratamentos para esta alteração cicatricial, por meio da investigação de possíveis biomarcadores, Liu, Li e Zhan, 2022 [21], realizaram a análise proteômica quantitativa sem rótulos por espectrometria de massa, de tecido queloidiano e normal (adjacente ao tecido cicatricial) de 6 pacientes, tendo identificado 206 proteínas com expressão

significativamente maior em queloides, incluindo Reticulocalbina-3 (RCN3), Calumenina (CALU), RCN1 (Reticulocalbina-1) e PDGFRL (proteína receptora-símile de fator de crescimento derivado de plaquetas), sendo que essas duas últimas foram identificadas unicamente nas cicatrizes queloidianas. Entre outros, este estudo também apontou, por meio da análise da rede de interação proteína-proteína, aumento de expressão dos genes *COLVA1* e *COLVA2* [90].

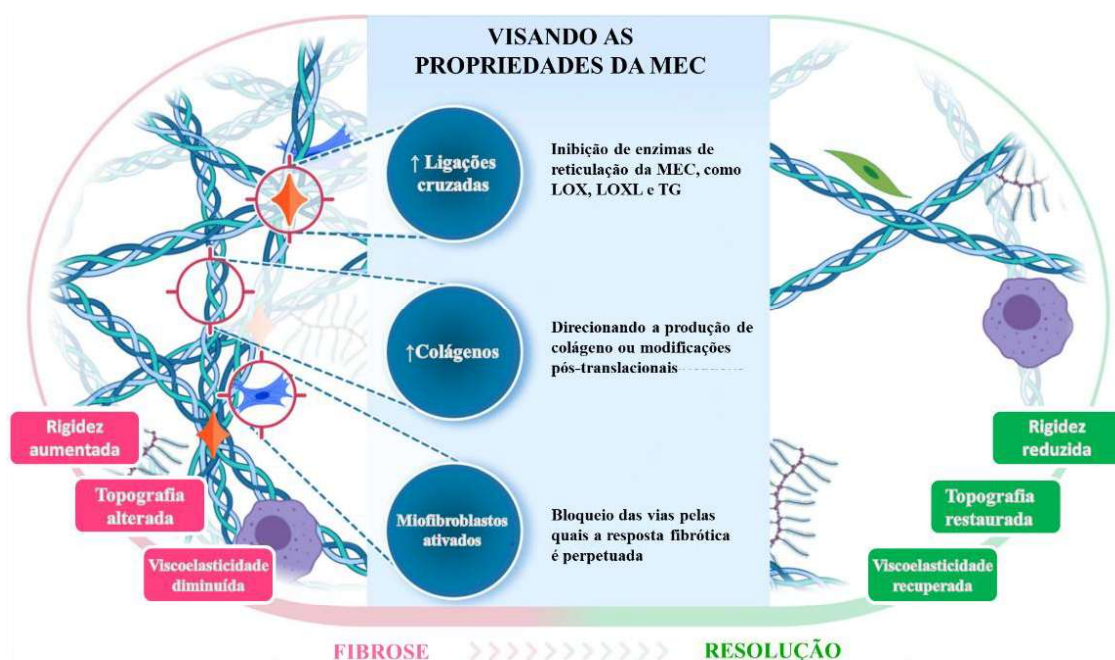
Do ponto de vista endocrinológico, alguns elementos são apontados na patogênese dos queloides. Dentre estes, encontra-se o sistema Renina-Angiotensina, que apresenta papel conhecido em processos fibróticos em diversos órgãos; na derme, este sistema age por meio da atuação de elementos como a angiotensina II, os receptores de angiotensina tipo 1 e angiotensina tipo 2, e a enzima conversora de angiotensina (ECA).

Os receptores de angiotensina I (AT1) promovem fibrogênese e formação de cicatriz, enquanto os receptores de angiotensina II (AT2) atenuam este processo; a angiotensina II age regulando positivamente mediadores pró-inflamatórios (Ex: IL-6, VEGF, TGF- β 1, entre outros), e contribui para a progressão cicatricial por meio do estímulo dos receptores AT1, além de regular negativamente alguns agentes antifibróticos. Outro elemento sugerido como participante da gênese desta doença são os hormônios sexuais, uma vez que estas cicatrizes apresentam níveis elevados de ligação de andrógenos, enquanto os níveis de estrógeno e progesterona são mínimos, o que explica o uso mais recente de medicamentos contendo finasterida para a melhora de alguns aspectos das cicatrizes queloidianas, como prurido e textura. Também, sugere-se que a vitamina D, que desempenha importante papel na regulação de processos celulares e na fibrose tecidual, participe da patogênese do quelóide; nessas cicatrizes, foram encontrados baixos níveis de receptores de vitamina D, além de haver menor síntese desta vitamina em peles mais escuras, o que pode contribuir para a maior suscetibilidade para esta doença [24].

Além dos componentes celulares e vasculares, a MEC e seu microambiente vêm sendo cada vez mais explorados, devido à sua extrema importância e relevância nos processos biológicos [43]. As abordagens atuais da matriz incluem sua análise em tecidos vivos /dinâmicas em tempo real; as Matriterapias, com materiais biomiméticos (hidrogéis, MEC decelularizada) ou

terapias regenerativas; o estudo da MEC no envelhecimento, objetivando promoção de saúde e longevidade; o desenvolvimento de estratégias terapêuticas em processos fibróticos, doenças cardiovasculares e no câncer, entre outras; e a Modelagem computacional e matemática, para uso na predição de interações proteína-proteína (PPI), proteína-DNA, ou reguladores gênicos, sob diferentes estímulos-estresse mecânico, metabólico ou patológico [44]. Sabe-se que ela tem um papel crítico nos processos fibróticos, na ativação dos fibroblastos, e na progressão e permanência da fibrose [43]. Deste modo, muito tem sido estudado sobre o papel da matriz extracelular no desencadeamento das cicatrizes queloidianas, com algumas propostas terapêuticas visando interromper ou amenizar o mecanismo de fibrose, por meio da atuação na MEC, como ilustrado na figura abaixo (**Figura 10**):

Figura 10 - Alterações na MEC e potenciais alvos terapêuticos. MEC, matriz extracelular; LOX, lisil oxidase; LOXL, semelhante à lisil oxidase; TG, transglutaminase.



Fonte: Adaptado de Nizamoglu e Burgess, 2021. [64].

Nos queloides, componentes da MEC, sobretudo os tipos de colágeno cutâneos, estão intimamente imbricados em seu desenvolvimento. Nesta doença, ocorre acúmulo de matriz extracelular, com aumento da produção e irregularidade do alinhamento das fibras colágenas, contrastada pela diminuição

de sua degradação [8,19]. Além desses, outra proteína da MEC, o lumican, também parece estar envolvida na patogênese queloidiana, atuando no agrupamento das fibrilas de colágeno [19].

Um dos principais fatores que condicionam a deposição da matriz, nesses casos, é o TGF- β , regulador primário da reparação tecidual e da fibrogênese [26]. Ele é produzido por diversos tipos celulares, incluindo plaquetas, macrófagos, células epiteliais e fibroblastos; inicialmente, se encontra sob forma inativa na MEC e, uma vez liberado e ativado, se liga a receptores específicos, o que deflagra a ação de vias sinalizatórias intracelulares, incluindo as SMAD-dependentes e SMAD-independentes (não canônicas) [26]. Este fator de crescimento estimula a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno, e inibe a atividade das metaloproteinases da MEC, responsáveis, entre outros, pela degradação do colágeno. No entanto, na periferia das lesões queloidianas, algumas MMPs encontram-se elevadas (MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9), o que promove o alto grau de remodelamento da ferida [18], e faz com que, em geral, essa região das cicatrizes queloidianas apresente maior atividade de crescimento, quando comparada com sua porção central [4]. Sabe-se que as metaloproteinases atuam tanto na derme quanto na epiderme, e desempenham outros papéis além da degradação da MEC, tais como sinalização célula-célula e célula-matriz, assim como papéis intracelulares (regulação epigenética, autofagia e atuação no processo de morte celular) [37].

A ação do TGF- β nas moléculas efectoras, fibronectinas (Fn-EDA), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), acentua, além da angiogênese, a produção de colágeno. O PDGF induz a mitogênese, é quimiotático para fibroblastos e células de musculatura lisa no leito da ferida, estimula a proliferação e a migração celulares e, nos estágios mais avançados da cicatrização, promove aceleração da formação do tecido de granulação e síntese de colágeno. Já, o VEGF atua na multiplicação das células endoteliais, podendo desempenhar papel fisiológico ou patológico, dependendo de sua concentração [18].

Diversas citocinas também estão envolvidas no processo de desencadeamento das cicatrizes queloidianas. Verifica-se o incremento da síntese de várias citocinas pró inflamatórias [84], que alteram a função dos

fibroblastos e promovem acúmulo de matriz extracelular [84], tais como as interleucinas IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IL-18 e IL-22 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α [18,84]. Algumas citocinas, tais como IL-6, IL-8, VEGF-A e fator de crescimento dos fibroblastos, são liberadas pelos próprios fibroblastos, mediando, assim, a angiogênese, a sua própria proliferação, e a deposição de matriz extracelular [91].

Foram relatados, também, níveis aumentados de interferon β (INF- β) e de TGF- β [18], e expressão reduzida de alguns mediadores anti-inflamatórios, que acabam por modular o processo fibrótico, como IL-10, IL-24 e IL-37 [84]. Do mesmo modo, as concentrações séricas dos interferons INF- α e INF- γ , e de fator de necrose tumoral β (TNF- β), que agem através do mecanismo de feedback negativo na produção de colágeno e proliferação de fibroblastos, estão reduzidas nessas lesões, com perda da inibição da produção desta proteína [18].

Outrossim, algumas quimiocinas encontram-se reguladas nos queloides, tais como CXCL1, presente nos miofibroblastos e linfócitos, e relacionada à infiltração inflamatória, além dos receptores de CXCR2, altamente expressos nas células endoteliais e no infiltrado inflamatório; essas quimiocinas acabam por estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias ou fibrogênicas, contribuindo para a ativação dos fibroblastos [84].

Na matriz dérmica é reportado o aumento de proteoglicanos [19] fibronectina, glicosaminoglicanos, sulfato de condroitina, biglicano, versican, tenascina e periostina; outros elementos, como a decorina, estão reduzidos, enquanto os níveis de ácido hialurônico são variáveis [4,10,18,92]

Em relação à elastina, os estudos apontam resultados controversos. Alguns autores relatam níveis reduzidos de elastina na derme dos queloides [4,5,93]; outros, apontam que esta proteína se encontra preservada ou aumentada nessas cicatrizes, porém com distúrbios na montagem das fibras elásticas [94]. Gardeazabal et al., 2024, por exemplo, apontaram que, nos queloides, ocorre um aumento da elastina na derme profunda, porém com redução do *FBN1* (gene codificador da proteína fibrilina-1, constituinte das microfibrilas elásticas), o que acarreta alteração na composição das microfibrilas; este estudo também revelou que os padrões de organização alterada e de

degradação de componentes das fibras elásticas contribuem para a formação das cicatrizes queloidianas [41].

Quanto à periostina, esta é induzida pelas interleucinas 4 e 13, modulando a atividade dos fibroblastos e a reticulação da MEC, contribuindo para o endurecimento dérmico e a progressão da fibrose [26].

Participando do mecanismo etiopatogênico da doença queloidiana, temos, também, algumas vias sinalizatórias. Andrews et al., 2016, relataram o papel da via de sinalização das SMADs, família de proteínas intracelulares reguladoras, no desenvolvimento dos queloides [18]. As SMADs atuam na expressão do gene do procolágeno, sendo sua transcrição mediada pelo TGF- β , através de seu receptor TGF- β tipo I. Também, outras vias sinalizatórias foram apontadas como participantes na formação dos queloides, especialmente as vias imunes Th2 e Janus quinase (JAK) / transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)3, vias de sinalização inatas, Th1 e Th17/Th22 [14], além das vias do fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ Proteína quinase B (AKT), proteína quinase mitógeno ativada (MAPK), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) (36), Wnt/ β -catenina, e a via de sinalização Notch [1,91,96,97].

A via de sinalização JAK/STAT é ativada por fatores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, IL-17, e TNF- α , ocasionando desregulação da resposta celular em queloides; a sinalização do STAT3 encontra-se aumentada nos fibroblastos queloidianos, levando à sua proliferação e produção exacerbada de colágeno [8]; além dessas citocinas, a IL-4 e a IL-13 ativam a via JAK/STAT6, estimulando a migração de fibroblastos e a síntese de colágeno e de outros componentes da MEC, além de regular positivamente genes pró-fibróticos [26]. A via MAPK desempenha vários papéis na patogênese do queloide, por meio de uma rede complexa, que inclui Quinase regulada por sinal extracelular (ERK), Quinase c-Jun N-terminal (JNK), e p38 quinase; em última instância, essa via promove o acúmulo de colágeno, proliferação e migração de fibroblastos, redução da apoptose destas células, além de contribuir para a síntese de MEC. A via PI3K / AKT controla a proliferação de fibroblastos, sua migração e diferenciação em miofibroblastos [8]. Em relação à via sinalizatória canônica Wnt/ β -catenina, a conjugação do ligante Wnt à β -catenina, com sua estabilização e translocação para o núcleo, promove, neste sítio, sua ligação com os fatores de transcrição

Fator de célula T (TCF) e Fator intensificador linfoide (LEF), desencadeando a transcrição de genes pró-fibróticos, tais como os genes dos tipos de colágeno I/II, da fibronectina e da alfa-actina de músculo liso; além disso, o TGF- β pode ativar a via de sinalização Wnt/ β -catenina, por meio de mecanismos diversos, suprimindo os antagonistas da Wnt e contribuindo também para o processo fibrótico [26]. A via de sinalização Notch tem, também, papel pró-fibrótico, atuando por meio da regulação positiva de Notch1, Jagged1, e NICD nos queratinócitos e fibroblastos, com ativação destes últimos e deposição de matriz extracelular [26].

Além destas, outra importante via de sinalização é a via mecanotransdutora; nela, sinais mecânicos, como tensão e estiramento cutâneos são convertidos em sinais bioquímicos, com participação das vias TGF- β /Smad e da integrina, que acabam por promover proliferação excessiva de fibroblastos, deposição de MEC e secreção de fator pró-fibrótico, ocasionando rigidez da matriz queloidiana [8] e hipóxia tecidual [26]. Essa alteração da biomecânica matricial também é responsável pela ativação de fibroblastos, perpetuando o ciclo fibrótico; a MEC também se constitui em reservatório de fatores de crescimento pró-fibróticos, que podem ser ativados e liberados por estresse mecânico ou remodelação enzimática, amplificando a sinalização para este processo patológico [26].

Adicionalmente, um estudo identificou outra via de sinalização, a XBP1-mediada pela resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), que pode estar envolvida na formação dos queloides, o que pode contribuir como alvo terapêutico futuro destas cicatrizes [90].

Em relação às células do sistema imune anteriormente mencionadas como parte da patogênese dos queloides, macrófagos, mastócitos e células T atuam tanto no desencadeamento, quanto na perpetuação destas cicatrizes. Os macrófagos, ao mesmo tempo que possuem papel anti-inflamatório e de restauração tecidual, estimulam a produção de TGF- β 1 e de VEGF, promovendo a deposição de MEC e angiogênese [8]; ainda, os macrófagos do tipo M2 promovem a conversão de fibroblastos em miofibroblastos [83]. As células T (linfócitos T CD4+ e CD8), sobretudo o CD8, estimulam a produção de citocinas, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-10, com estímulo da proliferação de fibroblastos e

síntese de colágeno; os mastócitos, por sua vez, produzem mediadores (histamina, fatores de crescimento e citocinas), além de estimularem a produção de colágeno por meio das vias P13K / AKT / mTOR e TGF- β 1 / SMAD, com consequente progressão do processo fibrótico [8,91]. Nas lesões queloidianas há, ainda, expressão aumentada de marcadores de células T, células T reguladoras (Treg) e células dendríticas (CD) [14].

Mais recentemente, estudos mostraram que a patogênese das cicatrizes queloidianas envolve fatores genéticos e epigenéticos. À semelhança dos processos tumorais, essas cicatrizes hiperproliferativas apresentam metilação aberrante do DNA, o que pode alterar a sinalização celular normal e o controle do crescimento celular, acarretando proliferação anormal de fibroblastos e produção excessiva de colágeno [6].

James et al., 2024, em estudo de revisão sistemática objetivando identificar, na literatura mundial, potencial predisposição genética para formação das cicatrizes queloidianas, identificou os genes *NEDD4*, *VDR* e componentes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) como candidatos para essa doença. Este estudo, no entanto, apresenta como limitações a enorme variabilidade entre os queloides e entre os pacientes com risco de desenvolvimento desta condição [13].

Do ponto de vista epigenético, sabe-se que diversos mecanismos são responsáveis por regular o processo fibrótico na pele; dentre eles, temos como principais representantes, os microRNAs (miRs), RNAs não codificadores de cadeia longa (lncRNAs), e os RNAs circulares (circRNAs) [26]. Os microRNAs são de especial interesse em nosso estudo, e serão abordados em tópico específico.

1.3.2. Fibrilogênese do colágeno no tecido queloidiano

Conforme já explanado, a síntese do colágeno e a fibrogênese são processos complexos com fases intra e extracelulares [10], sendo os tipos de colágeno de interesse em nosso estudo, o I, o III e o V, fibrilares [11], inicialmente

produzidos sob forma de precursores, os quais sofrem maturação, por ação proteolítica (proteases), com posterior formação fibrilar [3].

Andrews et al., 2016 [18], relataram que alguns fatores reguladores da “cascata fibrótica”, como o fator de crescimento beta (TGF- β) e o extra domínio A da fibronectina (Fn-EDA) participam do processo de deposição do colágeno durante o desenvolvimento do quelóide, mas o modo como se dá esse processo de desencadeamento, e a subsequente perpetuação da deposição de colágeno, ainda permanecem desconhecidos; sabe-se que a produção excessiva de colágeno ocorre somente no sítio da ferida [10]. À semelhança do que ocorre nos processos fisiológicos, geneticamente, a síntese do Col I ocorre por expressão dos genes *COL1A1*, localizado no cromossomo 17, codificador da cadeia $\alpha 1(I)$ e *COL1A2*, localizado no cromossomo 7, codificador da cadeia $\alpha 2(I)$. O Col III é produzido pelo gene *COL3A1*, localizado no cromossomo 2. Esses genes são, então, transcritos em RNAs mensageiros (mRNAs), por meio de várias vias de sinalização, como MAPK e NF- κ B, e, posteriormente, traduzidos no retículo endoplasmático rugoso (RER), hidroxilados e glicosilados, transformando-se em moléculas de procólágeno [98]. A molécula de procólágeno tipo I é formada por duas cadeias alfa-1 (α -1) e uma cadeia alfa-2 (α -2), com telopeptídeos curtos conectados aos propeptídeos C e N terminais [3]. Em seguida, o procólágeno tipo I é excretado para o meio extracelular por exocitose, onde as enzimas proteolíticas clivam seus propeptídeos C e N terminais, transformando-o em tropocolágeno. Então, os tropocolágenos se unem para formar as fibrilas de colágeno, que dão origem às fibras colágenas. O colágeno tipo I é considerado como maduro, por ser um heterotrímero composto por duas cadeias idênticas $\alpha 1(I)$ e uma $\alpha 2(I)$; em contraposição, o colágeno tipo III, homotrímero, constituído por três cadeias $\alpha 1(III)$, é um colágeno imaturo, sintetizado durante os estágios iniciais da cicatrização [98].

Ocorre que, segundo o conhecimento atual sobre a patogênese queloidiana, a deposição excessiva de colágeno no sítio da lesão se dá com desbalanço na produção dos diferentes tipos de colágeno, com acúmulo de fibras desorganizadas de colágeno dos tipos I e III, na fase de remodelamento cicatricial, devido à deposição excessiva de colágeno I [99], à não substituição de colágeno III por colágeno I e à não regressão dos vasos sanguíneos [8].

Corroborando alguns desses achados, Silva et al., 2017, mostraram que, quando coradas histologicamente, as cicatrizes queloidianas apresentaram aumento do colágeno total e revelaram feixes de fibras colágenas mais imaturas [98] em relação à pele circundante, com fibrilas mais finas, abundantes e densamente organizadas, predominantemente de colágeno tipo III (Col III), entremeadas por algumas regiões de feixes espessos, de aspecto vítreo e eosinofílico, chamados de colágeno hialinizado; em oposição, a pele adjacente à cicatriz queloidiana continha, mormente, fibras mais espessas, compostas por colágeno tipo I (Col I); o diâmetro reduzido das fibrilas colágenas presentes no queleide sugere a ocorrência de um processo de agrupamento anormal dessas fibrilas [19]. Neste contexto, Zhou et al., 2021, defendem que a montagem da molécula de colágeno em um microambiente matricial patológico acarreta a formação de fibrilas imaturas, em parte, por incremento da produção de proteoglicanos hidrofílicos, que aumentam o conteúdo hídrico nessas cicatrizes, contribuindo para a relatada alteração molecular do colágeno [19].

No sentido da formação das fibrilas heterotípicas, sabe-se que o colágeno tipo V (Col V) tem função na regulação da fibrilogênese. Esta função está relacionada ao domínio globular amino terminal, que impede, fisicamente, que uma grande quantidade de colágeno tipo I, se agregue às fibrilas. Deste modo, menores proporções de Col V favorecem a formação de fibrilas mais grossas e, ao contrário, maiores proporções de Col V contribuem para a formação de fibras mais finas [19].

Outro elemento que parece estar implicado na formação das cicatrizes queloidianas é o Col VI. Este se mostrou em concentrações elevadas, sobretudo nos estágios iniciais de desenvolvimento do queleide, com regulação positiva da expressão de seu gene regulador, que pode ser utilizado como um biomarcador precoce no processo de fibrose desta doença [100]. Peltonen et al., 1991 [101], já haviam relatado, em seu estudo, que os genes do colágeno tipo VI apresentaram níveis de expressão elevados pelos fibroblastos adjacentes às células endoteliais neovasculares, nas fases iniciais do processo fibrótico queloidiano.

Com relação ao colágeno tipo IV, constituinte da membrana basal dermo-epidérmica, a literatura que o relaciona aos queloides é escassa, e apresenta

resultados um tanto conflitantes. Limandjaja et al., 2018 [102], apontaram em seu estudo de modelo de cicatriz *in vitro*, que correlacionou os genes envolvidos na deposição da membrana basal (laminina $\alpha 1$ (*LAMA1*), colágeno tipo 4 $\alpha 2$ (*COL4A2*)), adesão célula-matriz e síntese e degradação da MEC na derme, que a expressão de *COL4A2* diminuiu com o aumento da gravidade da extensão da cicatriz; Ud-Din e Bayat., 2020 [103], relataram que não há evidência de alteração do Col IV na membrana basal das cicatrizes queloidianas, bem como de injúria significativa desta membrana, o que pode explicar o fato dessas lesões não metastatazarem; já, Ala-Kokko et al., 1987 [104], em seu estudo sobre a regulação da expressão gênica em queloides e cultura de fibroblastos obtidos de biópsias de tecido queloidiano, apontaram que não houve síntese de mRNA do procolágeno tipo IV pelos fibroblastos queloidianos.

Do mesmo modo que o Col V, o lumican, outra proteína da MEC, também parece estar envolvida no agrupamento das fibrilas de colágeno no quelóide [19].

Além desses, outros elementos aparecem como associados à fibrilogênese do colágeno nos queloides, a exemplo dos biglicans e proteoglicanos presentes na superfície das fibrilas de colágeno tipo I, que se encontra aumentado no tecido queloidiano, mais pronunciadamente em suas formações nodulares [92], as metaloproteinases (MMPs) meprina α e meprina β , pró-colagênicas, responsáveis por realizar a clivagem dos pró-domínios terminais C e N dos tipos de colágeno fibrilares I e III, expressos nos fibroblastos humanos, garantindo a maturação do colágeno e sua formação fibrilar [3], as MMPs 1, 2 e 13, as TIMPs 1 e 2 [8], e moléculas envolvidas na formação do colágeno, como a LOX, que se mostrou envolvida na reticulação das fibrilas de colágeno, para formar fibras de colágeno espessadas e densamente organizadas [19].

1.3.3. Regulação Epigenética - MicroRNAs e o processo de fibrose tecidual

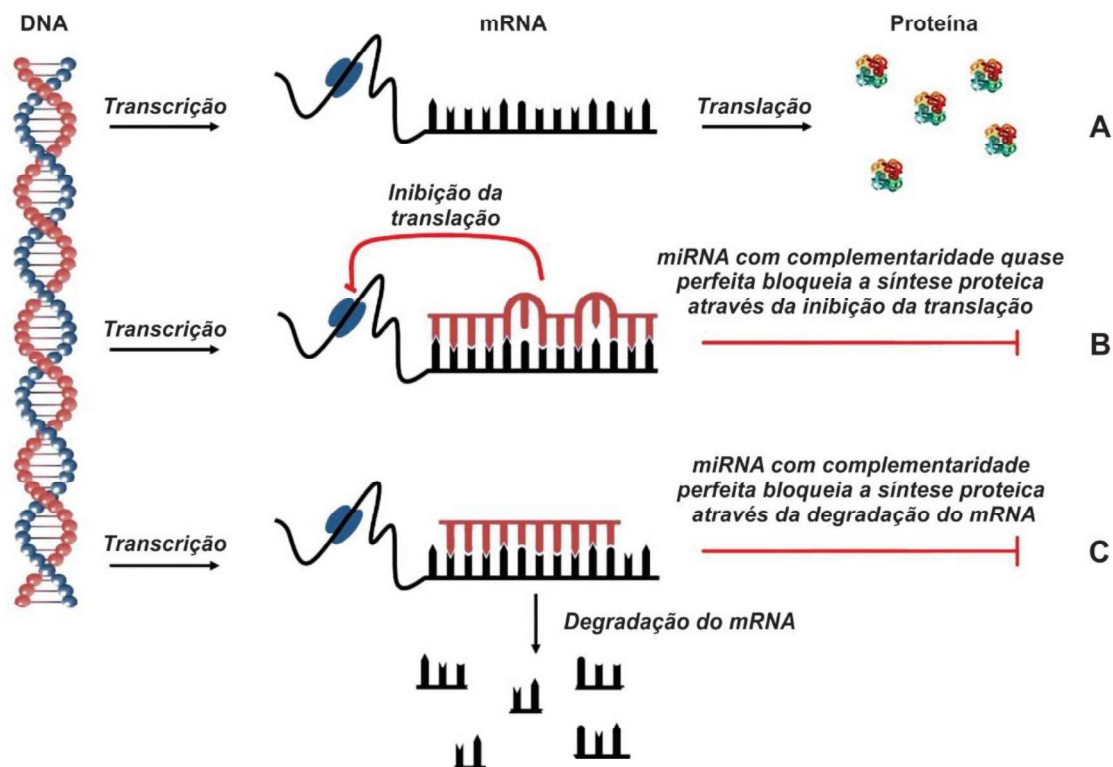
Em nosso estudo, para além das alterações histológicas e do microambiente matricial queloidiano já relatados, procuramos correlacioná-las a mecanismos epigenéticos possivelmente envolvidos na formação dessas cicatrizes patológicas. Como principais representantes, reguladores de

processos fibróticos cutâneos e várias outras doenças, encontram-se os microRNAs (miRs), RNAs não codificadores de cadeia longa (lncRNAs), e os RNAs circulares (circRNAs) [26].

Yu et al., 2022, demonstraram, em seu estudo, que os RNAs de cadeia longa podem estar hiperregulados, promovendo fibrose cutânea, ou hiporregulados, com supressão desta; estes RNAs não codificadores regulam os processos envolvidos nas cicatrizes queloidianas, incluindo a proliferação de fibroblastos, a deposição de MEC, a sinalização pela via Wnt, a sinalização Hh (Hedgehog) e a sinalização pelo TGF- β [105]. Já, os RNAs circulares são responsáveis por regular a viabilidade dos fibroblastos queloidianos [21].

MicroRNAs são RNAs pequenos, não codificadores, de aproximadamente 22 nucleotídeos, capazes de controlar a expressão gênica pós-transcricional, por meio da complementaridade com um RNA mensageiro alvo [106,107]. Eles estão presentes em quase todas as células eucarióticas [108], e podem se ligar a centenas de genes, regulando sua expressão [106]. São os RNAs que regulam negativamente a expressão de genes alvo, inibindo níveis de translação [106,109], ou mesmo iniciando a degradação do RNA mensageiro (**Figura 11**) [83,108].

Figura 11 - Representação esquemática do mecanismo de ação do microRNA. Na primeira etapa da síntese proteica, o DNA que codifica a proteína de interesse é convertido em mRNA (transcrição). (A) Na ausência de miRNA, os transcritos de mRNA são convertidos em proteína (tradução). (B) Na presença de miRNA com complementaridade parcial, quase perfeita, ao mRNA de interesse, o miRNA se liga à região 3' UTR e reprime a tradução, inibindo a síntese proteica. (C) Na presença de miRNA com complementaridade perfeita, acredita-se que a ligação do miRNA à região 3' UTR iniba a síntese proteica, por meio da indução da degradação do mRNA.



Fonte: Adaptado de Romaine et al., 2015 [110].

MicroRNAs maduros são produzidos a partir de transcritos de pré-miRs, pela enzima Dicer; seus genes podem estar em regiões intergênicas ou em íntrons, e um único microRNA pode controlar mais de 200 genes-alvo. Cerca de 1/3 dos genes relacionados a processos de proliferação, diferenciação, desenvolvimento, metabolismo e apoptose celulares são regulados pelos microRNAs [108].

Numerosos estudos demonstraram que os microRNAs atuam em vários processos biológicos importantes, incluindo crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose [106,109]. Previamente, demonstrou-se que, dentre os genes codificadores de microRNAs humanos, cerca de 50% se localizam em regiões cromossômicas associadas a tumores [108].

Muito tem se investigado a respeito da participação e mecanismo de ação desses reguladores epigenéticos, que constituem, na atualidade, uma das maiores tendências de pesquisa em relação às cicatrizes queloidianas, com numerosos estudos existentes na literatura a respeito dos papéis críticos de vários microRNAs na regulação do desenvolvimento do quelóide [106,109]. Destes, vários artigos mencionam o papel dos microRNAs 21, 29, 203, 34 e 196a na patogênese desta alteração cicatricial [2,107,109,111–117].

Shi et al., 2018, relataram que a superexpressão do miR-203 *in vitro* ocasionou um decréscimo significativo na proliferação, invasão e na produção de MEC nos fibroblastos queloidianos, enquanto a inibição do miR-203 induziu resultados opostos [109]. De Felice et al., 2018, apontaram que os fibroblastos de quelóides que apresentam maior expressão de miR-34 também têm expressão diferencial de genes envolvidos na via sinalizatória apoptótica, como o p53 [107]. Em outro estudo, o miR 196, quando inibido, aumentou a expressão do colágeno dos tipos I e III nos fibroblastos queloidianos [117].

Com relação ao miR-29, alguns estudos apontam que este microRNA, antifibrótico, está suprimido em órgãos fibróticos [112,114]. Ainda, Zhang et al., 2016, apontaram que os níveis de miR-29a, miR-29b e miR-29c se mostraram reduzidos em fibroblastos queloidianos, em relação a fibroblastos saudáveis [118].

Os microRNAs 141-3p, miR-181a e miR-205 parecem estar regulados para estimular a proliferação e diminuir a apoptose dos fibroblastos derivados de quelóides, aumentando a produção de colágeno. Já, o miR-637 e o miR-1224 têm como alvo a via de sinalização TGF- β 1/Smad3, inibindo a proliferação dos fibroblastos queloidianos e promovendo sua apoptose [111].

Em fibroblastos de cicatrizes queloidianas, os reguladores antifibróticos miR-200c, miR-92b, miR-1224-5p e miR-133a-3p são expressos em níveis baixos [14]. Por outro lado, a superexpressão do miR-133a-3p inibe o processo fibrótico através da regulação negativa do Fator Regulador de Interferon 5 (IRF5), com consequente inibição da via de sinalização do TGF- β /Smad2, além de promover a apoptose dos fibroblastos e reduzir sua proliferação [119].

O miR-424-3p foi considerado, em outro estudo, também como alvo final de maior relevância para a progressão desta anomalia cicatricial, atuando no controle da proliferação, migração e apoptose celular, bem como da deposição de MEC, através da via de sinalização do TGF- β 1/ Smad [120].

He et al., 2022, identificaram 15 miRs e 12 mRNAs alvo como potenciais biomarcadores dos pacientes com quelóide; os resultados de RT-qPCR apontaram regulação negativa para o miR-29a-3p, miR-92a-3p, e miR-143-3p, enquanto seus RNAs mensageiros se apresentaram positivamente regulados ($p < 0,05$) [106].

Já, Yin et al., 2022, em seu estudo sobre RNAs não codificadores, identificaram e validaram múltiplos microRNAs diferenciais em cicatrizes queloidianas, tais como o miR 202 e o miR-41, estes muito expressos; miR-548 e miR-154, as famílias mais contadas de microRNAs; e os microRNAs 21 e 199, que têm o maior número de leituras totais [83].

O microRNA-21 foi um dos primeiros RNAs não codificadores identificados, apresentando reconhecida função oncogênica, por estimular a proliferação e migração celulares e inibir a apoptose, durante o processo tumorigênico [111]. Está associado a diversos tipos de câncer, nos quais regula genes como *PTEN*, *TPM1* e *PDCD* [116], desempenhando papel relevante na recorrência e metástase neoplásica [121]. Além de sua atuação em neoplasias, o miR-21 encontra-se superexpresso em diferentes condições patológicas, modulando a expressão proteica não apenas em tumores, como o glioblastoma [108], mas também em processos inflamatórios e imunológicos. De modo mais amplo, esse microRNA também está envolvido na patogênese de doenças fibróticas, incluindo os quelóides, controlando o processo de fibrose em múltiplos órgãos e tecidos por meio da regulação de diversas vias de sinalização [122].

Em relação ao miR-199, este já foi descrito como participante do desencadeamento de diversas condições patológicas. Este miR se encontra associado a uma variedade de carcinomas, tanto no papel de promotor, quanto de inibidor destes tumores [123]. Um estudo revelou que os membros dessa família de microRNAs estão inibidos em tecidos com carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço [124].

Renjie et al., 2023, observaram, em seu estudo, que a redução da expressão sérica de miR-199-3p foi associada ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) grave e de DM2 associado à doença cardíaca coronariana, podendo prever resultados adversos nestes últimos [125]. Este miR também apresenta ação antiapoptótica na Síndrome de Sézary [123], uma forma rara e agressiva de linfoma cutâneo de células T [126], contribuindo para a sobrevivência tumoral. Ainda, na osteoartrite, a regulação positiva do miR-199a-3p inibe a resposta inflamatória e promove a autofagia nos condrócitos [127].

O miR-199a-5p aparece expresso de modo anormal em diversos tipos de tumores, envolvido na regulação, proliferação, angiogênese, invasão, metástase e apoptose destes [111]. Foi relatado que ele atua na inibição da proliferação celular, migração e invasão tumorais no câncer testicular [108]; no carcinoma colorretal, o miR-199a-5p pode inibir a proliferação, migração e invasão celulares; no pulmão, este miR inibe a angiogênese em células tumorais não pequenas hipóxicas, bem como, no ovário, estimula a apoptose das células cancerígenas [123]. O miR-199a-5p também pode estimular ou inibir a autofagia (processo que elimina componentes celulares danificados) induzida por radiação, no câncer de mama, e sua hiporregulação pode estimular a autofagia no hepatocarcinoma, aumentando a resistência às drogas. Este miR, quando hiporregulado, pode também contribuir para um desfecho desfavorável em pacientes com sarcoma de partes moles [128]. O miR-199a-5p, ainda, regula a glicólise, o que reforça sua associação negativa com quadros de malignidade [123].

Com relação ao mecanismo regulatório do miR-199a sobre a apoptose em algumas doenças neoplásicas, os microRNAs miR-199a-5p/3p promovem estímulo desse mecanismo em células cancerígenas A549 [123].

O miR-199a-5p e o miR-199a-3p foram identificados como estando inibidos em células de hepatocarcinoma [108]; no câncer de mama altamente metastático, a expressão do miR-199a/b-3p geralmente está reduzida, o que está associado à perda de sua função supressora [123]. Por outro lado, no câncer gástrico, o miR-199a está elevado, sendo responsável por reduzir a proteína MAP3K11, uma proteína inibidora tumoral, estimulando o crescimento e a metástase tumorais [108].

Hong et al., 2023, demonstraram, em seu estudo, que no câncer gástrico difuso, além do já relatado aumento da expressão do miR-199-a, ocorre aumento do miR-199b, o que foi associado à progressão da doença, por meio do aumento da invasão linfovascular, do estágio T avançado e da presença de metástase linfonodal [129].

Além das doenças neoplásicas, o miR-199a-5p também foi envolvido no mecanismo de apoptose de cardiomiócitos, diminuindo esta quando inibido em situações de hipóxia tissular, com efeitos positivos sobre o organismo. Com relação à sua já relatada atuação em processos de autofagia, este miR pode prejudicar a autofagia no coração, induzindo a hipertrofia miocárdica [123]. O miR-199a-5p atua, igualmente, no processo de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos em células endoteliais irradiadas de veia umbilical humana, na indução da expressão de colágeno tipo I e de α -actina de músculo liso em células MRC-5 (linhagem de células diploides usada na produção de vacinas e derivada de fibroblastos isolados de tecido pulmonar de embrião, masculino, com 14 semanas de vida) [130]; também atua em modelos de obstrução ureteral unilateral, fibrose renal, hepática e de hipertrofia cardíaca, em ratos [108,111], sugerindo que a alteração deste microRNA pode desencadear um mecanismo que contribui para o processo de fibrose [111]. Lu et al., 2022, apontaram que, na osteoartrite, o silenciamento deste microRNA parece promover uma melhora nas desordens da marcha, além de melhorar a sobrevida dos condrócitos e as condições do indivíduo portador desta doença [131]. Adicionalmente, um estudo de 2024 realizado em indivíduos com psoríase, revelou que os níveis do miR-199a se mostraram inversamente proporcionais ao grau de severidade desta doença [132].

Em nosso estudo, daremos ênfase para a análise dos microRNAs 21 e 199, por estarem relacionados com a doença queloidiana.

1.3.3.1. Os microRNAs 21 (miR-21) e 199 (miR-199) e sua relação com as cicatrizes queloidianas

O miR-21 é um microRNA policistrônico, cujo gene está localizado no cromossomo 17q23.2 [122], e já amplamente estudado em processos cicatriciais [83] e de contração da ferida [116].

Grafanaki et al., 2025, citam, em seu estudo, que em cicatrizes queloidianas, a expressão do microRNA 21 aumenta 2,5 a 4,2 vezes, quando comparada à pele normal ($p < 0.01$) [26]. Já, Wu et al., 2019, mostraram que este microRNA se encontra aumentado no citoplasma dos tecidos queloidianos, especialmente nos fibroblastos, mas também na epiderme, estando hiperregulado cerca de 16,43 vezes em queloides, quando comparado à pele normal, sendo 4,19 vezes mais expresso em fibroblastos e 9,86 vezes mais expresso na epiderme queloidiana [133].

A exemplo de outros microRNAs já citados em queloides, o miR-21 atua estimulando a proliferação, migração [83], e invasão dos fibroblastos [111], e diminuindo sua apoptose, com aumento da produção de colágeno por estímulo da via TGF β /SMAD, por meio da qual promove inibição da expressão da proteína Smad7 e sofre regulação positiva pelo TGF- β 1 [8,14,115,134]. O TGF- β regula positivamente vários genes associados à fibrogênese, controlando o processo de fibrose através de mediadores como Smad2 e Smad3 [122]; a sinalização pelo TGF β e o Smad3 atuam de modo importante na transcrição do miR-21, sendo que as proteínas da família Smad controlam a maturação do pré-miR-21 em miR-21. Neste sentido, enquanto o Smad3 estimula a maturação do pré-miR-21, o Smad2 o inibe [122].

Liu et al., 2022, demonstram a existência de sítios de ligação entre o miR-21-5p e a região 3' não traduzida do gene *SMAD7* (*SMAD7 3'UTR*); os níveis de *SMAD7* se encontram diminuídos nos tecidos e em fibroblastos queloidianos em relação aos tecidos normais, com uma relação inversamente proporcional entre miR-21-5p e *SMAD7* no quelóide. O artigo aponta, ainda, que a transfecção com um inibidor específico do miR-21-5p aumentou a apoptose e reduziu a migração e a invasão dos fibroblastos queloidianos, enquanto a baixa expressão do *SMAD7* teve o efeito oposto [21]. O miR-21-5p se encontra aumentado, de modo

significativo, na derme queloidiana, quando comparado à derme normal, promovendo migração e autofagia, o que contribui para o desenvolvimento e a recorrência do quelóide; a inibição deste microRNA leva a um decréscimo importante na porcentagem de células autofagia-positivas e aumento da apoptose nos fibroblastos queloidianos [121]. No nível proteico, moléculas mimetizadoras da ação do miR-21 aumentam a expressão do colágeno dos tipos I e III, ocorrendo decréscimo destes com moléculas inibidoras deste miR [133].

Além da via TGF β /SMAD, Xilei et al., 2020, demonstraram que o miR-21, com expressão aumentada nos fibroblastos queloidianos, pode regular a proliferação e a apoptose destes, por meio da via de sinalização P13K/AKT [95].

Outra via já relatada como envolvida no processo fibrótico, a ERK / MAPK, também pode ativar outra via de sinalização, a NF- κ B, inibindo a expressão do miR-21 [122].

Ademais, o miR-21 modula a expressão da fosfatase e tensina homólogo deletadas no cromossomo 10 (*PTEN*) [1], suprimindo-a, e a via AKT fosforilada (p-AKT), ativando-a, o que pode contribuir para a invasão e recorrência dos quelóides, por meio da indução da transição epitélio-mesenquimal e da manutenção das células em estágio indiferenciado. Estes aspectos podem ser verificados por meio da expressão de marcadores da transição epitélio-mesênquima, vimentina e E-caderina, e da expressão de marcadores de indiferenciação celular, o CD44 e a aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) [111].

Em relação ao miR-199, esta família de microRNAs é composta por 3 membros, o miR-199a-1, miR-199a-2, e o miR-199b, localizados nos cromossomos humanos 19p13.2, 1q24.3, e 9q34.11, respectivamente; além desses, dois outros microRNAs maduros (o fita-guia e o fita passageira), derivados de cada pré-microRNA, fazem parte desta família [124]. O gene codificador do miR-199a está localizado no 16º intron do gene *DNM2*. A maioria dos microRNAs é processada no citoplasma, pela enzima Dicer, gerando microRNAs de fita dupla semelhantes a um RNA de interferência pequeno (siRNA), formados por um duplex com dois fragmentos: o microRNA e o microRNA*, também chamados de -5p e -3p, respectivamente [108].

Neste âmbito, Wu et al., 2014, revelaram que a taxa de proliferação (Fase G1) de fibroblastos derivados de queloides diminuiu, e a porcentagem de fibroblastos em fases S e G2/M aumentou, após a transfecção de moléculas que mimetizam o miR-199, sugerindo que o miR199a-5p pode inibir a proliferação de fibroblastos queloidianos; deste modo, este estudo supôs que a regulação negativa deste microRNA pode inibir a apoptose e estimular o desenvolvimento das cicatrizes queloidianas, o que pode ser mediado por alterações no ciclo celular [108]; esta inibição do miR199a-5p em queloides foi confirmada por RT-qPCR, e o restabelecimento de sua expressão inibiu a proliferação dos fibroblastos [116]. Corroborando estes achados, Duan et al., 2020, apontaram a inibição deste microRNA em cicatrizes queloidianas, levando à conclusão de que este pode reduzir a expressão dos genes envolvidos na proliferação dos fibroblastos, através da regulação do ciclo celular [95]. Outro estudo demonstrou que o fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF1A), fator este relacionado com a cicatrização anormal, parece ser um possível alvo do miR-199 [83].

Embora existam vários estudos que associam a família miR-199a a queloides, as buscas na literatura mundial revelaram que estes estudos tratam, principalmente, do papel da cadeia -5p (miR-199a-5p) nesta condição patológica.

No contexto da fibrose, miR-199a-3p tende a agir como pró-fibrótico em vários modelos de fibrose, mas o comportamento é fortemente dependente do tecido e do contexto experimental.

Yang et al., 2020, relataram, em seu estudo, aumento da expressão deste miR durante a ativação de células hepáticas estreladas *in vitro* e durante a fibrogênese hepática, por meio da ativação da via de sinalização do TGF- β [135]. Em contraposição, Choi et al., 2024, apontaram, em estudo com modelo experimental de fibrose hepática em ratos, a ação antifibrótica deste miR, por meio da regulação negativa da quinase 17 dependente de ciclina (CDK17) [136]. Liu et al., 2025, por sua vez, revelaram em modelos com ratos, *in vitro* e *in vivo*, que a expressão aumentada do miR-199a-3p exacerba a fibrose e a degeneração do disco intervertebral [137].

Em queloides, a função do miR-199a-3p permanece indeterminada, por falta de estudos funcionais específicos, de modo que não há, ainda, consenso e, tampouco, estudos funcionais robustos que definam o miR-199a-3p como pró- ou antifibrótico nesta doença. Estudos relevantes, como demonstrado, vêm de outros órgãos fibrosados, e fornecem alvos e mecanismos testáveis para quelóide, de modo que sua investigação na patogênese queloidiana é de especial interesse no presente estudo.

1.4. Justificativa do estudo

As cicatrizes queloidianas trazem grande impacto negativo, do ponto de vista funcional e estético, aos seus portadores e, apesar de terem caráter benigno e, portanto, não metastatizarem, exibem características similares a tumores, incluindo suscetibilidade genética, proliferação descontrolada com padrão de crescimento agressivo, resistência ao tratamento e altas taxas de recorrência, podendo elevá-los à outra condição, que não somente a de meras cicatrizes [6].

Estima-se que, todos os anos, cerca de 100 milhões de pessoas desenvolvam novas cicatrizes, das quais, aproximadamente 10% evoluem para queloides. Do ponto de vista genético, existe uma predisposição para esta doença em povos de origem africana subsaariana. A prevalência desta condição, relatada na Inglaterra, no Japão, no Quênia, na Zâmbia e no Zaire foram, respectivamente, 0.09 %, 0.10 %, 8.50 %, 9 % e 16 %, com prevalência de 4,5 a 16% em populações hispânicas e afro-americanas. Algumas evidências apontam maior predisposição em mulheres e, em relação à idade de acometimento, a maior parte ocorre em adolescentes ou adultos jovens, com menor incidência em bebês e em crianças pequenas [6].

Os estudos sobre qualidade de vida relacionada à saúde (QVRS) em pessoas com cicatrizes queloidianas evidenciam que essa condição afeta, de forma significativa, o bem-estar emocional e psicológico dos pacientes [22,23,138]. Sintomas como prurido, dor e limitação de movimentos são os principais fatores que comprometem a qualidade de vida, muitas vezes em grau comparável ao impacto de doenças graves como psoríase, artrite e câncer [22].

Além dos aspectos funcionais, as alterações estéticas e emocionais decorrentes desta condição também contribuem para o sofrimento psicológico [22,138]. A recorrência dos queloides, sua gravidade e a presença de hiperpigmentação, estas duas últimas mais comuns em indivíduos de pele não branca, estão associadas à uma pior percepção de qualidade de vida [14,23]. Em conjunto, esses aspectos reforçam a necessidade de abordagens terapêuticas que considerem não apenas o tratamento físico das lesões, mas também o apoio emocional e psicossocial aos pacientes.

Embora as cicatrizes queloidianas venham, há muito tempo, sendo estudadas sob diversos aspectos, e sua complexa patogênese tenha sido relacionada a múltiplos fatores, incluindo inflamação crônica, fatores autoimunes, vasculares e genéticos [19], ainda existem muitos pontos obscuros sobre sua etiopatogenia. Isso impacta diretamente as alternativas terapêuticas existentes, que não são capazes de curar e, tampouco, controlar de modo efetivo a sua progressão.

Neste âmbito, muito tem sido estudado sobre o papel da MEC e de seu microambiente em inúmeras doenças. Sabe-se que a MEC desempenha papel essencial na estrutura e função dos tecidos, participando de processos como adesão, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular [44,45]. Longe de ser apenas uma substância de sustentação, a MEC atua ativamente na comunicação celular, por meio de sinais bioquímicos e mecânicos, influenciando tanto condições fisiológicas quanto patológicas, como cicatrização, fibrose e câncer [44,45]. Entre seus componentes, o colágeno é o principal elemento estrutural, responsável por manter a integridade, resistência e funcionalidade da pele, além de participar da sinalização celular [37,44,62]. Diante disso, o estudo do colágeno em cicatrizes queloidianas é fundamental, pois alterações em sua produção, organização e remodelamento estão diretamente relacionadas à formação anormal do tecido cicatricial e ao desenvolvimento do fenótipo fibroso característico dos queloides [8,19]. Assim, compreender o papel do colágeno nesse contexto pode contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na doença e, conseqüentemente, para novas abordagens terapêuticas.

De fundamental importância, torna-se, então, a investigação das alterações do colágeno dos tipos I, III e V, principais tipos de colágeno fibrilares na pele humana. Os dois primeiros (I e III) são os mais abundantes no corpo humano [11,58]; já o colágeno tipo V, embora ocorra em menor proporção, compreendendo por volta de 4 a 5% do colágeno da matriz dérmica [33], desempenha papel de extrema importância, sendo crucial, sobretudo, nos processos de proliferação e reparação tecidual, por meio de nucleação e fibrilação do colágeno dos tipos I e III [37,69], regulando o diâmetro fibrilar e, também, induzindo a proliferação dos fibroblastos dérmicos. Assim, alterações nesses tipos de colágeno, com consequente disfunção no remodelamento da matriz extracelular em indivíduos predispostos ao desenvolvimento de cicatrizes queloidianas, promove alterações morfológicas no tecido cutâneo que, em última instância, confere as características clínico-patológicas da doença. Neste contexto, apesar de já se conhecer a estrutura das alterações presentes nessas cicatrizes, desconhece-se o efeito do remodelamento da matriz fibrilar no fenótipo dos diferentes compartimentos dérmicos. Portanto, o estabelecimento de escores histológicos que possam avaliar a heterogeneidade queloidiana, através da correlação entre a morfologia tecidual (dada, por exemplo, pela organização, espessura e hialinização das fibras), função biológica dos tipos de colágeno e aspectos moleculares seriam ferramentas de grande valia na avaliação dos queloides, auxiliando no entendimento sobre atividade fibrogênica e maturação do tecido acometido.

Igualmente, a investigação dos mecanismos regulatórios epigenéticos deste processo patológico são importantes, proporcionando, assim, mais um passo no conhecimento da patogênese das cicatrizes queloidianas. Neste cenário, os microRNAs, RNAs de cadeia curta não codificadores, desempenham papel crucial, uma vez serem capazes de controlar a expressão gênica pós-transcricional através da complementaridade com um RNA mensageiro alvo [106,107]. Esta propriedade lhes permite atuar em vários processos biológicos importantes, incluindo crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose [106,109].

Embora nas cicatrizes queloidianas, diversos microRNAs tenham sido descritos como associados à essa condição patológica, por meio de sua

promoção ou inibição [8,14,83,108,111,115,116,122,134,139], em nosso estudo, este mecanismo regulatório foi investigado por meio da correlação entre a síntese proteica colagênica e os microRNAs 21 e 199, envolvidos em diversas condições clínicas patológicas, dentre as quais, as doenças fibróticas.

O miR-21 destaca-se como um importante regulador pró-fibrótico e oncogênico, amplamente descrito em diversos tipos de neoplasias e em doenças caracterizadas por remodelamento tecidual [108,140]. Sua superexpressão está associada à estimulação da proliferação e migração celulares, bem como à inibição da apoptose, mecanismos que favorecem tanto a tumorigênese quanto a fibrose [111,122]. Em tecidos como coração, pulmões, fígado e pele, o miR-21 modula múltiplas vias de sinalização relacionadas ao acúmulo de matriz extracelular [122]. De modo similar, nos queloides, esta molécula está intimamente associada ao desencadeamento da fibrose.

Por outro lado, o miR-199 apresenta comportamento funcional variável, atuando ora como supressor, ora como promotor de processos neoplásicos e fibróticos, a depender do contexto tecidual [108,111,123,128]. Em modelos experimentais de fibrose renal e hepática, alterações em sua expressão demonstraram potencial influência na ativação de mecanismos pró-fibróticos [111]. Estudos preliminares sugerem que o miR-199a-5p possa exercer um efeito anti-fibrótico em queloides, uma vez que sua hiporregulação está associada à maior proliferação de fibroblastos e acúmulo de matriz extracelular nesses tecidos [108,116,139]. No entanto, em relação ao miR-199a-3p, molécula investigada em nosso estudo, faltam dados a respeito de sua atuação na patogênese queloidiana. Este miR, além de outros processos patológicos, participa do mecanismo de desencadeamento de doenças fibróticas, com algumas evidências relatadas na literatura. Choi et al., 2024, observaram em tecido hepático de camundongo TAA e células estreladas hepáticas humanas ativadas *in vitro*, que um mimético de miR-199a reduz a fibrose por meio da inibição da ativação e proliferação de destas células estreladas, tendo como alvo funcional o gene *CDK17* (Quinase 17 dependente de ciclina), hiporregulando-o [136]. Wu et al., 2025, relatam que, em seu estudo prévio, foi demonstrado que o miR-199a-3p, assim como o miR-199a-5p promovem hipertrofia cardíaca e fibrose neste órgão [141].

Assim, ao se considerar os compartimentos histológicos da cicatriz queloidiana e os padrões de expressão dos microRNAs miR-21 e miR-199, nosso estudo possibilita discutir alguns mecanismos moleculares que, possivelmente, participam da regulação da fibrillogênese dérmica. Ainda, esta análise morfo-molecular pode revelar um gradiente de remodelamento dérmico, refletindo diferentes estágios de maturação da lesão queloidiana. Em última instância, este estudo pode oferecer aprendizados valiosos para a clínica, dentre os quais, permitir a estratificação de queloides com base em seu “estado” biológico, identificar biomarcadores prognósticos ou de atividade, e apoiar o desenvolvimento de terapias dirigidas.

2. OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1. Objetivo geral

Investigar, em lesões queloidianas, a organização das fibras de colágeno nos diferentes compartimentos dérmicos e o perfil molecular relacionado ao colágeno e aos microRNAs, a fim de compreender os mecanismos de remodelamento dérmico e de fibrogênese envolvidos na formação do quelóide.

2.2. Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar, de forma qualitativa e quantitativa, a presença de células mesenquimais, o grau de vascularização, as alterações epidérmicas e o infiltrado inflamatório em lesões queloidianas, utilizando escores histológicos.
- 2) Avaliar, qualitativa e quantitativamente, a organização, a espessura e o grau de hialinização das fibras colágenas, por meio de escores histológicos.
- 3) Determinar a expressão proteica do colágeno dos tipos I, III e V nas regiões papilar e reticular da derme de quelóides, utilizando imunofluorescência e histomorfometria .
- 4) Quantificar a expressão gênica do colágeno dos tipos I, III e V por RT-qPCR e correlacioná-la com os escores morfológicos obtidos.
- 5) Analisar e quantificar a expressão dos microRNAs miR-21-5p e miR-199a-3p por RT-PCR nas lesões queloidianas e correlacioná-la com os escores morfológicos.
- 6) Integrar os achados morfológicos, moleculares e funcionais para propor um modelo conceitual de remodelamento dérmico e discutir suas implicações para o desenvolvimento de terapias antifibróticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e período do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia (LIM17) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, entre janeiro de 2020 e dezembro de 2025. Todos os procedimentos laboratoriais seguiram normas de biossegurança do LIM17, garantindo padronização e reprodutibilidade das análises.

3.2. Aspectos éticos

O estudo utilizou tecido cutâneo humano obtido de procedimentos cirúrgicos eletivos, previamente autorizados. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP (parecer nº 3.801.459), de acordo com a Declaração de Helsinque. Todos os participantes assinaram consentimento informado, com informações detalhadas sobre objetivos, procedimentos, riscos e confidencialidade. O armazenamento do material biológico seguiu a Resolução CNS nº 441/2011, garantindo segurança, rastreabilidade e proteção do paciente. Qualquer uso futuro do material dependerá de nova aprovação ética.

3.3. Seleção de pacientes

Foram incluídos 20 pacientes com cicatrizes queloidianas, atendidos nos ambulatórios de cirurgia plástica da FMUSP e do Centro Hospitalar de Santo André (SP). O grupo controle foi constituído por 6 amostras de pele saudável provenientes de pacientes submetidos a cirurgias plásticas estéticas (mamoplastia e abdominoplastia), sem histórico de cicatrizes hiperproliferativas.

Critérios de inclusão:

- Idade entre 15 e 60 anos;
- Ausência de corticoterapia ou tratamentos imunomoduladores nos últimos seis meses;
- Ausência de doenças autoimunes ou imunossupressoras;

- Consentimento informado assinado.

Classificação das cicatrizes: O Japan Scar Scale., 2020 foi utilizado para diferenciar cicatrizes maduras, hipertróficas e queloidianas, permitindo padronização na estratificação clínica [142]

3.4. Coleta e processamento do tecido

Após anestesia locorregional com xilocaína 2% associada a vasoconstritor (cloridrato de lidocaína e epinefrina), foram obtidos fragmentos periféricos de 3–4 mm de diâmetro dos queloides, utilizando punch dermatológico. A escolha da região periférica visa capturar tecido com maior atividade celular e remodelamento extracelular, representativo da progressão do queleide. Os fragmentos coletados foram imersos em formol 10% tamponado durante aproximadamente 24 horas, para posterior análise histológica. Para as análises moleculares, fragmentos foram imersos em nitrogênio líquido e mantidos a -70°C.

3.5. Avaliação Histológica

Para a avaliação morfológica, as amostras embebidas em parafina foram cortadas em micrótomo, numa espessura de 3-4 µm, e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson. A coloração de Hematoxilina e Eosina foi empregada para a avaliação da arquitetura tecidual, permitindo a observação da epiderme, derme papilar e reticular, bem como da presença e distribuição de fibroblastos, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. A coloração de Tricrômico de Masson foi utilizada para a identificação e caracterização das fibras colágenas, possibilitando distinguir colágeno maduro de fibras em remodelamento, além de permitir a análise da densidade e organização da matriz extracelular. As lâminas histológicas foram escaneadas, utilizando o scanner Pannoramic 250 (3DHistech, Budapeste, Hungria), sob ampliação de 40x. Para análise, foi utilizado o software SlideViewer (3DHistotech, Budapeste, Hungria), o qual permitiu a avaliação morfológica de alta resolução e a montagem dos painéis ilustrativos empregados na documentação dos achados histológicos.

3.5.1. Escore Histológico Semiquantitativo

Foi empregado um escore histológico semiquantitativo, adaptado do *Keloid–Hypertrophic Scar (KHS) Score*, originalmente descrito por Lee et al., 2004, para a distinção entre cicatrizes queloidianas e hipertróficas [143]. No presente estudo, essa adaptação foi denominada *Keloid Histologic Scar (KHS) Score*. A análise foi conduzida por dois observadores independentes, sem conhecimento prévio dos casos, assegurando a reprodutibilidade e a imparcialidade na interpretação dos resultados. A avaliação histológica considerou parâmetros morfológicos relacionados à arquitetura epidérmica e dérmica, incluindo: (i) espessura epidérmica, relação derme/epiderme e a integridade da junção dermoepidérmica; (ii) organização, orientação e densidade das fibras colágenas, bem como o grau de fibrilação e a presença de hialinização; (iii) celularidade, com ênfase na presença de fibroblastos e miofibroblastos; (iv) padrão de vascularização e indícios de angiogênese; (v) intensidade e distribuição do infiltrado inflamatório.

Com base nesses parâmetros, cada amostra foi classificada em três graus de comprometimento dérmico:

- **Grau 1:** características compatíveis com pele normal, sem alterações estruturais significativas;
- **Grau 2:** desorganização moderada da matriz colágena, associada a discreto aumento da celularidade;
- **Grau 3:** acometimento máximo, caracterizado por espessamento acentuado da derme reticular, presença de nódulos de colágeno e hialinização intensa.

Para facilitar a compreensão e garantir a padronização da avaliação, foram incluídas imagens representativas dos diferentes graus do KHS Score. Essas imagens ilustram a progressão das alterações estruturais observadas, incluindo variações na organização e densidade das fibras colágenas, no grau de celularidade, na presença de hialinização, bem como nas alterações epidérmicas, padrão de vascularização e intensidade do infiltrado inflamatório. As imagens utilizadas auxiliaram na orientação da classificação semiquantitativa aplicada aos cortes histológicos deste estudo (Figuras 12A e 12B). Ainda, a aplicação do KHS Score possibilitou correlacionar os achados histológicos, os

perfis de expressão dos biomarcadores moleculares e as características clínicas dos pacientes, favorecendo uma abordagem integrada entre histologia e biologia molecular.

Figura 12A - Representação histológica dos critérios morfológicos utilizados para a atribuição dos escores de epiderme, vascularização e inflamação na pele. Cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). **Epiderme:** grau 1 – epiderme fina e regular (setas); Grau 2 – discreta acantose e irregularidade da camada espinhosa (*); Grau 3 – acantose acentuada e desorganização epidérmica (#). **Vascularização:** grau 1 – número reduzido de vasos na derme (cabeça de seta); Grau 2 – discreto aumento da vascularização (setas duplas); Grau 3 – aumento evidente de vasos e congestão vascular (seta cheia). **Inflamação:** grau 1 – infiltrado inflamatório leve e focal; Grau 2 – infiltrado moderado, difuso; Grau 3 – infiltrado inflamatório intenso e denso, com formação de agregados celulares (estrela). Escalas: 100 µm (epiderme e vascularização) e 50 µm (inflamação).

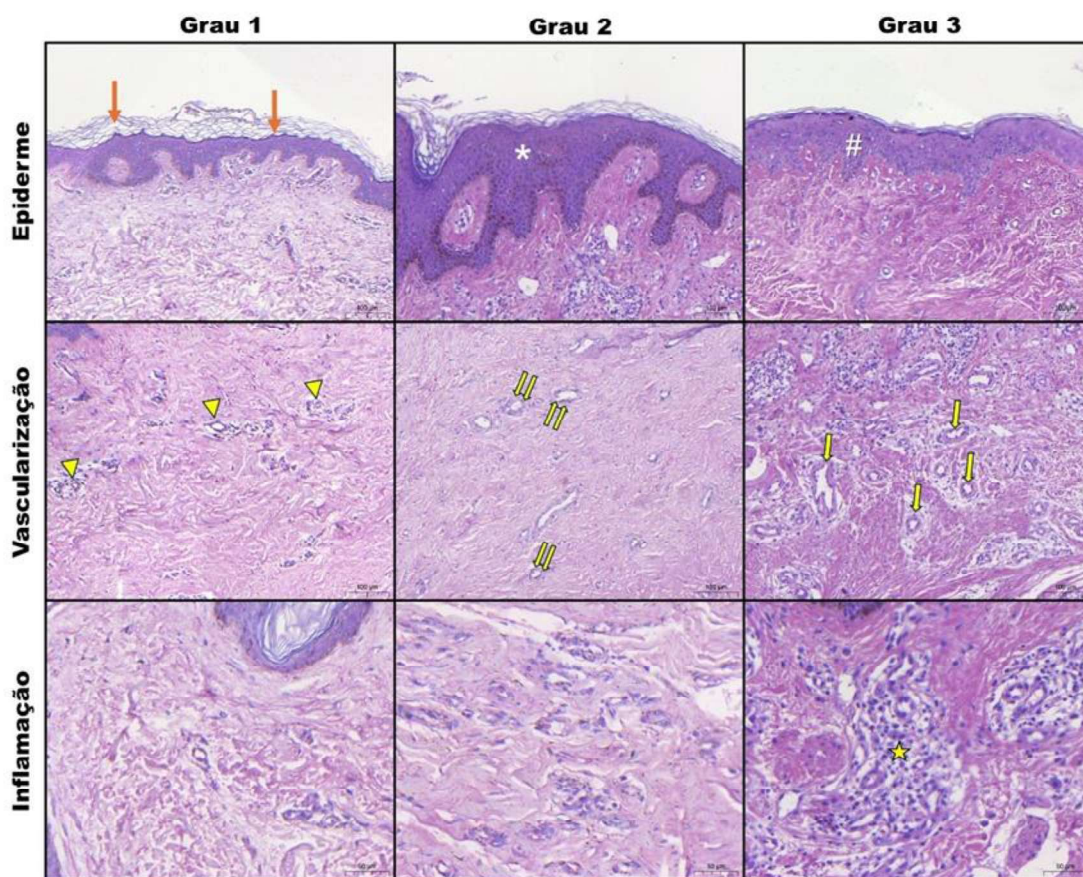
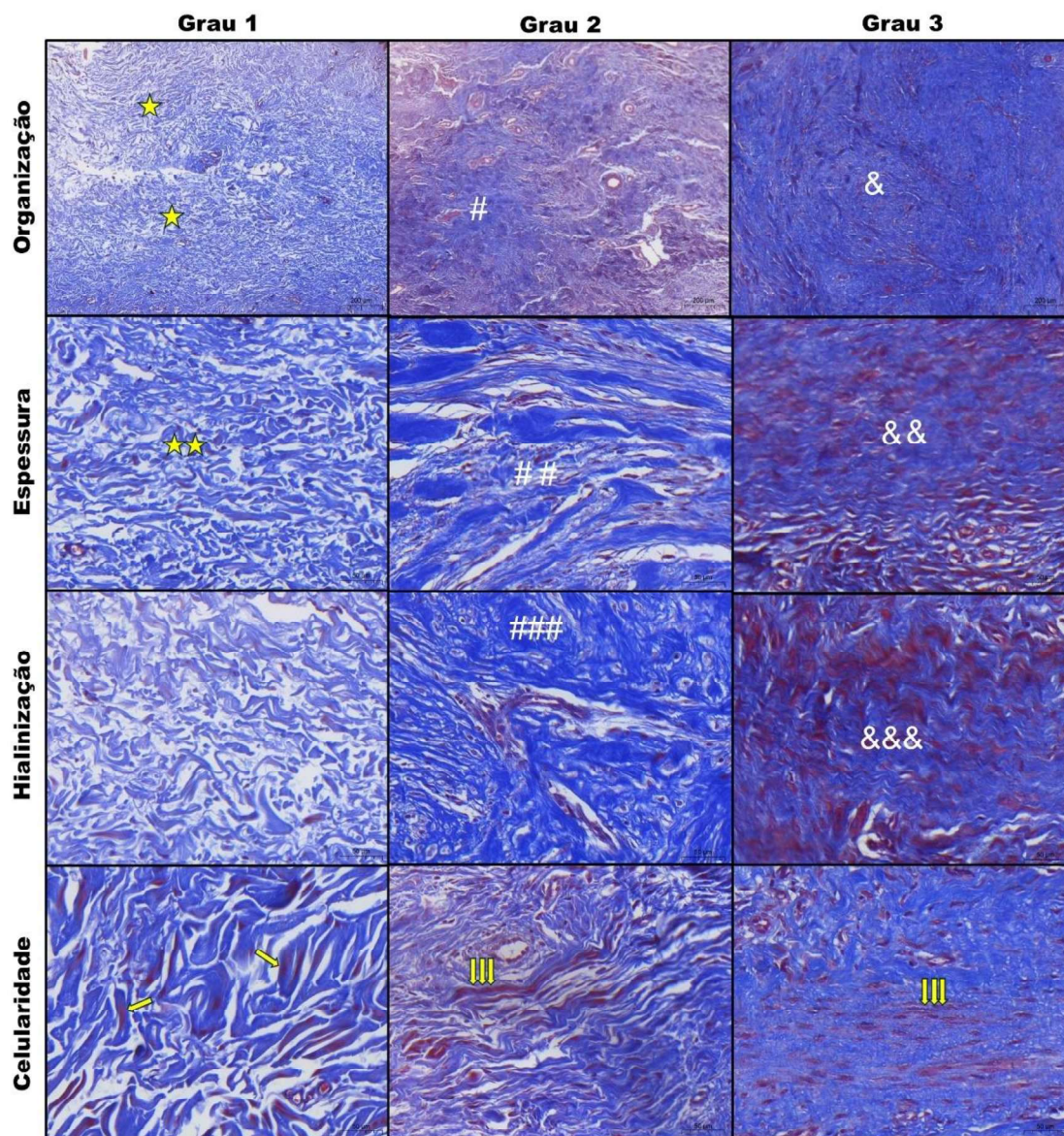


Figura 12B - Representação histológica dos critérios morfológicos utilizados para a atribuição dos escores de organização, espessura, hialinização e celularidade da derme em cortes corados com Tricrômico de Masson. Organização: grau 1 – fibras colágenas frouxas e bem organizadas (*); grau 2 – leve desorganização e compactação parcial das fibras (#); Grau 3 – intensa desorganização e deposição compacta de colágeno (&). **Espessura:** Grau 1 – derme delgada e com feixes colágenos finos (**); Grau 2 – aumento moderado da espessura dérmica (##); Grau 3 – espessamento acentuado com feixes colágenos densos (&&). **Hialinização:** grau 1 – ausência de hialinização (***); Grau 2 – áreas focais de hialinização (###); Grau 3 – extensa hialinização da matriz colágena (&&&). Escalas: 50 µm.



3.6. Imunomarcacão para Colágeno

3.6.1. Imunofluorescência para Colágeno tipos I, III e V

Para imunomarcacão do colágeno, os cortes histológicos foram aderidos em lâminas, previamente tratadas com *3-aminopropiltrietoxo Silano* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A reação foi iniciada pela desparafinização dos cortes, por meio da imersão das lâminas em xilol aquecido a 60°C, por 30 minutos, seguida de dois banhos de 10 minutos em xilol, à temperatura ambiente. A reidratação dos cortes foi realizada por sucessivas lavagens em álcool etílico em concentrações decrescentes (100%-75%), seguida de lavagem com água corrente por 10 minutos, água destilada e PBS por 15 minutos. Para a exposiçāo e recuperaçāo de sítios antigênicos, os cortes foram submetidos à digestão enzimática com pepsina gástrica de porco (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 8mg/mL, diluída em ácido acético 0,5N, pH 2,2 por 30 minutos, a 37°C, método escolhido por sua eficiência na preservação da integridade estrutural das fibras colágenas. Após a recuperaçāo antigênica, os cortes foram submetidos a um ciclo de três lavagens com PBS, por 10 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos, os cortes foram incubados com BSA 5% diluído em PBS, durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados, por uma noite, a 4°C, com anticorpos primários específicos para colágeno dos tipos I, III e V (conforme **Tabela 1**), diluídos em PBS. Após esse período, os cortes foram submetidos a um ciclo de lavagens com PBS Tween20 0,05%, por três vezes de 10 minutos, e incubados por 60 minutos, à temperatura ambiente, com o anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (*Alexa Fluor 488*, Invitrogen, Life Technology), diluído 1:200 em azul de Evans 0,006%. Os cortes foram novamente lavados com PBS Tween20 0,05%, e as lâminas montadas com glicerina em PBS (v/v), para a análise no microscópio de fluorescência *Olympus BX51* (Olympus Co, Tokyo, Japan). A utilizaçāo deste protocolo garantiu alta especificidade e preservação morfológica das fibras colágenas, permitindo análises qualitativas e semiquantitativas confiáveis.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nos estudos de imunofluorescência

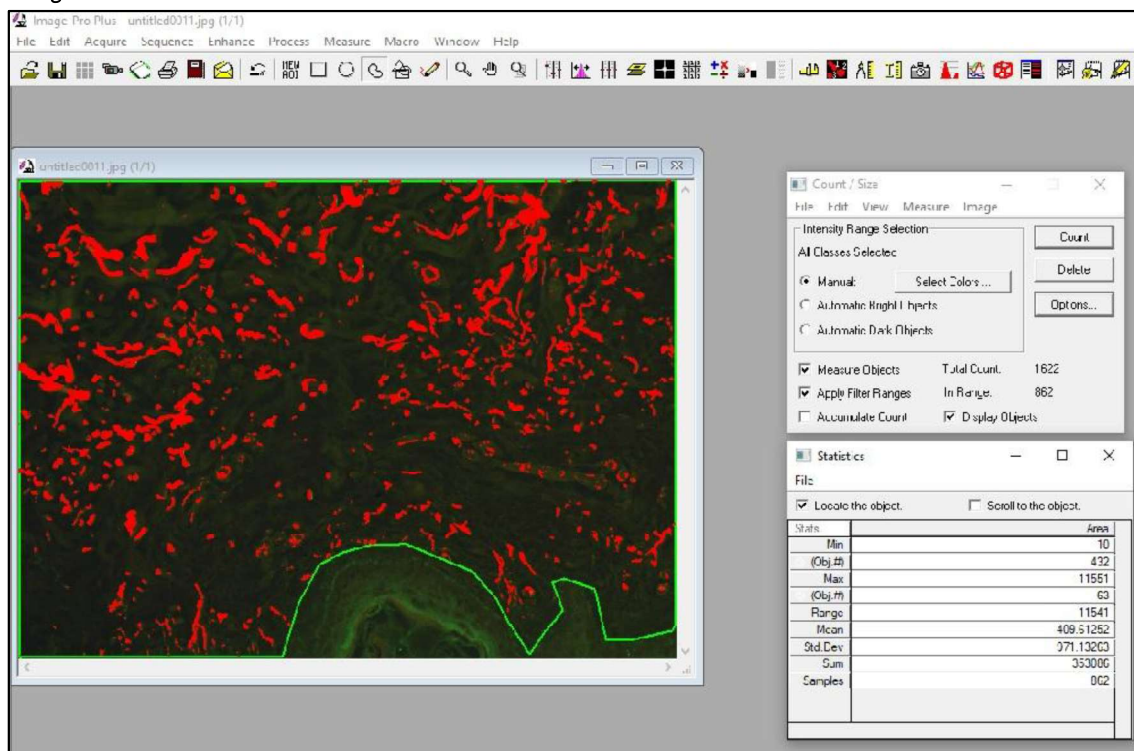
Anticorpo Primário	Especificação	Diluição
Col I	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno I (600-401-103-0.5) (Rockland, Limerick, PA, USA)	1:1000
Col III	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno III (600-401-105-0.5) (Rockland, Limerick, PA, USA)	1:200
Col V	Anticorpo policlonal de coelho anti-colágeno V (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA)	1:7000

3.6.2. Aquisição e Análise das Imagens de Imunofluorescência

As lâminas imunomarcadas com os tipos de colágeno foram analisadas em microscópio de fluorescência (*Olympus BX-51*) e quantificadas por um sistema de análise de imagem. O sistema que foi utilizado consiste em uma câmera Olympus DP75, acoplada a um microscópio Olympus, e as imagens foram processadas pelo *software CellSens* (Olympus Co.). As amostras foram analisadas sem conhecimento prévio dos casos, sendo selecionados 10 campos não-coincidentes, num aumento de 400x, distinguindo-se a derme papilar da derme reticular ($\approx 300 \mu\text{m}$ da junção dermoepidérmica, em concordância com a literatura, que descreve a espessura do estrato dérmico papilar como sendo de 300–400 μm , em humanos, dependendo da idade e da região anatômica (Ganier et al., 2022)). A área total do tecido analisado em cada campo foi medida pelo *software Image-Pro Plus 6.0* (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA), através da seleção da tonalidade verde fluorescente. A área imunomarcada foi dividida pela área total de tecido analisado e o resultado expresso em porcentagem (**Figura 13**), permitindo comparações entre grupos estudados e a correlação com o escore histológico semiquantitativo. Este procedimento assegurou uma

avaliação precisa e padronizada da distribuição e abundância relativa do colágeno dos tipos I, III e V, integrando informações morfológicas e moleculares das cicatrizes estudadas.

Figura 13 - Quantificação das fibras de colágeno pela imunofluorescência. Seleção da tonalidade verde fluorescente, utilizando os recursos de densidade colorimétrica do software *Image-Pro Plus 6.0*.



3.7. Expressão Gênica

3.7.1. Extração de RNA total

Após a coleta, cerca de 30mg do tecido queloidiano e dos controles foram imediatamente imersos em nitrogênio líquido, em tubos de criopreservação. Em seguida, as amostras foram armazenadas em um freezer a -70°C até os procedimentos de análise. Para a extração de RNA total incluindo os microRNAs foi utilizado o kit mirVana™ miRNA Isolation (AM 1560- Life Technologies - Thermofisher Scientific, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Os tecidos queloidiano e dos controles foram pulverizados, ainda congelados, para a devida fragmentação. Após esta etapa, cada tecido

pulverizado foi colocado em um tubo estéril contendo 300 µL da solução de lise e homogeneizado nesta solução por agitador. Em seguida, foi acrescentado 30 µL do aditivo que potencializa os miRs, correspondendo a 10% do tecido lisado e, após adição, a mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado ao lisado, o volume de 300 µL da solução fenol-clorofórmio, homogeneizado por 60 segundos e centrifugado por 20 minutos a 10.000x g, em temperatura ambiente, para separação das fases orgânica e aquosa. Após a centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA total, incluindo os microRNAs, foi removida, cuidadosamente, para um novo tubo estéril, e acrescentado 375 µL (1,25x volume inicial do lisado) do etanol PA e, após, a mistura do lisado foi transferida para a coluna de purificação e centrifugado por 15 segundos a 10.000x g, em temperatura ambiente. Decorrida a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, seguindo com as etapas de sucessivas lavagens, adicionando 700 µL da solução de lavagem 1 (*Wash Solution 1*) e centrifugação por 15 segundos a 10.000x g. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e acrescentado 500 µL da solução de lavagem 2/3, seguida de centrifugação por 15 segundos a 10.000x g, descartando o sobrenadante; decorrida a última lavagem, a coluna foi centrifugada novamente, para remover o resíduo do etanol.

Finalizada a etapa anterior, a coluna de purificação foi inserida em um novo tubo estéril e eluída com 60 µL de solução eluente, que foi aquecida a 95°C. As amostras de RNA total, incluindo os miRs, foram armazenadas em freezer - 70°C, até o momento do uso.

3.7.2. Avaliação da concentração e grau de pureza das amostras

Em relação à avaliação da qualidade e pureza do RNA total, incluindo os miRs, as amostras foram avaliadas em Nanodrop ND 2000 (Thermofisher Scientific) e foram obtidos os valores de R260/280= (1,8-2,0) e R260/230= (1,7-2,0).

3.7.3. Reação de transcrição reversa – microRNAs (RT)

O RNA total de cada amostra foi submetido à Transcrição Reversa, de acordo com o Protocolo do fabricante (Thermofisher- Applied Biosystems, CA, EUA) TaqMan® MicroRNA Assays Protocol, (conforme **Tabela 2**):

Tabela 2 - Componentes utilizados na reação de transcrição reversa e seus respectivos volumes.

Componentes	Mix (volume/ μL)
100mM dNTPs	0.15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/ μL)	1.00
10X Reverse Transcription Buffer	1.50
RNase Inhibitor (20U/ μL)	0.19
Nuclease-free water	4.16
Total	7.00

A reação de RT para cada amostra foi processada com volume final de 15 μL , consistindo em 7 μL do MIX, 3 μL de primer de cada ensaio específico e 5 μL da amostra de RNA. Esta reação foi processada em tubos de 0,2mL estéreis, tendo sido incubados no gelo por 5 minutos e, em seguida, seguiu-se com o protocolo de ciclagem no Termociclador Veriti (Thermofisher- Applied Biosystems- CA, EUA), conforme descrito na **Tabela 3**:

Tabela 3 - Protocolo de ciclagem das amostras de MIX, primer e RNA para a reação de RT.

Estágio	Temperatura	Tempo
40 ciclos	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 seg
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

3.7.4. Reação PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A reação PCR foi realizada com objetivo de detectar e quantificar os microRNAs das amostras. Os ensaios (alvos /endógeno) avaliados no estudo, se encontram na **Tabela 4** abaixo:

Tabela 4 - Ensaios (alvos /endógenos) do estudo.

miRNA	Assay ID	
hsa-miR-21-5p	000397	4427975
hsa- miR-199a-3p	002304	4427975
U6SnRNA	001973	4427975

Esta reação foi realizada com concentração final de 10ng e volume final de 20 µL, consistindo dos seguintes componentes, listados na **Tabela 5**:

Tabela 5 - Componentes utilizados para a reação da PCR e seus respectivos volumes.

Componentes	Volume (µL)
TaqMan MicroRNA Assay (20X)	1.0
Produto RT (cDNA) diluído 1/20	1.5
TaqMan 2X MMIX Universal	10
Água livre de Nucleases	7.5
Volume Total	20

Ainda, a reação RT-qPCR foi processada em Termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem – Thermofisher Scientific – CA, EUA), com 40 ciclos de reação (conforme a **Tabela 6**):

Tabela 6 - Protocolo de processamento da reação RT-qPCR.

Estágio	Hold	Denaturação	Anelamento/Extensão
Tempo	10 min	15 seg	60 seg
Temperatura (°C)	95	95	60

3.7.5. Metodologia RT (Transcrição Reversa) – mRNA (cDNA)

O RNA total de cada amostra foi submetido à transcrição reversa para a síntese de cDNA (ácido desoxirribonucleico complementar). A partir de 2µg de RNA total, as amostras foram reversamente transcritas em cDNA, em termociclador, utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City - CA, EUA), otimizado para a síntese de cDNA de primeira fita, a partir de RNA total; para esta reação utilizou-se os componentes presentes na tabela abaixo (**Tabela 7**):

Tabela 7 - Componentes utilizados na reação de transcrição reversa e seus respectivos volumes.

Componentes	Mix (volume/ µL)
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP (100mM)	0,8
10X RT Random Primer	2,0
Multiscribe RT	1,0
Água livre de Nucleases	4,2
Total	10,0
Volume RNA	10,0
Volume final	20,0

Após a Reação de Transcrição Reversa, o cDNA obtido foi armazenado em freezer a - 20 °C, até o momento do uso para a Reação de PCR em Tempo Real (RT-qPCR).

3.7.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para a reação em cadeia da polimerase em tempo real por transcriptase reversa (RT-qPCR), foram selecionados os seguintes genes de interesse: *COL1A1* (cadeia $\alpha 1$ do Col I), *COL3A1* (cadeia $\alpha 1$ do Col III), *COL5A1* (cadeia $\alpha 1$ do Col V) e *COL5A2* (cadeia $\alpha 2$ do Col V). As sequências dos genes foram adquiridas no site www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide (**Tabela 8**). As expressões dos genes foram avaliadas por RT-qPCR, executadas em placas de 96 poços, utilizando-se o *StepOnePlus* (Applied Biosystems) e o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen Life Technologies Co.) (**Tabela 9**).

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os reagentes, exceto a amostra). A expressão diferencial dos transcritos alvos foi determinada através do método de quantificação relativa, em relação a um gene de referência utilizado como controle endógeno. Para esse fim, foi testado *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). As reações de RT-qPCR foram padronizadas para encontrar a melhor temperatura de anelamento para cada gene em estudo, permitindo a identificação de um único pico de fluorescência para cada gene das amostras analisadas.

Tabela 8 - Relação das sequências de oligonucleotídeos estudados, por RT-qPCR

Gene	Sequência	Sentido
<i>GAPDH</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	SENSE 3'– 5'
	GCCAATACGACCAAATCC	ANTISENSE 5'– 3'
<i>COL1A1</i>	TGGGATGGAGGGAGTTTACA	SENSE 3'– 5'
	AACACGCGCTTCACCTACAG	ANTISENSE 5'– 3'
<i>COL3A1</i>	GATGGGGTCAAATGAAGGTG	SENSE 3'– 5'
	TGATCAGGACCACCAATGTC	ANTISENSE 5'– 3'
<i>COL5A1</i>	GTGGCACAGAATTGCTCTCA	SENSE 3'– 5'
	TCACCCTCAAACAACCTCCTC	ANTISENSE 5'– 3'
<i>COL5A2</i>	TTGATGGTGGTGCTCATTGT	SENSE 3'– 5'
	GGAAATGTGGGCAAGACTGT	ANTISENSE 5'– 3'

Tabela 9 - Componentes utilizados para a reação qRT-PCR e seus respectivos volumes

Componentes	Mix (volume / μL)
SYBR Green (qPCR- SuperMix)	10,0
ROX	0,2
Água livre de Nucleases	6,8
Primer S 10pMol	1,0
Primer R 10pMol	1,0
cDNA	1,0
Volume final da reação	20,0

A expressão diferencial dos genes de interesse foi determinada utilizando o método de cálculo do Delta Ct (ΔCt), que corresponde ao número de Ct (*Cycle Threshold*) do gene de interesse normalizado pelo Ct do gene de controle endógeno *Gapdh*, através da fórmula matemática: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct gene de interesse} - \text{Ct gene referência}$. O valor de Ct corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente da reação cruze o limiar (*threshold*) acima do ruído de fundo (*background*), ou seja, a expressão do gene só é detectada quando o sinal fluorescente acumulado ultrapassa o *threshold*. Seguindo esse raciocínio, quanto menor o Ct, menor o número de ciclos de PCR necessários para detectar um gene e, portanto, maior sua expressão. Os valores de Ct para as amostras foram obtidos pela análise dos resultados dados pelo *StepOne Software* versão 2.1 (Applied Biosystems.). A expressão relativa, usada para as análises estatísticas, foi calculada por $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, onde:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT da amostra} - \Delta\text{CT médio das amostras do grupo controle.}$$

3.8. Análise estatística

Os dados foram processados no SPSS 18 e RStudio 2025.09.02. Estatísticas descritivas foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão ou

mediana e intervalo interquartil (IQR), conforme distribuição. Foram aplicados testes de verificação de normalidade para todas as variáveis quantitativas, para definição dos testes estatísticos que seriam utilizados. As variáveis foram identificadas como não paramétricas, aplicando-se então teste de *Mann–Whitney* ou *Kruskal–Wallis*, com correção de *Bonferroni*; a magnitude da diferença foi expressa pelo tamanho do efeito (r ; onde $r = z/\sqrt{N}$), e sua interpretação seguiu os parâmetros estabelecidos por Cohen., 1988 [144]: efeito pequeno ($|r| < 0.30$), efeito moderado ($0.3 \leq |r| < 0.50$) e efeito grande ($|r| \geq 0.50$). Associações categóricas foram analisadas pelo *Qui-quadrado de Pearson* e correlações contínuas pela *Correlação de Spearman*. Foram consideradas como correlações fracas, aquelas cujo $|\rho| < 0,3$; moderadas, aquelas com $0,3 \leq |\rho| < 0,6$; fortes, as com $0,6 \leq |\rho| < 0,8$; muito fortes, as com $0,8 \leq |\rho| < 0,99$; e perfeitas, aquelas que apresentam $|\rho| = 1,0$. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. Os gráficos foram construídos no *RStudio* utilizando o pacote *ggplot2*.

4. RESULTADOS

4.1. Características clínicas e demográficas dos pacientes

A **Tabela 10** apresenta as principais características clínicas da casuística incluída neste estudo.

A amostra foi composta por 26 indivíduos, com média de idade de 32 anos (intervalo: 15–57 anos). A maioria dos participantes era do sexo feminino (69,2%), enquanto 30,8% eram do sexo masculino.

Em relação à distribuição étnico-racial, observou-se predomínio de pacientes autodeclarados pardos ou pretos (70,0%), embora apenas um paciente tenha se identificado como preto. A média de tempo de existência das lesões queloidianas foi de 6,3 anos (intervalo: 1-29 anos), sendo que mais da metade dos pacientes incluídos no estudo apresentaram lesões com até 5 anos de duração.

O grupo de estudo foi constituído por 20 pacientes com diagnóstico clínico e histológico de quelóide (76,9%) e 6 indivíduos com pele normal, utilizados como grupo controle (23,1%).

Tabela 10 - Características clínicas dos pacientes incluídos no estudo (n = 26)

Características	Frequência (N/%)
Idade (média e intervalo)	32 (15–57)
≤ 32 anos	14 (53,8%)
> 32 anos	12 (46,2%)
Gênero	
Masculino	8 (30,8%)
Feminino	18 (69,2%)
Etnia/Raça*	
Branco	6 (30,0%)
Pardo/Preto	14 (70,0%)
Tempo da lesão	
≤ 5 anos	13 (50,0%)
> 5 anos	7 (26,9%)
Não se aplica (controle)	6 (23,1%)
Grupo	
Pacientes com quelóide	20 (76,9%)
Pacientes controle	6 (23,1%)

*Dados omissos: Etnia/Raça (6).

4.2. Análise histológica das amostras de quelóide

A análise histológica revelou alterações morfológicas marcantes na pele com quelóide quando comparada à pele normal (**Figura 14A**). As amostras queloidianas apresentaram espessamento acentuado da derme (**Figuras 14B e 14C**), com substituição parcial da arquitetura dérmica normal por feixes de fibras de colágeno espessas, hialinizados e dispostos de forma irregular. Esses feixes de colágeno, frequentemente orientados em múltiplas direções, formavam áreas densamente compactadas, com redução dos espaços intersticiais e rarefação de fibras (**Figuras 14E e 14F**).

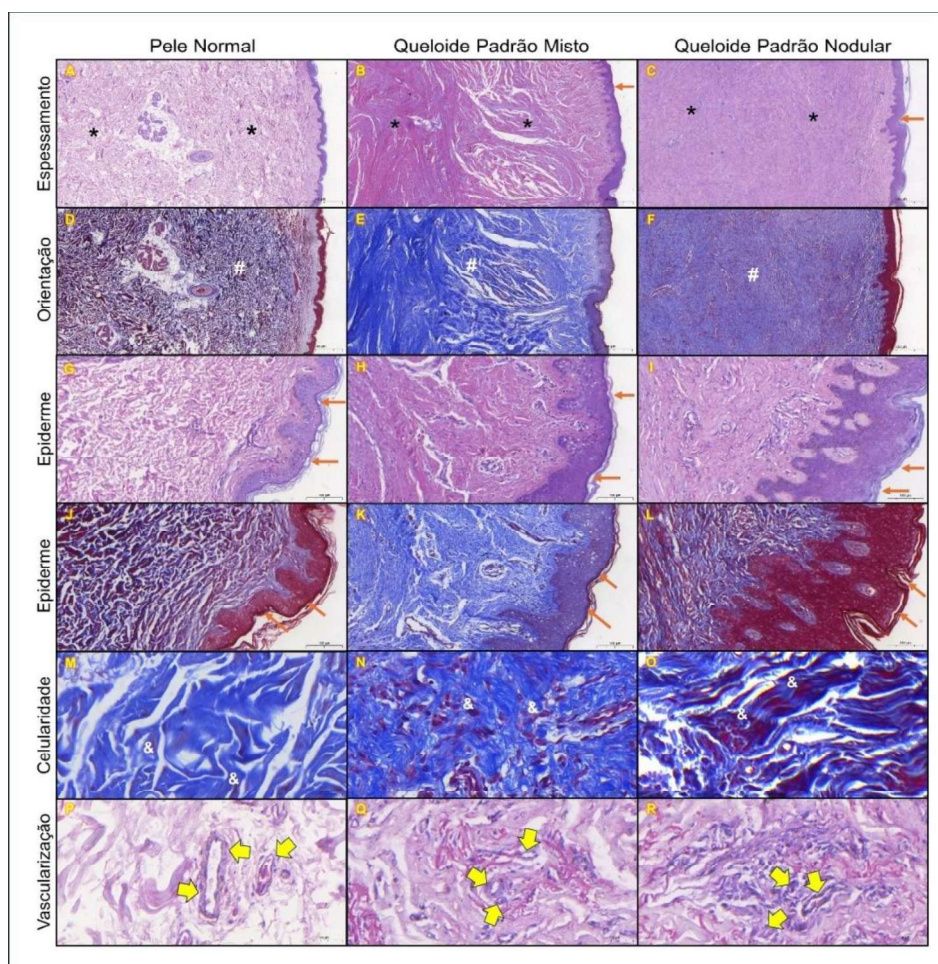
Nos casos classificados pelo que aqui denominamos como padrão misto, observou-se alternância entre regiões de colágeno denso e áreas menos compactas, nas quais ainda era possível identificar fibroblastos fusiformes e discreta vascularização (**Figuras 14E**). Já as lesões com padrão nodular exibiram grandes agregados concêntricos de fibras colágenas hialinizadas, delimitados por zonas de transição com maior celularidade e vasos de pequeno calibre, característico de um remodelamento tecidual ativo (**Figura 14F**).

A epiderme sobrejacente aos queloides manteve-se, em geral, preservada, embora em alguns casos tenha sido notado discreta acantose e aumento do número de melanócitos basais. Na junção dermoepidérmica, havia leve irregularidade e, ocasionalmente, projeções dérmicas alongadas (**Figura 14H, 14I, 14K, 14L**).

A densidade celular dérmica variou conforme o grau de organização das fibras de colágeno: nos padrões lineares (predominantemente em pele normal), observou-se número regular de células mesenquimais e arquitetura fibrilar paralela (**Figura 14M**); já nos padrões misto e nodular, houve predomínio de células mesenquimais (**Figuras 14N, 14O**) distribuídas entre os feixes de colágeno, acompanhados de discreta infiltração inflamatória mononuclear perivascular (**Figuras 14N, 14O**).

De modo geral, as lesões queloidianas apresentaram aumento da espessura dérmica, colágeno hialinizado e desorganização fibrilar, compatíveis com o processo de fibrose exacerbada característico da doença.

Figura 14 - Análise histológica das amostras de pele com quelóide e pele normal. (A, D, G, J, M, P): Pele normal; **(B-C)** Espessamento acentuado da derme com substituição parcial da arquitetura normal por feixes colágenos espessos, hialinizados e dispostos de forma irregular (*); **(E)** Padrão misto caracterizado por alternância entre regiões de colágeno denso e áreas menos compactas, preservando células mesenquimais fusiformes e discreta vascularização (#); **(F)** Padrão nodular exibindo agregados concêntricos de fibras colágenas hialinizadas, delimitados por zonas de transição com maior celularidade e vasos de pequeno calibre (#); **(H, I, K, L)** Epiderme preservada, com discreta acantose e aumento focal de melanócitos basais; leve irregularidade na junção dermoepidérmica e projeções dérmicas alongadas (setas); **(M-O)** Variação da densidade celular conforme o padrão colágeno: organização fibrilar paralela e número regular de células mesenquimais em pele normal (&), contrastando com predomínio celular (&) e discreta inflamação mononuclear perivascular nos padrões misto e nodular **(Q-R, setas)**; Coloração: hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson. Barras de escala: 500 µm, 100 µm e 50 µm.



4.2.1. Escores histológicos

Durante as análises morfológicas, foi aplicado um escore composto para avaliar sete parâmetros histológicos principais: organização das fibras colágenas, espessura das fibras, grau de hialinização da matriz dérmica, grau de celularidade de fibroblastos e miofibroblastos, grau de vascularização, infiltrado inflamatório e grau de alterações epidérmicas.

Os escores atribuídos a cada um desses parâmetros foram somados e os valores totais foram expressos segundo o que denominamos *Keloid Histologic Scar* (KHS) Score. Nosso KHS variou de 7 a 21, com média de $13,35 \pm 4,8$ e mediana de 15,5 (intervalo interquartil 7-17), indicando atividade histológica moderada a acentuada na maioria das amostras. Na **Tabela 11** encontram-se os resultados histológicos dos parâmetros que compõem o KHS.

Tabela 11 - Distribuição dos escores individuais do KHS

Parâmetro	Média $\pm$ DP	Mediana (IQR)	Min - Max	% casos com escore ≥ 2
Organização das fibras colágenas	$2,00 \pm 0,80$	2 (1-3)	1-3	69,3%
Densidade do colágeno	$1,88 \pm 0,86$	2 (1-3)	1-3	57,7%
Hialinização do colágeno	$1,85 \pm 0,83$	2 (1-3)	1-3	57,7%
Celularidade	$1,96 \pm 0,82$	2 (1-3)	1-3	65,4%
Vascularização	$2,17 \pm 0,87$	2 (1-3)	1-3	70,8%
Infiltrado inflamatório	$1,96 \pm 0,86$	2 (1-3)	1-3	62,5%
Alterações epidérmicas	$2,09 \pm 0,79$	2 (1-3)	1-3	73,9%

Entre os parâmetros individuais, observaram-se maiores escores para vascularização ($2,17 \pm 0,87$), com presença de capilares de paredes finas distribuídos entre as áreas de fibrose, além de alterações epidérmicas ($2,09 \pm 0,79$), incluindo hiperplasia epidérmica discreta, aplanamento das cristas interpapilares e redução ou ausência de anexos cutâneos nas áreas de fibrose densa. Tais achados indicam um processo de remodelamento tecidual característico das lesões queloidianas, marcado por intensa deposição de matriz extracelular e reorganização vascular e epidérmica associadas à fibrose dérmica.

Ademais, observou-se moderada densidade ($1,88 \pm 0,86$) e hialinização de fibras colágenas ($1,85 \pm 0,8$), refletindo o predomínio de feixes de colágeno compactos eosinofílicos e com perda da orientação fibrilar. A organização das fibras colágenas, também apresentou alteração significativa ($2,00 \pm 0,80$). Observou-se uma disposição irregular, caracterizada pela formação de redemoinhos ou de feixes entrecruzados, que ocupavam extensas áreas da derme reticular.

A celularidade mesenquimal encontrava-se aumentada na maioria das amostras ($1,96 \pm 0,82$), caracterizada por células fusiformes de núcleo alongado corados em vermelho pela coloração de Tricrômico de Masson. Ainda, foi identificada a presença de infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear, distribuído principalmente nas regiões perivasculares e na periferia da lesão, apresentando intensidade média de $1,96 \pm 0,86$. A análise dos parâmetros individuais demonstrou que as maiores proporções de casos com escore ≥ 2 ocorreram para alterações epidérmicas (73,9%), vascularização (70,8%) e desorganização fibrilar (69,3%).

4.2.1.1. Escores histológicos e características clínicas

A partir dos escores histológicos, buscou-se investigar possíveis associações entre as alterações estruturais observadas e as características clínicas dos pacientes, bem como com os marcadores moleculares estudados nas etapas subsequentes.

4.2.1.1.1. Organização das fibras colágenas

A **Tabela 12** apresenta a distribuição dos escores de organização das fibras colágenas de acordo com as variáveis clínicas avaliadas. Esse escore reflete o grau de orientação das fibras colágenas na derme.

A análise mostrou que não houve associação significativa entre o escore de organização e as variáveis idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão. Por outro lado, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo quelóide e o grupo controle ($p < 0,001$). Enquanto as amostras de

pele normal apresentaram predominantemente fibras colágenas finas e bem orientadas (padrão linear), as amostras de quelóide exibiram maior frequência de padrões misto (38,5%) e nodular (30,8%), indicando acentuada desorganização fibrilar e hialinização dérmica nas lesões fibrosas.

Esses achados confirmam que o escore de organização das fibras de colágeno é um marcador morfológico sensível para distinguir o tecido queloidiano da pele normal, refletindo o processo de remodelamento exacerbado característico desta condição.

Tabela 12 - Distribuição do escore de organização das fibras colágenas segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; n = 26)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	p
Idade				0,88
≤ 32 anos	4 (15,4%)	6 (23,1%)	4 (15,4%)	
> 32 anos	4 (15,4%)	4 (15,4%)	4 (15,4%)	
Gênero				0,72
Masculino	2 (7,7%)	4 (15,4%)	2 (7,7%)	
Feminino	6 (23,1%)	6 (23,1%)	6 (23,1%)	
Etnia/Raça				0,36
Branco	1 (5,0%)	4 (20,0%)	1 (5,0%)	
Pardo/Preto	1 (5,0%)	6 (30,0%)	7 (35,0%)	
Tempo de quelóide*				0,30
≤ 5 anos	2 (10,0%)	5 (25,0%)	6 (30,0%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	5 (25,0%)	2 (10,0%)	
Grupo				< 0,001
Pacientes com quelóide	2 (7,7%)	10 (38,5%)	8 (30,8%)	
Pacientes controle	6 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

* Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa (n = 20). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.2. Espessura das fibras colágenas

A **Tabela 13** apresenta os resultados da análise do escore de espessura das fibras colágenas, correlacionado com as características clínicas dos participantes. Esse escore reflete o grau de espessamento e compactação das fibras colágenas na derme, parâmetro diretamente relacionado ao processo de fibrogênese e à maturação da matriz extracelular. Na estratificação por variáveis

clínicas, não identificamos associações estatisticamente significativas entre a espessura das fibras e a idade, o gênero ou a etnia/raça.

Ao comparar os grupos, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre pacientes com quelóide e controles ($p = 0,005$). O grupo controle apresentou predomínio de fibras finas (23,1%), enquanto as amostras de quelóide exibiram padrões misto (26,9%) e grosso (30,8%), refletindo aumento progressivo da espessura e compactação das fibras colágenas nas lesões fibrosas.

Tabela 13 - Distribuição do escore de espessura das fibras colágenas segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; $n = 26$)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	<i>p</i>
Idade				0,13
≤ 32 anos	5 (19,2%)	6 (23,1%)	3 (11,5%)	
> 32 anos	6 (23,1%)	1 (3,8%)	5 (19,2%)	
Gênero				0,48
Masculino	2 (7,7%)	3 (11,5%)	3 (11,5%)	
Feminino	9 (34,6%)	4 (15,4%)	5 (19,2%)	
Etnia/Raça				0,84
Branco	1 (5,0%)	4 (20,0%)	1 (5,0%)	
Pardo/Preto	1 (5,0%)	6 (30,0%)	7 (35,0%)	
Tempo de quelóide*				0,06
≤ 5 anos	5 (25,0%)	5 (25,0%)	3 (15,0%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	2 (10,0%)	5 (25,0%)	
Grupo				0,005
Pacientes com quelóide	5 (19,2%)	7 (26,9%)	8 (30,8%)	
Pacientes controle	6 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

* Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa ($n = 20$). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.3. Hialinização do colágeno

A **Tabela 14** apresenta os resultados da análise do escore de hialinização do colágeno, correlacionado com as características clínicas dos pacientes e controles. Esse escore reflete o grau de deposição e compactação de matriz extracelular eosinofílica, compatível com o processo de hialinização dérmica, que representa uma fase avançada do remodelamento fibrótico.

Na análise com variáveis clínicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão. No entanto, verificou-se diferença significativa entre os grupos clínicos ($p = 0,005$); enquanto todas as amostras do grupo controle apresentaram padrão ausente/pouca hialinização (23,1%), os pacientes com quelóide exibiram predomínio dos escores moderado (30,8%) e denso (26,9%), reforçando o caráter progressivamente fibrosante dessas lesões.

Tabela 14 - Distribuição do escore de hialinização segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; $n = 26$)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	<i>p</i>
Idade				0,75
≤ 32 anos	6 (23,1%)	5 (19,2%)	3 (11,5%)	
> 32 anos	5 (19,2%)	3 (11,5%)	4 (15,4%)	
Gênero				0,33
Masculino	2 (7,7%)	4 (15,4%)	2 (7,7%)	
Feminino	9 (34,6%)	4 (15,4%)	5 (19,2%)	
Etnia/Raça				0,19
Branco	3 (15,0%)	1 (5,0%)	2 (10,0%)	
Pardo/Preto	2 (10,0%)	7 (35,0%)	5 (25,0%)	
Tempo de quelóide*				0,12
≤ 5 anos	5 (25,0%)	5 (25,0%)	3 (15,0%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	3 (15,0%)	4 (20,0%)	
Grupo				0,005
Pacientes com quelóide	5 (19,2%)	8 (30,8%)	7 (26,9%)	
Pacientes controle	6 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

*Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa ($n = 20$). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.4. Celularidade (células mesenquimais fusocelulares)

A **Tabela 15** apresenta os resultados da análise de células mesenquimais fusocelulares, correlacionados com as características clínicas dos pacientes e controles. Este escore reflete o grau de celularidade de fibroblastos e miofibroblastos que, em conjunto, indicam o nível de atividade e remodelação dessas cicatrizes, por meio da deposição de colágeno na matriz extracelular.

Valores mais elevados sugerem maior atividade celular com consequente deposição de colágeno, característica típica das lesões queloidianas.

Em nossa análise com variáveis clínicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão. Porém, observou-se diferença significativa entre os grupos clínicos ($p = 0,001$); enquanto todas as amostras do grupo controle apresentaram padrão de celularidade normal (23,1%), os pacientes com queiloide exibiram predomínio dos escores de aumento da celularidade de forma discreta/moderada (34,6%) e celularidade acentuada (30,8%), refletindo o caráter hipercelular característico dessas lesões, e sugerindo maior atividade de células mesenquimais fusocelulares associada à deposição exacerbada de colágeno.

Tabela 15 - Distribuição do escore de celularidade segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; $n = 26$)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	p
Idade				0,48
≤ 32 anos	5 (19,2%)	6 (23,1%)	3 (11,5%)	
> 32 anos	4 (15,4%)	3 (11,5%)	5 (19,2%)	
Gênero				0,78
Masculino	3 (11,5%)	2 (7,7%)	3 (11,5%)	
Feminino	6 (23,1%)	7 (26,9%)	5 (19,2%)	
Etnia/Raça				0,78
Branco	1 (5,0%)	2 (10,0%)	3 (15,0%)	
Pardo/Preto	2 (10,0%)	7 (35,0%)	5 (25,0%)	
Tempo de queiloide*				0,70
≤ 5 anos	2 (10,0%)	5 (25,0%)	6 (30,0%)	
> 5 anos	1 (5,0%)	4 (20,0%)	2 (10,0%)	
Grupo				0,001
Pacientes com queiloide	3 (11,5%)	9 (34,6%)	8 (30,8%)	
Pacientes controle	6 (23,1%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

*Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa ($n = 20$). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.5. Vascularização

A **Tabela 16** apresenta os resultados da análise do escore de vascularização, correlacionado com as características clínicas dos pacientes e controles. Esse escore reflete o grau de densidade e distribuição dos capilares na derme, indicando a atividade angiogênica associada ao processo de reparo e fibrose.

Em nossa análise das variáveis clínicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à idade, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão. Entretanto, verificou-se diferença significativa entre os gêneros ($p = 0,04$), sendo que os homens apresentaram maior frequência de vascularização discreta/moderada (16,7%) e abundante (16,7%), enquanto as mulheres exibiram, predominantemente, vascularização escassa (29,2%) e abundante (29,2%).

Ao comparar os grupos clínicos, também foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$). Todas as amostras do grupo controle apresentaram vascularização escassa (23,1%), enquanto os pacientes com quelóide exibiram predomínio de escores indicativos de aumento da vascularização, classificados como discreta/moderada (34,6%) e abundante (30,8%), refletindo o componente angiogênico associado à fibrogênese queloidiana.

Tabela 16 - Distribuição do escore de vascularização segundo características clínicas
(teste Qui-quadrado de Pearson; n = 26)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	p
Idade				0,69
≤ 32 anos	3 (12,5%)	4 (16,7%)	6 (25,0%)	
> 32 anos	4 (16,7%)	2 (8,3%)	5 (20,8%)	
Gênero				0,04
Masculino	0 (0,0%)	4 (16,7%)	4 (16,7%)	
Feminino	7 (29,2%)	2 (8,3%)	7 (29,2%)	
Etnia/Raça				0,76
Branco	0 (0,0%)	2 (11,1%)	4 (22,2%)	
Pardo/Preto	1 (5,6%)	4 (22,2%)	7 (38,9%)	
Tempo de queuloide*				0,63
≤ 5 anos	1 (5,6%)	4 (22,2%)	6 (33,3%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	2 (11,1%)	5 (27,8%)	
Grupo				<0,001
Pacientes com queuloide	1 (4,2%)	6 (25,0%)	11 (45,8%)	
Pacientes controle	6 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

*Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa (n = 20). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.6. Infiltrado inflamatório

A **Tabela 17** apresenta os resultados da análise do escore de infiltrado inflamatório, correlacionado com as características clínicas dos pacientes e controles. Esse escore reflete o grau de intensidade e a distribuição das células inflamatórias na derme, permitindo inferir o nível de atividade inflamatória associado ao processo de fibrogênese.

Na análise das variáveis clínicas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão. No entanto, observou-se diferença significativa entre os grupos clínicos ($p = 0,01$). Todas as amostras do grupo controle apresentaram infiltrado inflamatório ausente ou discreto (25,0%), enquanto os pacientes com queuloide exibiram predomínio de escores indicativos de aumento do infiltrado inflamatório, classificados como discreto/moderado (29,2%) e acentuado (33,3%).

Tabela 17 - Distribuição do escore de infiltrado inflamatório segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; n = 26)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	p
Idade				0,74
≤ 32 anos	4 (16,7%)	4 (16,7%)	5 (20,8%)	
> 32 anos	5 (20,8%)	3 (12,5%)	3 (12,5%)	
Gênero				0,19
Masculino	1 (4,2%)	3 (12,5%)	4 (16,7%)	
Feminino	8 (33,3%)	4 (16,7%)	4 (16,7%)	
Etnia/Raça				0,18
Branco	1 (5,6%)	4 (22,2%)	1 (5,6%)	
Pardo/Preto	2 (11,1%)	3 (16,7%)	7 (38,9%)	
Tempo de queuloide*				0,31
≤ 5 anos	3 (16,7%)	4 (22,2%)	4 (22,2%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	3 (16,7%)	4 (22,2%)	
Grupo				0,01
Pacientes com queuloide	3 (12,5%)	7 (29,2%)	8 (33,3%)	
Pacientes controle	6 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

*Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa (n = 20). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.2.1.1.7. Alterações epidérmicas

A **Tabela 18** apresenta os resultados da análise do escore de alterações epidérmicas, correlacionado com as características clínicas dos pacientes e controles. Esse escore reflete o grau de modificações estruturais na epiderme, incluindo hiperplasia, aplanamento das cristas interpapilares e alterações nos anexos cutâneos, aspectos frequentemente associados à tensão mecânica local e à presença de fibrose dérmica subjacente.

Todas as amostras do grupo controle apresentaram epiderme de aspecto normal ou com alterações discretas, enquanto os pacientes com quelóide exibiram predomínio de escores elevados, com hiperplasia epidérmica discreta a moderada, aplanamento das cristas interpapilares e redução ou ausência de anexos cutâneos nas áreas de fibrose densa, refletindo o impacto do remodelamento dérmico sobre a arquitetura epidérmica.

Tabela 18 - Distribuição do escore de alterações epidérmicas segundo características clínicas (teste Qui-quadrado de Pearson; n = 26)

Características	Escore 1	Escore 2	Escore 3	p
Idade				0,74
≤ 32 anos	4 (16,7%)	4 (16,7%)	5 (20,8%)	
> 32 anos	5 (20,8%)	3 (12,5%)	3 (12,5%)	
Gênero				0,19
Masculino	1 (4,2%)	3 (12,5%)	4 (16,7%)	
Feminino	8 (33,3%)	4 (16,7%)	4 (16,7%)	
Etnia/Raça				0,18
Branco	1 (5,6%)	4 (22,2%)	1 (5,6%)	
Pardo/Preto	2 (11,1%)	3 (16,7%)	7 (38,9%)	
Tempo de quelóide*				0,31
≤ 5 anos	3 (16,7%)	4 (22,2%)	4 (22,2%)	
> 5 anos	0 (0,0%)	3 (16,7%)	4 (22,2%)	
Grupo				0,01
Pacientes com quelóide	3 (12,5%)	7 (29,2%)	8 (33,3%)	
Pacientes controle	6 (25,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

*Para essa análise, foram considerados apenas os pacientes com doença ativa (n = 20). Valores em negrito representam significância estatística ($p < 0,05$).

4.3. Análise da distribuição do colágeno dos tipos I, III e V nos quelóides

Quando analisamos a imunofluorescência para colágeno do tipo I (**Col I**), identificamos na derme papilar (**DP**) dos controles (**Figura 15A**) um padrão fibrilar fino e homogêneo em toda a **DP**, assim como na derme reticular (**DR**) (**Figura 15D**). Ainda, observamos a imunomarcagem do **Col I**, circundando as fibras de colágeno, de aspecto amorfo, com padrão de marcação fino ao redor de vasos e capilares, na pele sadia.

Por outro lado, no tecido cutâneo dos queloides, observamos um aumento da imunomarcagem do **Col I** na derme papilar (**DP**) (**Figura 15B**), assim como na parede de vasos e capilares, resultando na diminuição do lúmen destes componentes vasculares, com predomínio do espessamento das paredes dos vasos e capilares na **DR** (**Figura 15E**).

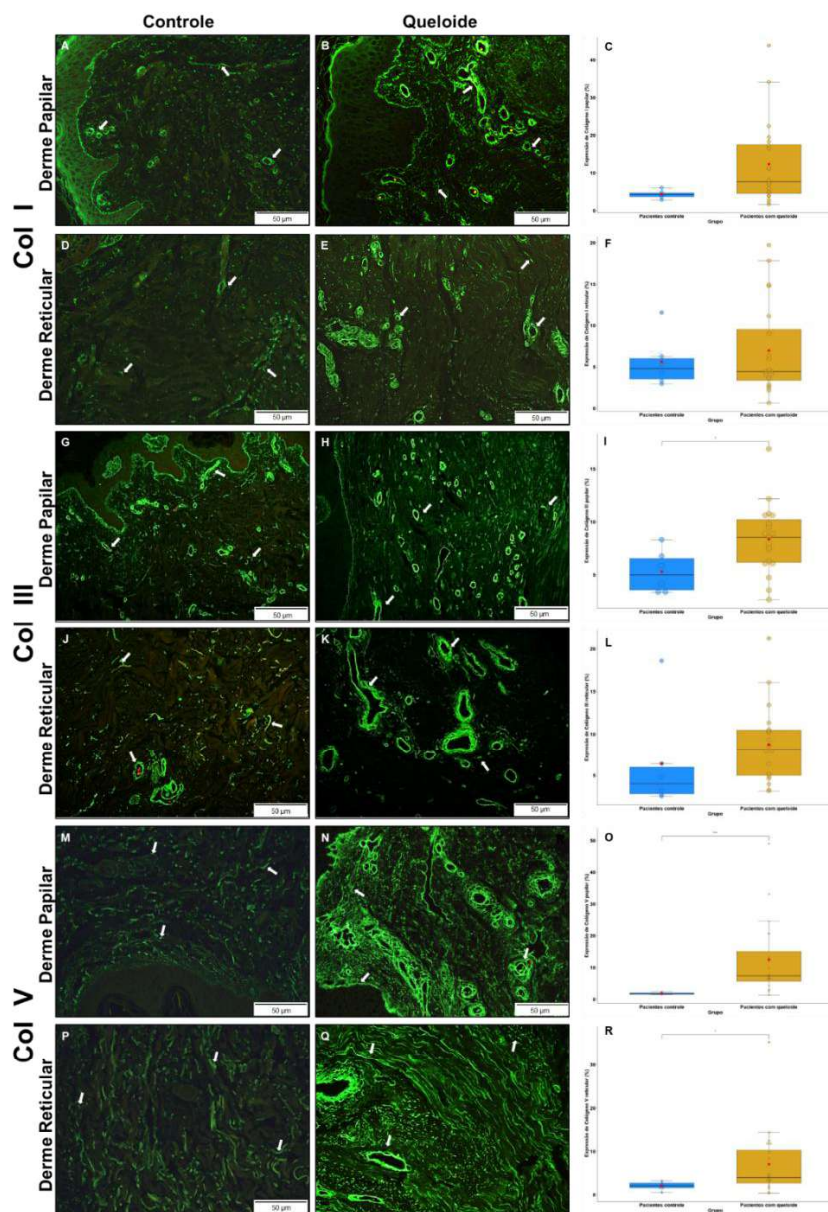
Estes achados morfológicos foram confirmados pela avaliação quantitativa da imunomarcagem do **Col I** na derme papilar (**DP**) (**Figura 15C**), e na **DR** (**Figura 15F**), que mostram aumento da expressão do **Col I** em pacientes com quelóide, em relação aos controles normais, nos dois compartimentos dérmicos; no entanto, esses resultados não foram significativos. Ainda, podemos corroborar nossos dados com as observações detectadas pela coloração com tricrômico de Masson, que identifica as fibras de colágeno hialinizadas e imunomarcadas, com predomínio na **DR**, confirmando o intenso remodelamento do **Col I** observado pela imunofluorescência, na pele de pacientes com quelóide (**Figura 14**).

Por outro lado, quando analisamos a imunomarcagem para o **Col III**, identificamos, próximo a membrana basal do epitélio, um padrão fibrilar fino e rendilhado na **DP** e ao redor de vasos e capilares na pele sadia (**Figura 15G**). Ainda, o padrão fibrilar fino acompanha toda extensão da **DR**, além dos pequenos vasos e capilares, na pele sadia (**Figura 15J**). Por outro lado, é evidente, na pele de pacientes com quelóide, o aumento da expressão de **Col III** na **DP** (**Figura 15H**), também com padrão fibrilar fino, semelhante aos pacientes controles. Quando analisamos a imunomarcagem do **Col III** nos vasos e capilares na **DP**, fica evidente a intensa expressão de **Col III**, que se estende nos vasos da **DR** da pele dos pacientes com quelóide (**Figura 15K**). Novamente, a avaliação quantitativa confirma os dados morfológicos qualitativos, demonstrando um aumento significativo da expressão de **Col III** nos vasos e capilares da **DP** na pele de pacientes com quelóide, em relação à pele sadia (**Figura 15I**), mas na **DR** esta diferença não foi significativa.

Quando avaliamos a expressão de **Col V** na **DP** da pele sadia, observamos fibras bem finas e delicadas distribuídas de forma homogênea, delineando a região epitelial e membrana basal (**Figura 15M**), que se expande para a **DR**, obedecendo o mesmo padrão de distribuição (**Figura 15P**). Por outro

lado, no tecido queloidiano, a expressão de **Col V** na **DP** apresentou-se intensamente expresso (**Figura 15N**), assim como na **DR** (**Figura 15Q**). Estes resultados corroboram com nossos achados na coloração de H&E e tricrômico de Masson, onde observamos as fibras colágenas onduladas e distribuídas ao redor dos fibroblastos, resultando na formação de nódulos dérmicos (**Figura 14**). Ainda, nossos resultados quantitativos mostram que o **Col V** está aumentado na pele destes pacientes, quando comparados à pele sadia (**Figura 15O**). Por outro lado, quando analisamos o perfil estrutural do **Col V** na **DP** do tecido cutâneo queloidiano, observamos que este colágeno, além de intensamente expresso na **DP**, se expande para a **DR**, obedecendo um padrão heterogêneo e espesso, na região da **DR**, onde encontramos o **Col I** hialinizado.

Figura 15 - Fotos representativas da imunofluorescência para colágeno dos tipos I (Col I), III (Col III) e V (Col V) dos pacientes dos grupos Controle (A, D, G, J, M, P) e Quelóide (B, E, H, K, N, Q). Nota-se a expressão de Col I na DP, com predomínio ao redor das paredes dos vasos e capilares, expandindo-se em toda derme, na pele dos pacientes com quelóide (B), em relação ao grupo controle (A). Na DR, observa-se o mesmo padrão de imunomarcação encontrado na DP, na pele dos pacientes com quelóide (E), em relação ao controle (D). Em (H) na DP dos quelóides, destaca-se uma intensa expressão de **Col III**, nos vasos e capilares da matriz dérmica, assim como na DR (K), contrastando com seus respectivos controles (G, J). Já em relação ao **Col V** na DP (N) e DR (Q), identifica-se um intenso aumento da expressão desta proteína em toda matriz dérmica e vasos, quando comparada aos controles (M,P). Em (C,F,I,L,O,R), encontra-se a representação gráfica da quantificação dos tipos de colágeno; nota-se diferença significativa do **Col III** e **V** na pele dos pacientes com quelóide em relação aos respectivos controles (I,L,O,R). As setas indicam locais de marcação do colágeno dos tipos **I** (A,B,D,E), **III** (G,H,J,K) e **V** (M,N,P,Q). DP: Derme Papilar; DR: Derme Reticular. Aumento de 400x. Teste de Mann-Whitney. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



4.4. Análise da expressão gênica de *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* e *COL5A2*, e dos microRNAs 21-5p e 199a-3p no tecido queloidiano

A análise quantitativa da expressão gênica da cadeia $\alpha 1$ do Col I (*COL1A1*) revelou que, no grupo Queloides, houve aumento na expressão desse gene, em comparação ao grupo Controle, com dados de mediana e intervalo interquartil (IQR), respectivamente (42,15 (IQR 3,75-82,08) vs ; 3,4 (IQR 1,118-4,888); $p=0,0217$).

Quando analisamos a expressão do gene *COL3A1*, referente à cadeia $\alpha 1$ do Col III, encontramos aumento da sua expressão entre os grupos avaliados, Queloides e Controle (37,62 (IQR 6,556-80,93) vs 3,09 (IQR 1,077-4,481); $p=0,0102$).

Do mesmo modo, quando comparamos a expressão do gene *COL5A1*, referente à cadeia $\alpha 1$ do Col V, obtivemos aumento da expressão desta proteína no grupo Queloides (1,741 (IQR 0,2759-2,924) vs 0,2013 (IQR 0,1016-0,2925); $p=0,0208$).

Ainda, ao avaliarmos a expressão gênica da cadeia $\alpha 2$ do Col V (*COL5A2*), encontramos a maior diferença estatisticamente significativa entre os grupos, Queloides e Controle, com aumento da expressão deste gene no primeiro grupo (1,552 (IQR 0,3270-3,381) vs 0,1172 (IQR 0,07351-0,19); $p=0,0002$).

Em relação aos microRNAs, ao avaliarmos a expressão do miR-21-5p nos grupos estudados, Queloides e Controle, obtivemos aumento significativo da expressão no primeiro grupo (0,5784 (IQR 0,2244-0,9531) vs 0,04099 (IQR 0,03730-0,04857); $p=0,0015$).

Quanto à expressão do miR-199a-3p, um aumento importante de expressão no grupo Queloides foi observado, quando comparado ao grupo Controle (0,3398 (IQR 0,1898-0,5044) vs 0,04244 (IQR 0,03992-0,06049); $p<0,0001$).

4.5. Análise comparativa do colágeno, marcadores moleculares e microRNAs

A expressão mediana do colágeno variou conforme o tipo e a localização dérmica (papilar vs reticular), conforme apresentado na **Tabela 19**. Os dados indicam que, em geral, Col III apresentou maior expressão que Col I e Col V. A diferença entre papilar e reticular foi mais evidente para Col V, com maior deposição neste estrato dérmico.

A avaliação de expressão relativa por $2^{-\Delta\Delta C_t}$ dos microRNAs e genes relacionados ao colágeno mostrou que os valores de *COL1A1* e *COL3A1* apresentam ampla variação interindividual (**Tabela 19**), refletindo heterogeneidade na deposição de fibras colágenas e, possivelmente, correspondendo aos diferentes estágios de maturação e remodelamento observados nos escores histológicos.

Tabela 19 - Expressão mediana de colágeno e marcadores moleculares na coorte estudada (n=26)

Marcador	Região dérmica	Mediana (% ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Intervalo interquartil (IQR)
Colágeno tipo I (Col I)	Papilar	5,90	3,90 – 16,70
	Reticular	4,46	3,20 – 9,54
Colágeno tipo III (Col III)	Papilar	7,54	5,29 – 9,65
	Reticular	7,91	4,28 – 10,44
Colágeno tipo V (Col V)	Papilar	6,43	2,24 – 12,57
	Reticular	3,31	1,72 – 8,75
miR-21	—	0,31	0,04 – 0,84
miR-199	—	0,25	0,06 – 0,44
COL5A1	—	0,49	0,15 – 2,39
COL5A2	—	0,75	0,16 – 2,78
COL1A1	—	12,57	2,41 – 75,11
COL3A1	—	12,41	2,63 – 69,64

Quando a expressão foi avaliada entre os grupos, é possível notar diferenças significativas entre estes, para diversos marcadores de interesse,

incluindo colágeno tipo III e V papilar, colágeno tipo V reticular, miR-21, miR-199, COL1A1, COL3A1, COL5A1e COL5A2 (Tabela 20 e Figuras 15 e 16).

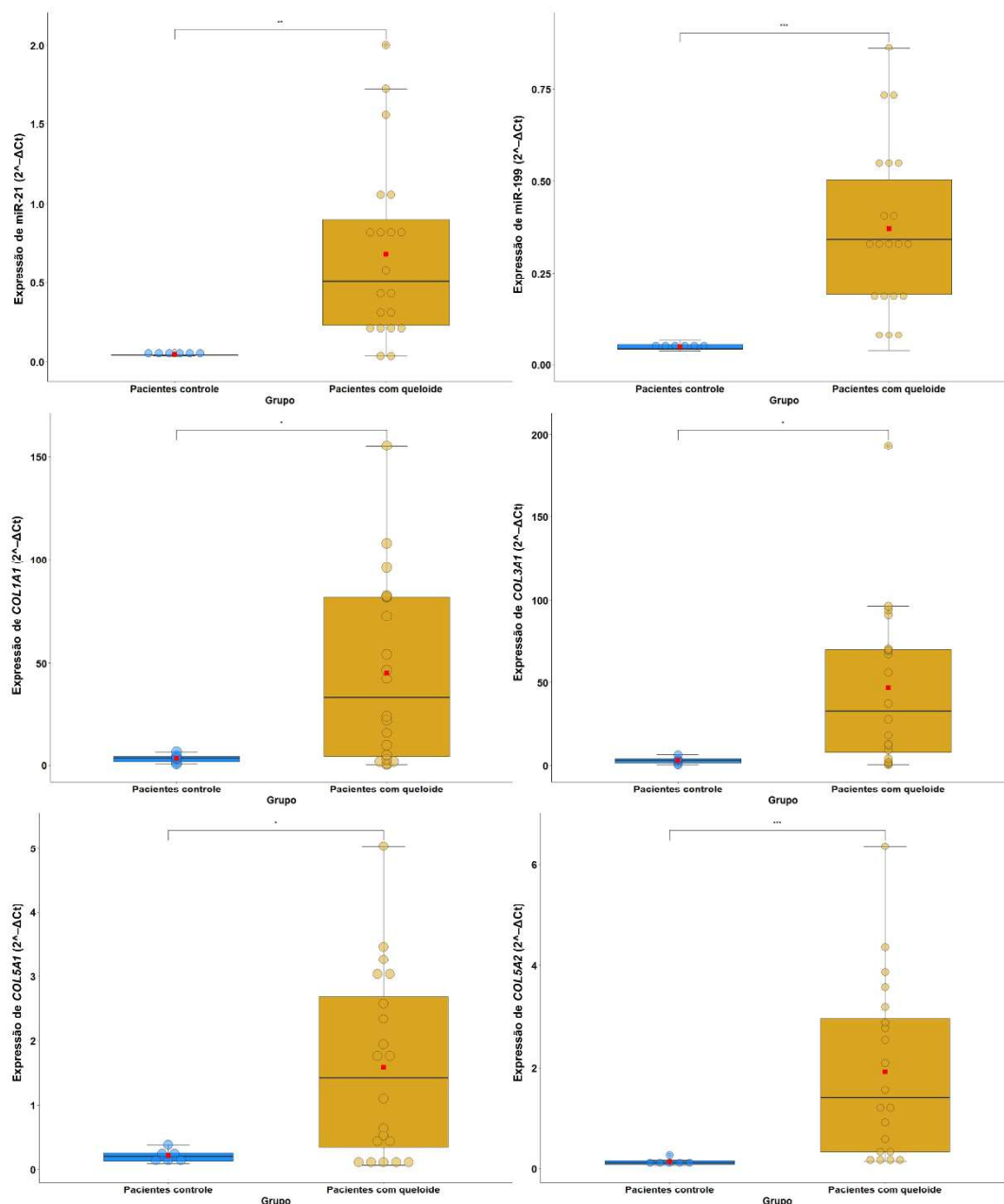
Em todos os casos significativos, observou-se valores de expressão menores nos pacientes do grupo controle em relação aos pacientes com queiloide, com magnitudes de efeito variando de moderada a grande ($r = 0.44-0.66$).

A análise do tamanho do efeito (r) revelou magnitudes moderadas a grandes para a maioria dos marcadores fibróticos e pró-fibróticos. Destacam-se o colágeno do tipo V (papilar e reticular) e os microRNAs miR-21 e miR-199, que apresentaram os maiores tamanhos de efeito ($r = 0,58-0,66$).

Tabela 20 - Expressão mediana dos marcadores nos diferentes grupos de estudo (n = 26; Mann-Whitney)

Marcador	Pacientes com queiloide		Pacientes controle		p	Tamanho do efeito (r)
	Expressão	IIQ	Expressão	IIQ		
Col I Papilar	7,67	4,13-18,05	4,23	3,36-5,15	0,06	0,38
Col I Reticular	4,46	3,06-10,59	4,79	3,20-7,59	1,00	0,01
Col III Papilar	8,53	6,08-10,57	4,99	3,36-7,13	0,02	0,46
Col III Reticular	8,12	4,88-10,50	4,03	2,64-9,42	0,09	0,36
Col V Papilar	7,32	4,70-18,72	1,64	1,46-2,10	<0,001	0,65
Col V Reticular	3,96	2,34-11,26	2,06	1,29-2,87	0,02	0,44
miR21	0,51	0,21-1,00	0,04	0,04-0,05	0,002	0,58
miR199	0,34	0,19-0,55	0,04	0,04-0,06	<0,001	0,66
COL5A1	1,42	0,21-2,90	0,20	0,10-0,29	0,03	0,44
COL5A2	1,40	0,32-3,11	0,12	0,07-0,19	<0,001	0,65
COL1A1	33,07	3,20-82,11	3,40	1,12-4,89	0,03	0,44
COL3A1	32,86	5,23-70,39	3,09	1,08-4,68	0,01	0,48

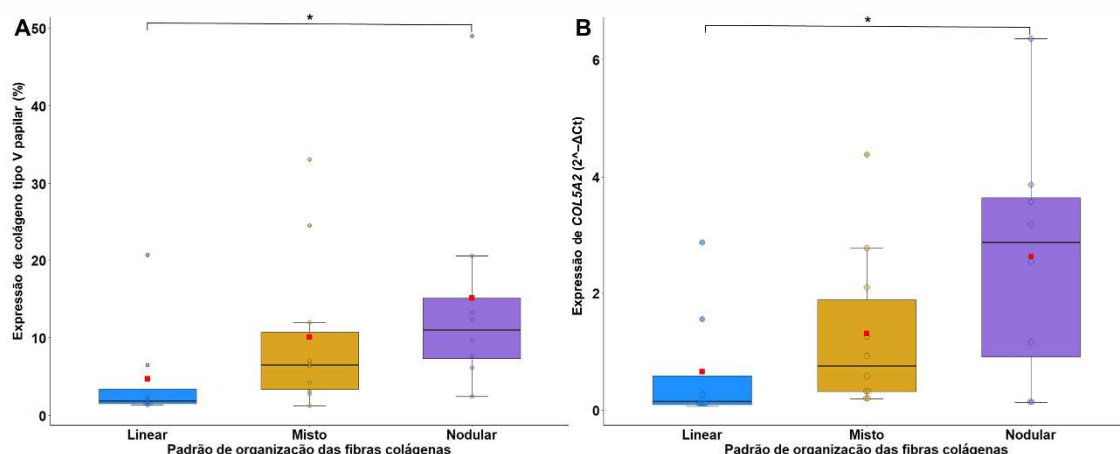
Figura 16 - Representação gráfica da relação entre a expressão dos marcadores moleculares de interesse nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a expressão de miR-21 nos diferentes grupos. (B) Box plot mostrando a expressão de miR-199 nos diferentes grupos. (C) Box plot mostrando a expressão de *COL1A1* nos diferentes grupos. (D) Box plot mostrando a expressão de *COL3A1* nos diferentes grupos. (E) Box plot mostrando a expressão de *COL5A1* nos diferentes grupos. (F) Box plot mostrando a expressão de *COL5A2* nos diferentes grupos. Teste de Mann-Whitney. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



4.6. Correlação entre os parâmetros histológicos e marcadores moleculares

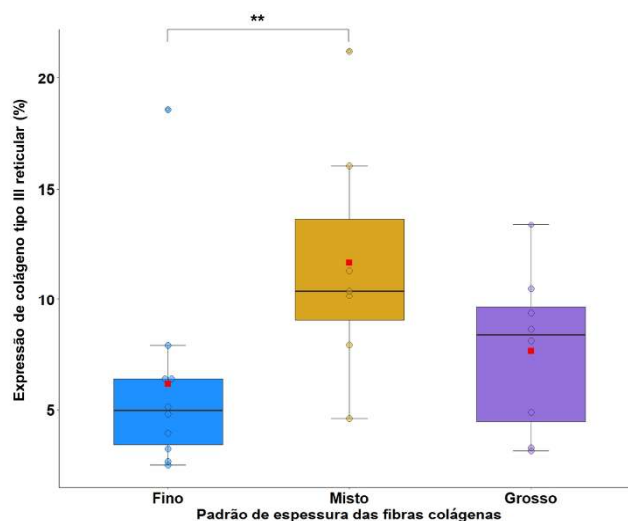
A análise da correlação do escore de **organização de fibras colágenas** com os marcadores estruturais e moleculares mostrou diferença estatística significativa para a expressão de colágeno tipo V papilar e *COL5A2*, com maior expressão desses marcadores em queloides com organização nodular quando comparada à organização linear ($p = 0,03$ e $p = 0,04$, respectivamente; **Figuras 17A e 17B**).

Figura 17 - Representação gráfica da relação entre o padrão de organização das fibras colágenas e a expressão proteica e gênica de colágeno tipo V nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de colágeno tipo V na derme papilar dos grupos estudados. (B) Box plot representando a frequência de distribuição da expressão gênica de *COL5A2* nos grupos avaliados. Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. $*p < 0,05$.



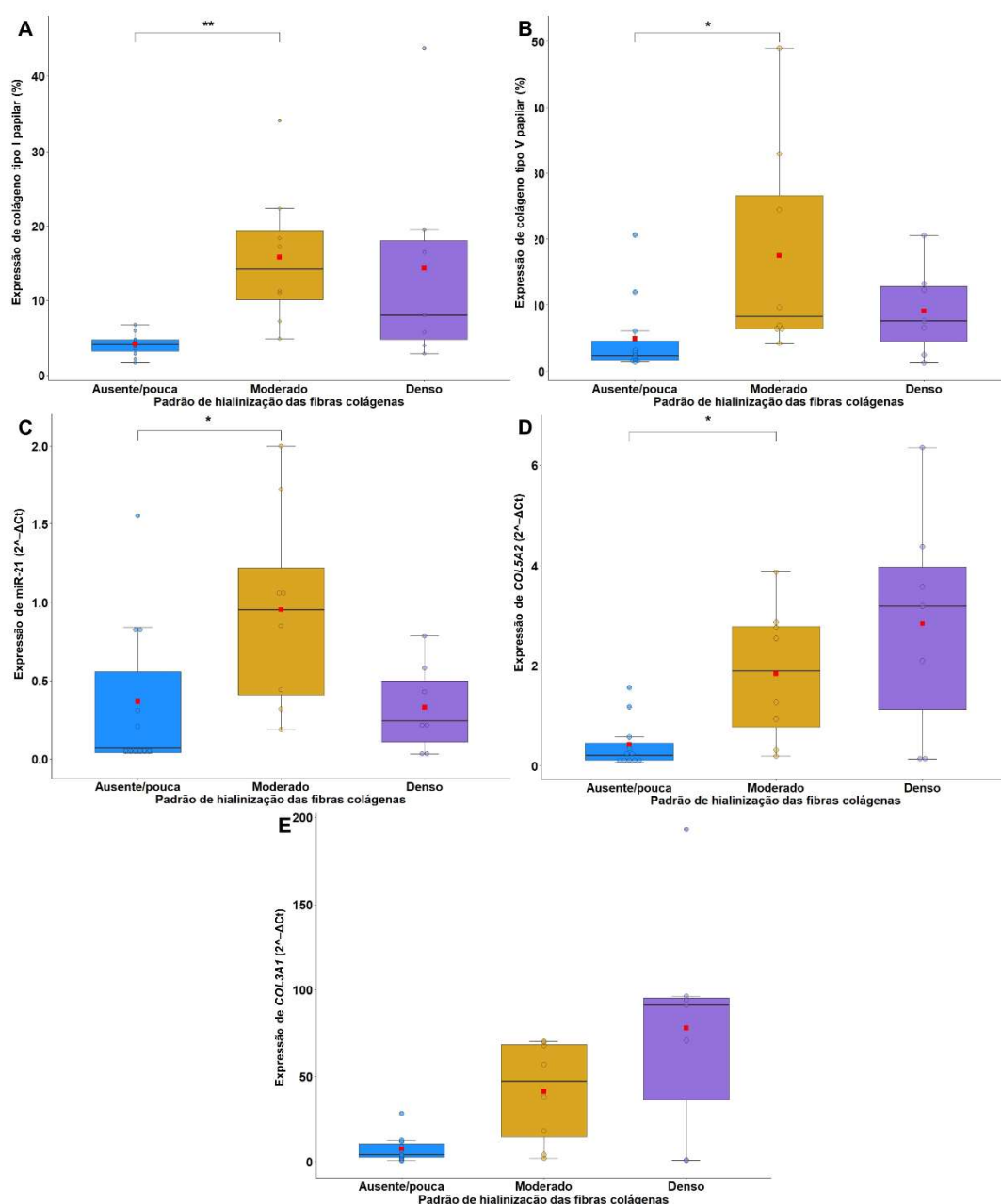
Quando o escore de **espessura** foi correlacionado com os marcadores estruturais e moleculares avaliados, observou-se diferença estatística significativa para o colágeno tipo III reticular, cuja expressão foi maior em amostras classificadas com escore misto em comparação às de fibras finas ($p = 0,04$; **Figura 18**).

Figura 18 - Representação gráfica da relação entre a espessura das fibras colágenas e a expressão proteica de colágeno tipo III nos grupos estudados (n=26). Box plot mostrando a frequência de distribuição do escore de espessura das fibras colágenas nos grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha no gráfico da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



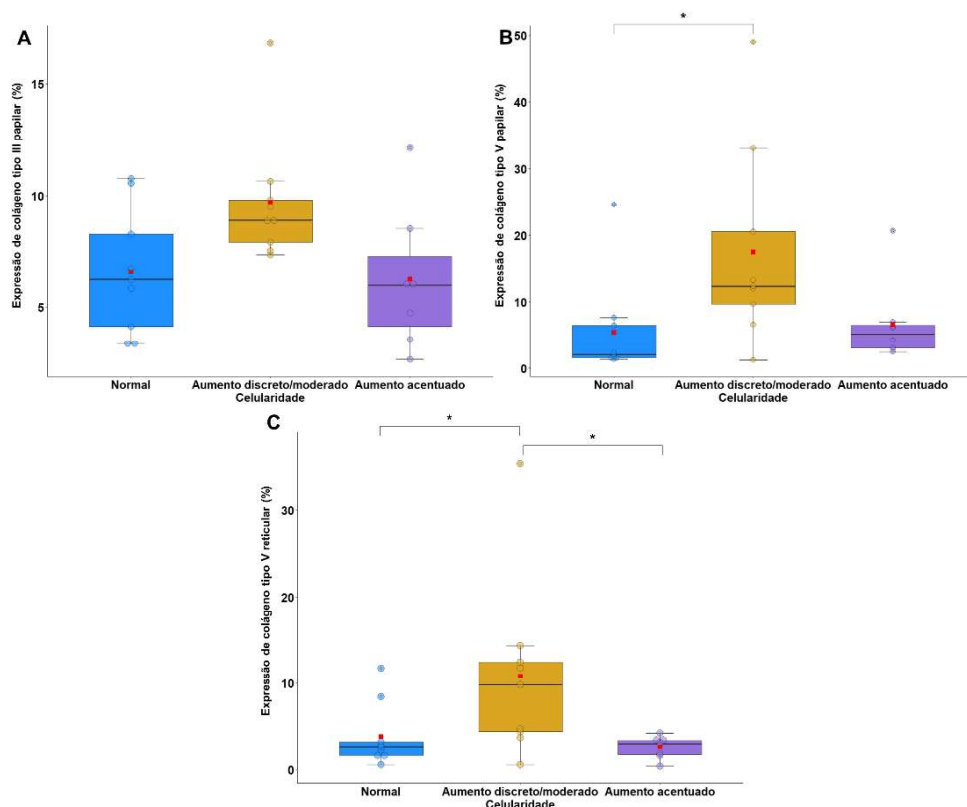
Quando a **hialinização do colágeno** é correlacionada com os marcadores estruturais e moleculares avaliados em toda a casuística, o escore de hialinização apresentou diferenças significativas em múltiplos parâmetros: Colágeno tipo I e tipo V papilar, com aumento significativo da expressão no grupo com hialinização moderada em relação ao grupo ausente/pouca ($p = 0,002$ e $p = 0,03$; respectivamente; **Figura 19A e 19B**); expressão aumentada de miR-21 no grupo moderado em relação ao ausente/pouca ($p = 0,04$; **Figura 19C**); COL5A2: expressão significativamente maior em amostras moderadas ($p = 0,03$; **Figura 19D**); COL3A1: tendência à diferença entre escores ($p = 0,04$), embora sem significância entre grupos após correção de Bonferroni (**Figura 19E**).

Figura 19 - Representação gráfica da relação entre o padrão de hialinização do colágeno e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de hialinização das fibras colágenas e a expressão do colágeno tipo I na derme papilar dos grupos estudados. (B) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de hialinização das fibras colágenas e a expressão do colágeno tipo V na derme papilar dos grupos estudados. (C) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de hialinização das fibras colágenas e a expressão de miR-21 nos grupos estudados (D) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de hialinização das fibras colágenas e a expressão de *COL5A2* nos grupos estudados. (E) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de hialinização das fibras colágenas e a expressão de *COL3A1* nos grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



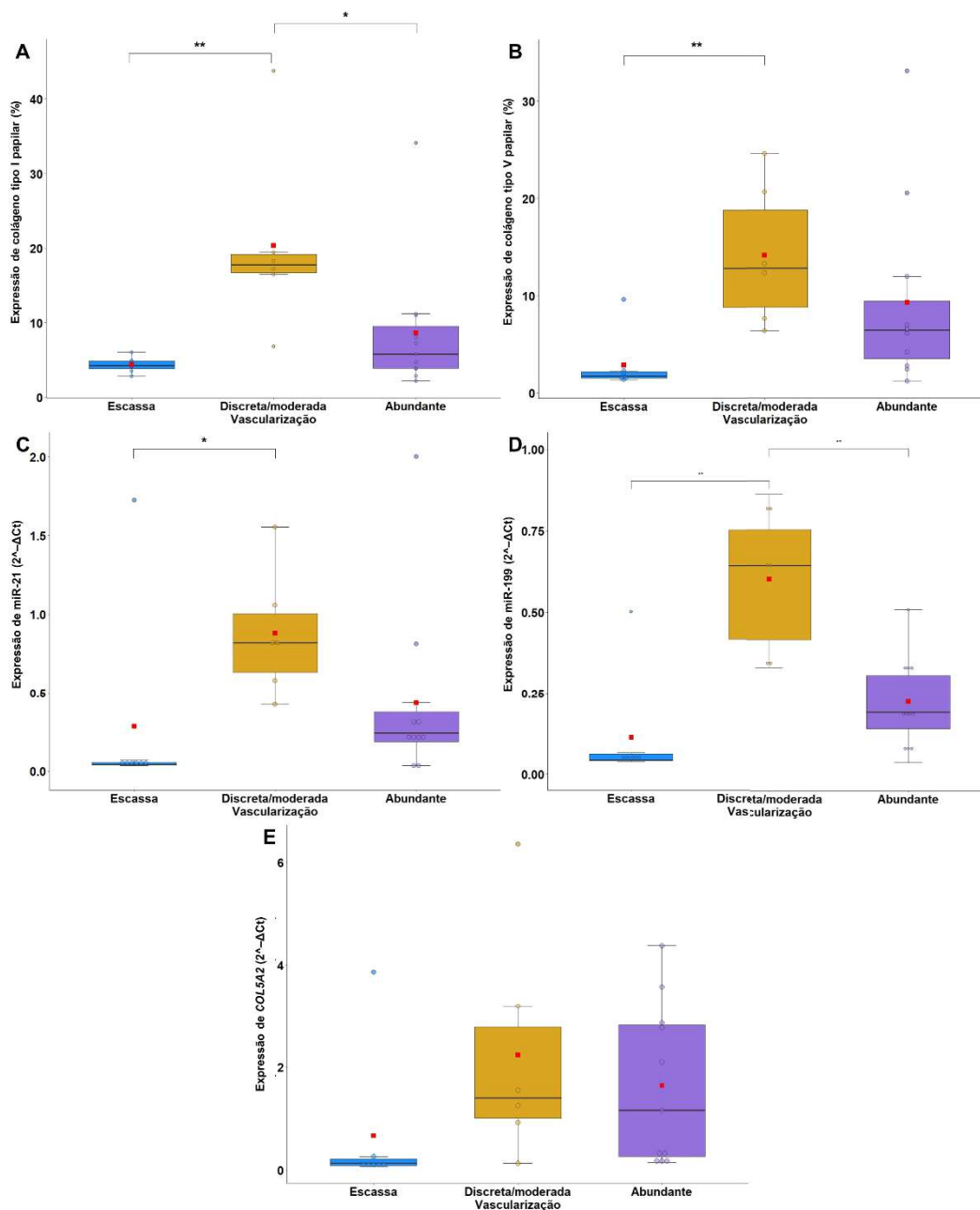
Quando a **celularidade** (células mesenquimais fusocelulares) é correlacionada com os marcadores estruturais e moleculares avaliados em toda a casuística, o escore de celularidade apresentou diferenças estatisticamente significativas para o colágeno dos tipos III ($p = 0,05$, sem significância entre grupos após correção de Bonferroni; **Figura 20A**) e tipo V papilares, com maior expressão em pacientes com aumento da celularidade de forma discreta/moderada comparada à celularidade normal ($p = 0,03$; **Figura 20B**). Observamos, também, uma diferença significativa na expressão do colágeno tipo V reticular, com aumento na expressão desse marcador no grupo com aumento da celularidade de forma discreta/moderada em comparação aos demais grupos ($p = 0,04$, para ambas as comparações; **Figura 20C**).

Figura 20 - Representação gráfica da relação entre a celularidade (células mesenquimais) e a expressão proteica nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de celularidade e a expressão do colágeno tipo III na derme papilar dos grupos estudados. (B) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de celularidade e a expressão do colágeno tipo V na derme papilar dos grupos estudados. (C) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de celularidade e a expressão do colágeno tipo V na derme reticular dos grupos estudados. Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$.



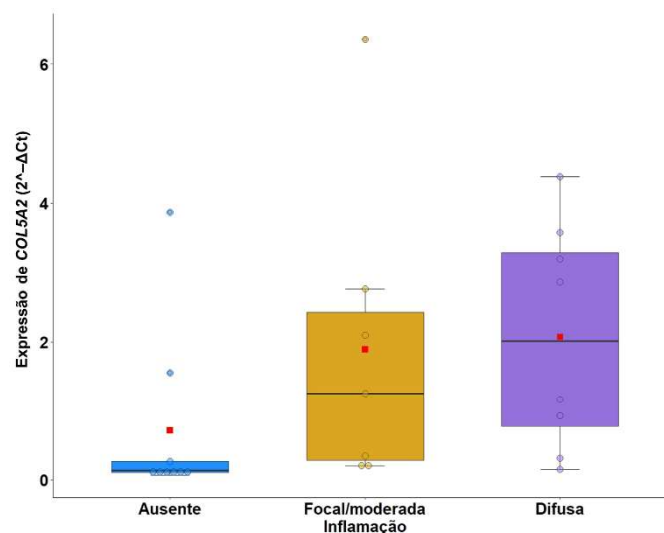
Ao correlacionar o escore de **vascularização** com os marcadores estruturais e moleculares avaliados em toda a casuística, observamos diferenças estatisticamente significativas na expressão de colágeno tipo I papilar, com maior expressão nos casos que apresentaram vascularização discreta a moderada comparada aqueles com vascularização escassa ou abundante ($p = 0,006$ e $p = 0,05$, respectivamente) (**Figura 21A**), e colágeno tipo V papilar, com maior expressão nos pacientes com vascularização discreta/moderada frente aqueles com vascularização escassa ($p = 0,005$) (**Figura 21B**). Também observamos maior expressão dos miRs-21 e 199 em pacientes com vascularização discreta/moderada comparados à vascularização escassa ($p = 0,02$, $p = 0,001$, respectivamente) (**Figura 21C e 21D**). Para o *COL5A2* houve uma tendência à diferença entre escores ($p = 0,05$), porém sem significância entre grupos após correção de Bonferroni (**Figura 21E**).

Figura 21 - Representação gráfica da relação entre o padrão de vascularização cutânea e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de vascularização e a expressão do colágeno tipo I na derme papilar dos grupos estudados. (B) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de vascularização e a expressão do colágeno tipo V na derme papilar dos grupos estudados. (C) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de vascularização e a expressão de miR-21 nos grupos estudados (D) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de vascularização e a expressão de miR-199 nos grupos estudados. (E) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de vascularização e a expressão de *COL5A2* nos grupos estudados Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Ao correlacionar o escore de **infiltrado inflamatório** com os marcadores estruturais e moleculares avaliados em toda a casuística, notamos diferença estatística apenas para a expressão de *COL5A2* e o escore de infiltrado inflamatório, observando aumento desse marcador com o aumento do escore ($p = 0,04$, porém sem significância entre grupos após correção de Bonferroni) (**Figura 22**).

Figura 22 - Representação gráfica da relação entre o padrão de infiltrado inflamatório e a expressão gênica nos grupos estudados (n=26). Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de inflamação e a expressão de *COL5A2* nos diferentes grupos. Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos.

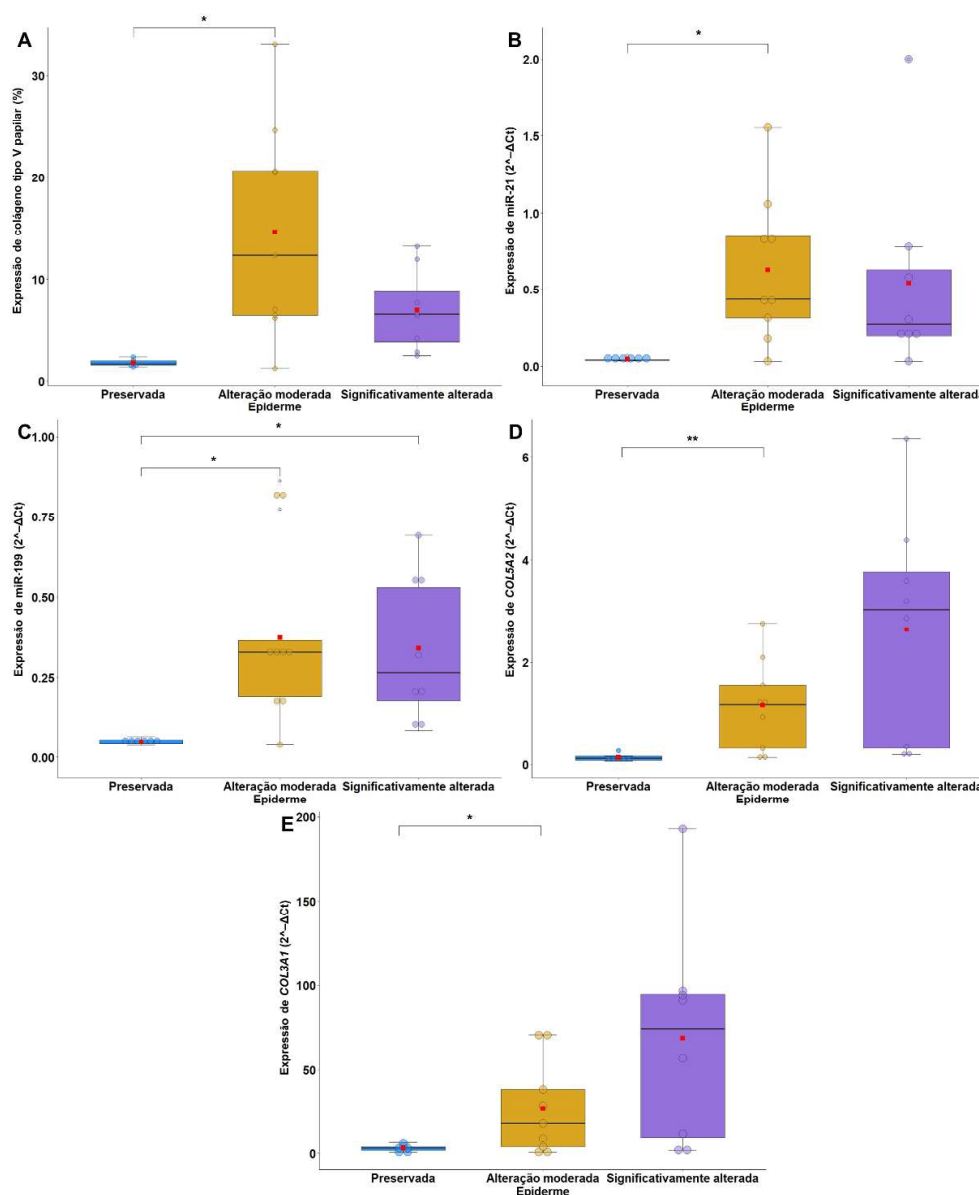


Quando correlacionado com os marcadores estruturais e moleculares avaliados em toda a casuística, o escore de **alterações epidérmicas** apresentou diferenças estatisticamente significativas em múltiplos parâmetros:

- Colágeno tipo V papilar: aumento significativo da expressão no grupo com alteração moderada em relação ao grupo com estrutura preservada ($p = 0,004$; **Figura 23A**);
- miR-21: expressão aumentada no grupo moderado em relação ao preservado ($p = 0,02$; **Figura 23B**);
- miR-199: menor expressão no grupo preservado em relação aos demais grupos ($p = 0,01$, para ambas as comparações; **Figura 23C**);

- *COL5A2* e *COL3A1*: expressão aumentada em amostras significativamente alteradas em relação a amostras com estrutura preservada ($p = 0,002$ e $p = 0,04$, respectivamente; **Figura 23D e 23E**).

Figura 23 - Representação gráfica da relação entre o padrão de alteração epidérmica e a expressão proteica e gênica nos grupos estudados (n=26). (A) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de alteração epidérmica e a expressão do colágeno tipo V na derme papilar dos grupos estudados. (B) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de alteração epidérmica e a expressão de miR-21 nos grupos estudados (C) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de alteração epidérmica e a expressão de miR-199 nos grupos estudados. (D) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de alteração epidérmica e a expressão de *COL5A2* nos grupos estudados. (E) Box plot mostrando a frequência de distribuição dos escores de alteração epidérmica e a expressão de *COL3A1* nos grupos estudados Teste de Kruskal-Wallis. O quadrado em cor vermelha nos gráficos da figura representa a expressão média entre os grupos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



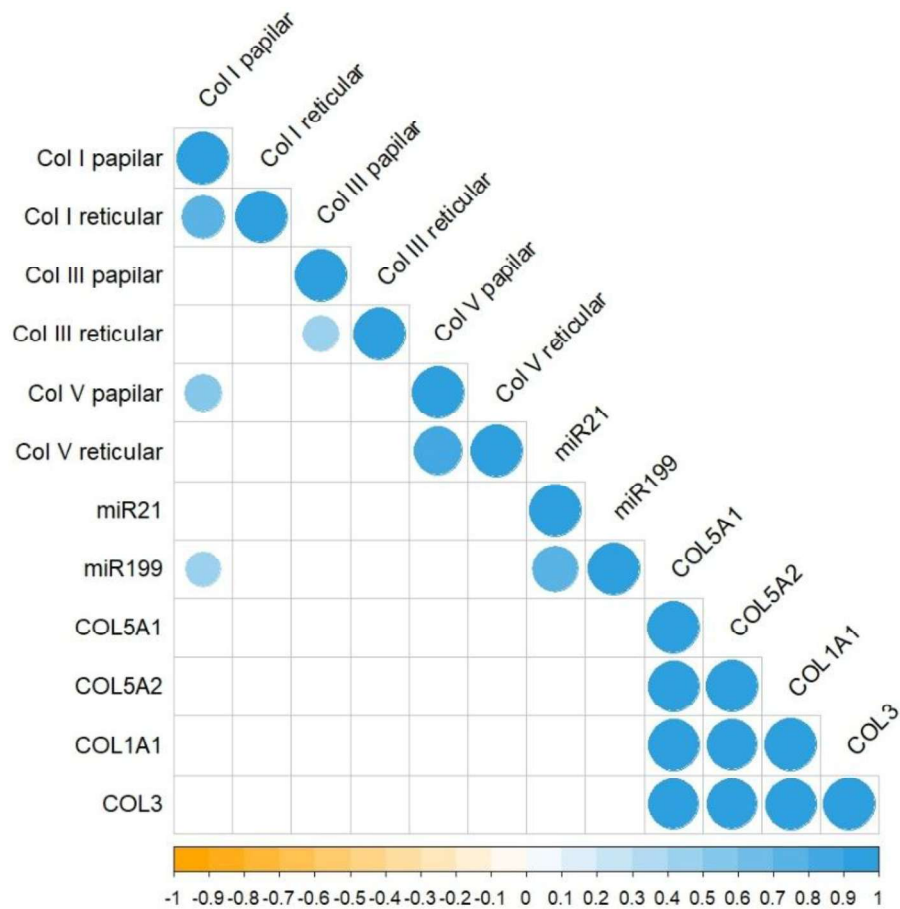
4.7. Associações entre as variáveis

Ao analisar a correlação das variáveis de interesse **apenas na pele com quelóide**, foi possível observar um padrão coordenado de expressão (**Figura 24**) entre:

Colágeno dos tipos I, III e V, nas regiões papilares e reticulares, onde se observa uma correlação de moderada a forte entre: Colágeno I papilar e Colágeno I reticular ($\rho = 0,70$; $p < 0,001$); Colágeno III papilar e Colágeno III reticular ($\rho = 0,48$; $p = 0,04$); Colágeno V papilar e Colágeno V reticular ($\rho = 0,85$; $p < 0,001$); além de Colágeno I papilar e Colágeno V papilar ($\rho = 0,51$; $p = 0,02$).

Observamos também forte correlação entre miR-21 e miR-199 ($\rho = 0,79$; $p < 0,001$) e moderada entre o miR-199 e a expressão de colágeno I papilar ($\rho = 0,46$; $p = 0,04$).

Por fim, também observamos correlações muito fortes ($\rho > 0,9$; $p < 0,001$) entre os genes codificadores de colágeno (*COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*).



5. DISCUSSÃO

Os queloides são desordens fibroproliferativas, decorrentes do remodelamento da MEC cutânea, surgindo após injúria tecidual ou espontaneamente [145–148]. Afetam parcela significativa da população mundial [9] e acarretam importantes impactos estéticos e funcionais [21]. Embora benignos, apresentam características que os aproximam das neoplasias, incluindo crescimento persistente, ausência de regressão espontânea, semelhanças geno e fenotípicas, e altas taxas de recorrência após excisão isolada (45–100%) [9,20,26,94,103,121]. Sua etiopatogenia é multifatorial, envolvendo inflamação persistente, vias de sinalização alteradas, remodelação anômala da matriz e fatores imunológicos, mecânicos, genéticos, epigenéticos e ambientais [6,8,9,24,91,149]. Não obstante as cicatrizes queloidianas venham sendo estudadas há décadas, a multiplicidade de fatores envolvidos em seu mecanismo etiopatogênico e, contraditoriamente, as lacunas ainda existentes no entendimento desses processos, acabam por promover tratamentos, muitas vezes, ineficazes, perpetuando o sofrimento daqueles que apresentam esta doença. A terapêutica segue desafiadora: a excisão associada à radioterapia precoce e/ou corticoterapia apresenta os melhores resultados, embora ainda com recidivas relevantes [20,121,129,150,151], enquanto outras abordagens, tais como aloenxertos, PRP, retalhos, substitutos cutâneos e terapias emergentes, como pequenas moléculas inibitórias, substâncias biológicas, RNA de interferência, terapia gênica, células-tronco e moduladores epigenéticos, vêm sendo estudadas [8,20,26]. Assim, a investigação de outros aspectos ainda não abordados ou pouco explorados na etiopatogenia dos queloides é de fundamental importância como meio para o desenvolvimento de marcadores diagnósticos e novas terapêuticas que possam ser mais eficazes no manejo desta condição. Neste contexto, o microambiente da MEC exerce papel central na progressão do queleide, analogamente ao observado em tumores desenvolvidos em contextos fibróticos [6].

No presente estudo, caracterizamos as alterações morfológicas e moleculares em lesões queloidianas, integrando análises histológicas quantitativas, escores histológicos (KHS), expressão de tipos de colágeno,

microRNAs, e genes moduladores do colágeno, permitindo a construção de um panorama abrangente do remodelamento dérmico associado ao quelóide. Neste contexto, o conjunto de dados do estudo mostrou que a evolução do quelóide segue um gradiente morfo-molecular, caracterizado pela transição de uma matriz dérmica inicial, frouxa e rica em colágeno III, para um tecido progressivamente mais denso, composto por colágeno dos tipos I e V. Nas fases iniciais predominam fibras finas e baixa hialinização, refletindo um remodelamento ainda semelhante ao da derme normal. Com o avanço do processo, ocorre desorganização fibrilar, espessamento das fibras e aumento da expressão do gene *COL5A2*, indicando ativação fibroblástica e maior deposição de MEC. Nos estágios mais avançados, a hialinização moderada ou intensa associa-se à elevação de tipos de colágeno fibrilares e de miR-21-5p, microRNA que atua em vias pró-fibróticas. Assim, sugerimos que a maturação do quelóide resulta da interação entre alterações estruturais e mecanismos regulatórios mediados por microRNAs, culminando em uma matriz rígida, espessa e persistentemente fibrosada.

Uma avaliação detalhada da casuística do nosso estudo mostra uma predominância de mulheres no grupo quelóide (60%), o que é consistente com relatos anteriores, que sugerem maior propensão feminina à formação destas cicatrizes, possivelmente associada a fatores hormonais e imunológicos [1,4,8,152], embora haja autores que apontem inexistência de diferença entre os gêneros [9]. O predomínio de indivíduos autodeclarados pardos ou pretos (70%) também corrobora estudos prévios, que indicam maior risco em populações com maior fototipo cutâneo, reforçando o papel de fatores genéticos e pigmentares na predisposição à fibrose queloidiana [5,8,14,84,145]. Quanto à idade dos indivíduos com cicatrizes queloidianas, nosso grupo de estudo foi bastante heterogêneo, composto por indivíduos com idades variando entre 15 e 57 anos (média: 31 anos; mediana: 30 anos), em contraposição ao relatado na literatura, que aponta predominância da doença em crianças e adultos jovens, entre 10 e 30 anos de idade [8,9,145,152].

Quanto ao tempo de aparecimento das lesões queloidianas, estas, geralmente, se desenvolvem entre meses e um ano após a lesão dérmica, mas

os períodos de latência relatados podem variar de semanas a várias décadas [12,152–154]. No entanto, este aspecto não foi relevante em nosso estudo.

Embora sejam vistos e tratados como uma entidade única, suas apresentações clínicas sugerem heterogeneidade morfológica, desde lesões mais superficiais e extensas, até aquelas com característica nodular [155]. Deste modo, a variabilidade de fenótipos clínicos e histológicos acaba por dificultar a interpretação das amostras teciduais dos pacientes acometidos.

No presente estudo, a análise histológica das amostras queloidianas revelou padrão progressivo de remodelamento dérmico, com aumento da espessura dérmica, desorganização das fibras colágenas e hialinização, características compatíveis com o processo de fibrose exacerbada típico desta doença e que, isoladamente, corroboram achados anteriores de outros autores [8,12,24,94,99,156]. As fibras colágenas espessadas e compactadas foram atribuídas, segundo alguns autores, às ligações cruzadas das fibrilas de colágeno estabelecidas por moléculas envolvidas na montagem desta proteína, como a lisil oxidase (LOX), mais expressas nessas cicatrizes [19].

Já, a rarefação de fibras elásticas dérmicas encontrada em nossos pacientes, está em consonância com alguns autores, uma vez que, segundo estudos prévios, embora haja aumento da elastina na derme profunda [5], a expressão desregulada de proteínas de formação de fibras elásticas acarreta alteração na composição das microfibrilas e, conseqüentemente, na organização destas em fibras maduras [41,94,157]. Em nosso estudo, a epiderme sobrejacente aos queloides manteve-se, em geral, preservada, embora, em alguns casos, tenha sido notada discreta acantose e aumento do número de melanócitos basais, em contraposição a outros autores, que encontraram, nos queloides, espessura epidérmica maior, associada ao seu “achatamento” [4,78,82,94,158]. Os melanócitos, segundo alguns autores, estão relacionados ao aumento da expressão de colágeno tipo I e de TGF- β , promovendo a deposição de MEC [9,159]

As incongruências, muitas vezes identificadas nos achados histológicos queloidianos entre os diferentes estudos, se devem à existência de alterações

dessas cicatrizes entre si e dentro de uma mesma cicatriz, ocasionando, por vezes, alterações na interpretação dos resultados obtidos [4]

Embora as características histológicas presentes nos queloides tenham sido bem descritas na literatura, estas aparecem, muitas vezes, como manifestações estáticas desta condição patológica, não considerando o processo dinâmico de remodelamento dessas cicatrizes. Alguns autores estudaram o padrão histológico dos queloides, no intuito de diferenciá-los de outras doenças, como as cicatrizes hipertróficas [12,149]; outros, tentaram avaliar algumas dessas características na predição da recorrência queloidiana após exérese [160]; ainda, alguns compararam o padrão histológico das lesões queloidianas à pele circundante, extra-lesional [19]. Lee et al., 2004, avaliaram parâmetros histológicos de achatamento da epiderme, preservação da derme papilar, presença de nódulos fibrosos, presença de fascículos fibrosos verticais, fascículos fibrosos horizontais, celularidade de fibroblastos, presença de longas faixas fibrosas horizontais semelhantes a fâscias, observadas principalmente na parte inferior das cicatrizes, presença de colágeno queloidal, vasos sanguíneos orientados verticalmente, substância fundamental mucinosa, infiltrado inflamatório na derme papilar e dentro das cicatrizes, desarranjo de nódulos/fascículos fibrosos e expressão de α actina de músculo liso (α -SMA), no intuito de diferenciar queloides de cicatrizes hipertróficas [12].

Outrossim, alguns estudos avaliaram os diferentes compartimentos dérmicos queloidianos, denominando-os de “derme papilar e reticular”, “derme superficial e profunda”, ou “derme superficial, média e profunda” [161]. Jiao et al., 2017, em seu estudo histológico com 19 amostras queloidianas coradas por H&E, imuno-histoquímica (para CD3/CD20), coloração com Sirius Red para a arquitetura das fibras de colágeno e ensaio de migração de fibroblastos, verificaram que o colágeno do tipo I esteve mais expresso na derme profunda do que na superficial, em contraposição ao colágeno do tipo III, mais expresso na camada superficial; ainda, este estudo mostrou que a derme superficial apresentava fibroblastos e linfócitos ativos, diferentemente da camada dérmica profunda, hialinizada e pouco celular. Segundo estes autores, a diferenciação entre as dermes papilar e reticular, claramente marcada em indivíduos com pele normal, não é possível naqueles com alterações queloidianas, tendo, então,

denominado os compartimentos dérmicos em superficial, médio e profundo. Este artigo sugeriu que a formação do queloide pode se iniciar na derme superficial [161]. Outro estudo, de 2023, avaliou os diferentes compartimentos dérmicos queloidianos, com foco na heterogeneidade dos fibroblastos intra e interqueloides, por meio da análise de sua expressão gênica e capacidades funcionais, apontando que os fibroblastos reticulares centrais em queloides nodulares expressaram níveis mais elevados de tipos de colágeno maduros, além de outros marcadores, sugerindo que a derme reticular seja uma importante fonte de MEC e de colágeno [155]. Não obstante, outros autores realizaram estudos de microscopia de geração de segundo harmônico ou microscopia multifotônica para mapear a orientação e a densidade do colágeno em toda a espessura da derme queloidiana; esses estudos evidenciaram diferenças arquiteturais do colágeno entre as camadas superficiais e profundas da derme. Como exemplos, Jiang et al., 2011, demonstraram, por meio de microscopia óptica de geração de segundo harmônico, que o colágeno se distribui de maneiras diversas nos queloides, com feixes espaçados regularmente na derme profunda, orientados aleatoriamente e dispostos frouxamente em um padrão de malha fina na derme média, e organizados paralelamente na derme superficial [162]. Já Chen et al., 2011, revelaram, em seu estudo utilizando microscopia multifotônica, aumento do colágeno em ambos os compartimentos dérmicos, denominados superficial e profundo, com feixes alinhados na derme superficial e desorganizados na derme profunda [5]. Arbi et al., 2015, utilizando análises por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão, da fibrilogênese do colágeno e das interações celulares da derme queloidiana, observaram formação intracelular prematura de fibrilas de colágeno, com anormalidades ultraestruturais no processamento dessas fibrilas, e fagocitose de fibrilas de colágeno por mastócitos [163]. Por sua vez, Kaku et al., 2023, em estudo utilizando microscopia óptica e eletrônica, imuno-histoquímica e proteômica *shotgun* de proteínas do centro do queloide e da pele controle, verificaram que o colágeno queloidal apresentou diâmetros de fibra mais finos e heterogêneos, além de espaçamento irregular; ainda, a proteômica *shotgun*, neste estudo, mostrou abundância de colágeno I, III, VI, XII e XIV no tecido queloidiano [164]. Também, em artigo de revisão sobre a morfologia histológica do queloide, Jumper et al., 2015, relataram que essas cicatrizes apresentam epiderme

espassada e achatada, com feixes de colágeno hialinizados e dispostos de forma desordenada predominando na derme, com subsequente obliteração do limite papilar-reticular, associado ao deslocamento e eventual destruição dos anexos cutâneos; além disso, apontaram que essas cicatrizes apresentam uma proporção aumentada de colágeno dos tipos I/III e aumento na expressão de vários componentes da matriz extracelular na derme reticular [158].

Contudo, embora análises histológicas dos diferentes compartimentos dérmicos de queloides já tenham sido descritas na literatura, não foram identificados estudos que avaliassem o perfil dos principais tipos de colágeno cutâneo nesses compartimentos. Ainda que Jiao et al., 2017, tenham examinado o colágeno dos tipos I e III na derme superficial e profunda, o método empregado, coloração por Sirius Red, apresenta menor especificidade para a identificação dos tipos de colágeno, quando comparado à imunofluorescência, utilizada em nosso estudo. Além disso, avaliamos o perfil de distribuição do colágeno tipo V nesses compartimentos, proteína essencial para a regulação do diâmetro das fibrilas de colágeno I e III, conforme previamente detalhado, o que nos permitiu oferecer uma caracterização mais abrangente do comportamento do colágeno cutâneo queloidiano.

Desta forma, no presente estudo avaliamos, individualmente, cada compartimento dérmico e propusemos um escore de classificação histológica baseado no grau de remodelamento cutâneo queloidiano, propondo, assim, um estadiamento da doença nos diferentes pacientes, bem como localizando, de modo mais preciso, as alterações dérmicas dos tipos mais importantes de colágeno da pele humana, o que pode favorecer a compreensão do mecanismo etiopatogênico da doença e o desenvolvimento de terapias dirigidas para diferentes estágios do remodelamento tecidual.

O escore proposto, denominado de escore KHS (*Keloid Histologic Scar*), levou em consideração sete parâmetros histológicos principais, sendo esses: organização das fibras colágenas, espessura das fibras, grau de hialinização da matriz dérmica, grau de celularidade (de células mesenquimais fusocelulares), grau de vascularização, infiltrado inflamatório e grau de alterações epidérmicas. A correlação estabelecida entre organização das fibras, espessura e hialinização do colágeno dérmico refletiu diferentes estágios de maturação do quelóide.

Ao se relacionar o escore proposto às características clínicas dos indivíduos participantes do estudo, obtivemos, em relação à organização das fibras colágenas, ausência de associação significativa entre este parâmetro e as variáveis idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão; no entanto, a diferença estatisticamente significativa para este parâmetro entre os grupos quelóide e controle, revelou a acentuada desorganização fibrilar e hialinização dérmica presente nessas lesões fibrosas, e confirmou que o escore de organização colágena é um marcador morfológico sensível para distinguir o tecido queloidiano da pele normal, refletindo o processo de remodelamento exacerbado característico desta condição.

Quanto à análise da espessura das fibras colágenas, também houve diferença significativa entre os grupos quelóide e controle, refletindo um aumento progressivo da espessura e compactação das fibras colágenas nas lesões fibrosas e, clinicamente, a maior tendência de associação encontrada entre um maior tempo de evolução da doença e a presença de fibras grossas, o que sugere que o espessamento fibrilar pode estar relacionado à progressão temporal do quelóide. Zhou et al., 2020, a despeito de relatarem a presença de feixes de colágeno densamente organizados na derme queloidiana em amostras de tecido corados com H&E e tricrômico de Masson, verificaram que estes não são tão maduros quanto os da pele normal adjacente, sendo, portanto, mais finos [19]; este achado pode estar relacionado à fase de remodelamento cicatricial em que as amostras do estudo se encontravam.

Considerando-se a hialinização do colágeno, também inexisteram diferenças significantes em relação à idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão; porém, foi observada diferença significativa entre os grupos mencionados, sobretudo dos escores moderado e denso nos pacientes portadores de quelóide, reforçando o caráter progressivamente fibrosante dessas lesões. A hialinização é o termo morfológico para a aparência homogênea, eosinofílica e vítrea de áreas de tecido conjuntivo, especialmente ricas em colágeno. Do ponto de vista molecular e bioquímico, ela reflete uma modificação pós-traducional e estrutural das fibras colágenas, caracterizada por: excesso de ligações cruzadas covalentes sob estímulos crônicos (ex.: hipóxia, inflamação, radicais livres, glicação) entre moléculas de tropocolágeno, que

configurarão o colágeno maduro (especialmente dos tipos I e III); desnaturação parcial e perda da organização fibrilar, o que explica a aparência “vítrea” (hialina) na coloração H&E; deposição de proteínas plasmáticas e glicoproteínas não colágenas (ex: fibrina, imunoglobulinas, albumina), que acentuam o caráter hialino e contribuem para a homogeneização óptica; redução da hidratação e da matriz amorfa (composta por ácido hialurônico, proteoglicanos), com menor birrefringência e maior densidade óptica) [31,48,165–167]. A alteração moderada de densidade/hialinização, e significativa de organização das fibras colágenas, classificada por meio do escore KHS proposto, refletem o predomínio de feixes colagênicos compactos eosinofílicos e com perda da orientação fibrilar, sobretudo na derme reticular. Estes achados corroboram com outros autores, que, muitas vezes, denominam este colágeno eosinofílico espesso e vítreo, que forma espirais e nódulos hialinizados, de colágeno queloidal [8,12,19,94]; no entanto, esta alteração do colágeno nem sempre está presente nos queloides. Ainda, em relação à hialinização do colágeno e o tempo de evolução da lesão, Matsumoto et al., 2017, em estudo histológico com queloides de lóbulo de orelha, apontaram que, no estágio inicial, essas lesões apresentavam pouco colágeno queloidal hialinizado, com tendência de localização em regiões perivasculares, ao passo que, nos estágios mais avançados, o colágeno hialinizado se encontrava altamente agregado, formando uma região espessa em forma de “rosca mordida”, com correlação positiva entre a proporção da área com este tipo de colágeno e o tempo de existência do quelóide, o que difere dos achados de nosso estudo, que não identificou correlação entre a hialinização e o tempo de existência da doença [154].

Com referência à celularidade (células mesenquimais fusocelulares), indicadora do nível de atividade e remodelação dessas cicatrizes, por meio da deposição de colágeno na MEC, embora não tenha havido diferença relevante para os parâmetros idade, gênero, etnia/raça e tempo de evolução da lesão, o mesmo não ocorreu entre os grupos quelóide e controle, denotando o caráter hipercelular característico dessas lesões, e sugerindo maior atividade de células mesenquimais fusocelulares, associada à deposição exacerbada de colágeno. Esta densidade celular dérmica variou segundo o padrão histológico queloidiano; enquanto padrões lineares apresentaram número regular de células

mesenquimais fusocelulares e arquitetura fibrilar paralela, os padrões misto e nodular revelaram predomínio das mesmas células distribuídas entre os feixes colágenos, com discreta infiltração inflamatória mononuclear perivascular. Na maior parte de nossas amostras, o aumento da celularidade mesenquimal fusocelular identificada, com células fusiformes de núcleo alongado, incluindo os fibroblastos, também se alinha com outros estudos, que apontam, como padrão geral dessas cicatrizes, a presença de derme hipercelular, com fibroblastos em número aumentado e mais ativos [4,14,163], acarretando a deposição de MEC e contribuindo para o fenótipo queloidiano, [159].

Em relação à vascularização, igualmente a outros parâmetros do escore, não foram observadas diferenças significativas em relação à idade, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão, porém verificou-se diferença significativa entre os gêneros; na comparação entre os grupos do estudo, queloide e controle, os pacientes com queloide exibiram predomínio de escores indicativos de aumento da vascularização, refletindo o componente angiogênico associado à fibrogênese queloidiana. Neste aspecto, não foram identificados estudos que tenham avaliado as diferenças histológicas da vascularização das cicatrizes queloidianas entre os diferentes gêneros; esta análise sugere que, se as características vasculares nesta doença diferem entre os sexos, os tratamentos que tenham como alvo a angiogênese ou a perfusão destas lesões, poderão exigir adaptações específicas para cada sexo.

Quanto ao infiltrado inflamatório, à semelhança de outros parâmetros analisados, não foram observadas diferenças significativas em relação à idade, gênero, etnia/raça ou tempo de evolução da lesão; não obstante, houve diferença significativa entre os grupos clínicos, com predomínio de escores indicativos de aumento do infiltrado inflamatório no grupo queloide, o que reforça a participação de mecanismos inflamatórios persistentes na lesão queloidiana, contribuindo para a manutenção da fibrose. A presença de infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear, localizado nas regiões perivasculares e periféricas da lesão queloidiana difere de alguns relatos da literatura, que apontam a presença de linfócitos em quantidade variável, enquanto ocorre aumento de mastócitos e macrófagos nessas lesões [4,14,163].

Ainda, na análise do escore das alterações epidérmicas da coorte avaliada, foram encontrados hiperplasia, aplanamento das cristas interpapilares e alterações nos anexos cutâneos, aspectos frequentemente associados à tensão mecânica local e à presença de fibrose dérmica subjacente. Os achados significativos entre os grupos, de predomínio de escores elevados, com hiperplasia epidérmica discreta a moderada, aplanamento das cristas interpapilares e redução ou ausência de anexos cutâneos nas áreas de fibrose densa do grupo quelóide, deflagraram o impacto do remodelamento dérmico sobre a arquitetura epidérmica.

Os maiores escores, atingidos para vascularização e alterações epidérmicas, indicam um processo de remodelamento tecidual característico das lesões queloidianas, marcado por intensa deposição de MEC e reorganização vascular e epidérmica associadas à fibrose dérmica. Uma vez que nossas amostras foram coletadas da periferia das cicatrizes queloidianas, os resultados obtidos em relação à vascularização corroboram estudos prévios, que indicam maior angiogênese nessas regiões dos queloides [24,94,168,169]. Contudo, não há consenso na literatura, que aponta que a vascularização nessas lesões é variável, podendo estar aumentada ou diminuída [4,85] possivelmente, como fruto do estágio de remodelamento ou da região da lesão avaliada nesses estudos. Alguns autores que evidenciaram aumento de vasos em pacientes portadores de queloides, também apontaram aumento da oclusão capilar e dos marcadores endoteliais endotelina e HIF-1 α [85]. O aumento da espessura e o achatamento epidérmico, encontrados em nosso estudo, corroboram com o relatado por outros autores [4,78,82]. Em síntese, a análise histológica de nossas amostras apontou variação, desde lesões queloidianas de padrão linear, com pequenas alterações histológicas diferenciando-as da pele normal, passando por lesões classificadas como de padrão misto, nas quais identificou-se alternância entre regiões de colágeno denso e áreas menos compactas com células mesenquimais fusocelulares e pouca vascularização, até lesões com padrão nodular, com grandes agregados concêntricos de fibras colágenas hialinizadas, delimitados por zonas de transição com maior celularidade e vasos de pequeno calibre, sugerindo remodelamento tecidual ativo.

A integração dos escores histológicos reforça a existência desses estágios morfológicos, relacionando o espessamento do colágeno, a hialinização, a vascularização, a inflamação e as alterações epidérmicas com a maturação e progressão fibrosa do quelóide. Ou seja, escores elevados de KHS coincidem com maior espessura e densidade de colágeno hialinizado, vascularização aumentada e infiltrado inflamatório, evidenciando um fenótipo ativo. Ao contrário, os escores mais baixos, com fibras finas e organização linear, predominaram nas amostras controle, confirmando a patologia progressiva e distintiva do quelóide. Esses achados indicam que o escore KHS não apenas destaca diferenças morfológicas, mas também expressa diferentes estados funcionais na regulação e síntese das fibras colágenas, refletindo a complexa dinâmica da fibrogênese queloidiana. Ainda, a ausência de associação significativa entre idade do paciente ou tempo de existência da lesão e os escores histológicos, sugere que a progressão do quelóide pode estar possivelmente mais ligada a mecanismos moleculares intrínsecos do que de fatores temporais isolados.

Além da avaliação histológica, a análise quantitativa da expressão de colágeno e de marcadores moleculares na coorte estudada, permitiu caracterizar o perfil da MEC e os possíveis mecanismos de remodelamento no tecido queloidiano. Os tipos de colágeno I, III e V, imunomarcados, foram avaliados nos compartimentos dérmicos, papilar e reticular, em ambos os grupos do estudo. Esta análise revelou diferenças significativas para o colágeno dos tipos III e V papilar, e colágeno tipo V reticular entre os grupos. O Col III apresentou maior expressão que Col I e Col V na derme papilar, sugerindo uma perpetuação do remodelamento matricial, com aumento e persistência do colágeno tipo III, mais imaturo. No entanto, é de fundamental importância, neste aspecto, considerar que a ausência de diferenças significativas entre os grupos do estudo para o colágeno dos tipos I papilar, I reticular e III reticular não indica, obrigatoriamente, que estes não estejam expressos de modo relevante nas amostras queloidianas. Ocorre que, em estágios mais acentuados da doença, esses tipos de colágeno estão presentes no tecido queloidiano sob a forma hialinizada, sobretudo na derme reticular; nesses casos, mesmo presentes em quantidades consideráveis, o aumento das ligações cruzadas nas moléculas de colágeno pode prejudicar o

reconhecimento de seus epítomos (menor porção de um antígeno que é reconhecida por um anticorpo), tornando-os menos acessíveis para a imunomarcagem.

Para dirimir possíveis dúvidas e incongruências nos resultados do presente estudo, conforme relatado na avaliação histológica das amostras, realizou-se coloração destas por tricrômico de Masson. Esta coloração, que utiliza, como um dos componentes, o azul de anilina ou verde de luz, promove a coloração azul intensa das fibras hialinizadas de colágeno, por razões físico-químicas (predomínio de cargas negativas na matriz colágena densificada, perda de proteínas citoplasmáticas ou matriz amorfa e maior densidade óptica e afinidade por corantes ácidos), identificando, assim, a presença de fibras de colágeno total em nossas amostras [170–172]. Neste sentido, alguns autores corroboram a ocorrência do aumento de fibras desorganizadas de ambos os tipos de colágeno I e III, na fase de remodelamento cicatricial dessas lesões, tanto pela deposição excessiva de colágeno tipo I, quanto pela não substituição do colágeno III, pelo tipo I [8,99]; outros, apontam a presença de fibrilas mais finas, abundantes, predominantemente de colágeno tipo III, mais imaturo, entremeadas por algumas regiões de colágeno hialinizado [98], o que reforça a presença de colágeno do tipo I nessas áreas, de difícil marcação, pelos motivos anteriormente explanados. As fibrilas imaturas formadas neste processo, segundo Zhou et al., 2021, ocorreriam, em parte, pelo incremento da produção de proteoglicanos hidrofílicos, que aumentam o conteúdo hídrico nessas cicatrizes, contribuindo para a relatada alteração molecular do colágeno [19]. No presente estudo, também, demonstramos que a diferença de expressão de colágeno entre a derme papilar e reticular foi mais evidente para o Col V, com maior deposição na região papilar. Neste contexto, Hasebe et al., 2018, em seu estudo em pele sadia, já haviam demonstrado expressão significativamente maior do Col V na derme papilar, cerca de 184µm abaixo da membrana basal, enquanto os tipos de colágeno I e III se apresentaram uniformemente distribuídos na derme [42]. Zhou et al., 2021, também demonstraram aumento na expressão de Col V e lumican, ambos conhecidos por interferirem na montagem das fibrilas de colágeno, em indivíduos portadores de cicatrizes queloidianas, por meio de análise imunohistoquímica, em estudo com número

de participantes semelhante ao presente estudo; no entanto, esses autores compararam sítios cutâneos distintos (intralesional e extralesional) em amostras de pele de cada paciente portador da alteração queloidiana, e tal análise não levou em consideração os diferentes compartimentos dérmicos [19]. Mak et al., 2016, sugeriram que, uma vez que o Col V regula o diâmetro das fibrilas heterotípicas de Col I/V, à medida que a proporção entre Col V e Col I aumenta, o diâmetro destas fibrilas heterotípicas Col I/V diminui; neste aspecto, nosso estudo sugere que, o Col V não esteja desempenhando a sua função fisiológica de regulação do diâmetro das fibrilas e agente nucleador da fibrilogênese, uma vez que as fibras constituídas pelo colágeno dos tipos I e V, neste caso, resultam em fibras grossas, aparentemente com inibição desta regulação.

Além da regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas, alguns autores sugerem que o Col V atua na inibição da diferenciação de fibroblastos, por meio da manutenção das células-tronco dérmicas em estágio indiferenciado na derme papilar (Hasebe et al., 2018); outros, ainda, relatam possível contribuição deste colágeno na diferenciação da epiderme. Roulet et al., 2006, ao estudar o desenvolvimento embrionário de ratos, verificaram sinais da cadeia Pro- $\alpha 1(V)$ presente unicamente nas células achatadas ectodérmicas, com 10,5 dias após a concepção, enquanto que com 12,5 dias, época em que essas células se tornam cuboidais, o mesmo sinal passou a ser detectado em fibroblastos dérmicos; à medida que ocorreu o desenvolvimento embrionário, neste estudo, as cadeias $\alpha 1(V)$ passaram a ser mormente encontradas na derme papilar, tendo decaído ao nascimento [77]. Corroborando o papel deste colágeno na formação dos tecidos conjuntivos, Kihara et al., 2008, mostraram, em seu estudo com administração de Col V exógeno em cultura de fibroblastos em vários estágios do desenvolvimento (fetal, neonatal e adulto), que este colágeno forma fibrilas que se acumulam nos espaços intercelulares, atuando como um material de adesão entre essas células, com formação de conglomerados celulares; este fenômeno é comandado pelo movimento celular e pelas propriedades de aderência das fibrilas de Col V, que estabelece essas conexões celulares. Esse padrão reforça o importante papel do Col V na organização tecidual e nas interações intercelulares, em especial nos diferentes estágios do desenvolvimento, e durante o processo de cicatrização [72].

Além da doença queloidiana, o colágeno dos tipos I, III e V desempenham papel fundamental em outras condições patológicas do corpo humano, destacando a importância de investigá-los de modo mais abrangente.

A proporção entre o colágeno dos tipos I e III configura um eixo central de regulação da homeostase da MEC, e seu desbalanço está diretamente envolvido em processos patológicos que incluem fibrose, remodelação tumoral, desordens cutâneas e alterações mecânicas dos tecidos [55]. Em doenças fibróticas sistêmicas, como a esclerose sistêmica e condições escleroderma-símbles, observa-se acúmulo exacerbado desses tipos de colágeno, especialmente do tipo I, promovendo rigidez e perda de função [173,174]. Tanto o colágeno I quanto o III também se elevam em quadros de fibrose cardíaca, pulmonar, renal e hepática, sendo o colágeno III um biomarcador relevante do grau de fibrose [58,175,176]. Em tecidos cutâneos, alterações nesta razão modulam intensamente os processos cicatriciais: em hanseníase, por exemplo, há redução progressiva de colágeno I, com aumento relativo de colágeno III [177], enquanto em feridas crônicas diabéticas, a hiporregulação do tipo I e hiperregulação do tipo III contribuem para cicatrização deficiente e rigidez exacerbada da matriz [62].

Como mencionado anteriormente, o Col V exerce papel fundamental na organização da MEC, atuando como regulador central da fibrillogênese e da interação entre os tipos de colágeno e macromoléculas estruturais, o que condiciona propriedades mecânicas teciduais, adesão e funções celulares [73]. A partir dessa função matricial essencial, alterações quantitativas ou qualitativas do Col V estão implicadas em diversas doenças cutâneas, fibróticas e neoplásicas [37,73,77]. Nas doenças hereditárias do tecido conjuntivo, especialmente na Síndrome de Ehlers–Danlos clássica, mutações nos genes *COL5A1* ou *COL5A2* prejudicam a fibrillogênese do Col V, resultando em pele macia, distensível e frágil, cicatrização anômala, hiper mobilidade articular e fragilidade generalizada da MEC; em alguns casos observam-se também alterações da transparência corneana [73,77,178].

Em relação às doenças cutâneas adquiridas, o Col V encontra-se alterado especialmente em condições fibróticas. Na esclerodermia, há remodelamento anômalo da MEC, caracterizado por espessamento e distorção das fibrilas de

Col V, vinculadas a alterações de sua glicosilação e formação de agregados densos [73]. Durante o processo de cicatrização, o Col V é intensamente expresso no tecido de granulação, aumentando a proporção Col V/Col I quando comparado à pele íntegra, indicando participação na maturação da matriz e na modulação da resposta fibroblástica [73]. A literatura também aponta que o aumento do Col V dérmico pode favorecer interações anômalas entre epiderme e derme, contribuindo para o desenvolvimento e progressão de câncer de pele, achado igualmente documentado no carcinoma mamário e em focos neoplásicos hepáticos [73].

O envolvimento do Col V em processos tumorais é amplo e biologicamente relevante. A cadeia $\alpha 2(V)$ desempenha funções na regulação imunológica, angiogênese, invasão e metástase, estando aumentada em neoplasias como câncer colorretal, de bexiga, próstata, estômago e pulmão, onde se relaciona à progressão tumoral e ao prognóstico [73]. No adenocarcinoma de pulmão, Gaozhong et al., 2025, demonstraram que a cadeia $\alpha 2(V)$ está aumentada e se correlaciona com a polarização de macrófagos M2, contribuindo para a manutenção de um microambiente tumoral anti-inflamatório e permissivo à disseminação celular [47]. No câncer gástrico, o gene *COL5A1* apresenta alta expressão e forte correlação com múltiplos tipos celulares do microambiente imune, sendo proposto como marcador prognóstico e fator de risco associado ao grau de diferenciação tumoral [179]. Em glioblastoma multiforme, o *COL5A1* foi implicado na regulação da anoikis (morte celular dependente de ancoragem ou apoptose por perda de adesão) e na promoção da malignidade tumoral via Wnt/ β -catenina, contribuindo para pior desfecho clínico [179]. No câncer pancreático, o Col V influencia a migração, viabilidade e adesão celular, favorecendo o potencial metastático [62]. Esses dados reforçam que o Col V não é apenas um componente estrutural, mas um modulador ativo do microambiente tumoral.

Nos processos fibróticos, o Col V atua como mediador central de remodelação tecidual. Na fibrose pulmonar intersticial, tanto na fibrose pulmonar idiopática (FPI) quanto na esclerose sistêmica (ES), o Col V encontra-se superexpresso nos septos alveolares e paredes arteriais, refletindo a gravidade da fibrose e podendo induzir apoptose endotelial na ES, além de desencadear

autoimunidade na FPI, por meio de autoanticorpos anti-Col V [73]. A autoimunidade relacionada ao Col V tem sido observada também em lúpus eritematoso sistêmico e vasculites, bem como em receptores de transplante pulmonar, nos quais células T específicas para Col V estão associadas à rejeição [69]. Alterações fibróticas mediadas pelo Col V estendem-se a múltiplos órgãos: no coração, sua deficiência pode aumentar a área cicatricial após lesões miocárdicas, enquanto sua elevação correlaciona-se com maior número de fibroblastos e níveis de TGF- β 1 na fibrilação atrial crônica [62]. Na aterosclerose, o Col V acumula-se de maneira proeminente na íntima aórtica, formando placas fibrosas mais densas que as associadas a colágeno dos tipos I/III, acompanhadas por proliferação de células musculares lisas e aumento de TGF- β 1; além disso, a formação de homotrímeros α 1(V)₃ cria neoepítomos capazes de desencadear respostas autoimunes anti-Col V [73]. No rim, o acúmulo intersticial de Col V se associa à fibrose túbulo-intersticial mediada por TGF- β 1, cuja intensidade se correlaciona com a gravidade da lesão. No tecido adiposo de indivíduos com obesidade e resistência insulínica, a deposição de Col V em áreas fibróticas e vasos de maior calibre prejudica a expansão adipocitária e contribui para rigidez tecidual e disfunção metabólica [73]. No fígado, o Col V, já presente na MEC fisiológica, apresenta acúmulo acentuado nas regiões perisinusoidais e pericelulares em quadros de cirrose e cirrose alcoólica [73]. Ainda, alterações persistentes da taxa de renovação desse colágeno foram associadas à patogênese das hérnias inguinais, sugerindo seu papel na fragilidade da parede abdominal [180].

Em conjunto, esses achados demonstram que o Col V desempenha papel multifacetado e decisivo na biologia tecidual: quando reduzido ou estruturalmente anômalo, contribui para fragilidade cutânea e disfunções hereditárias da MEC; quando aumentado, participa da manutenção e progressão de fibroses e remodelação tumoral; e quando alvo de resposta imune, favorece o estabelecimento de processos autoimunes e inflamatórios crônicos. A soma dessas evidências reforça a relevância do Col V como elemento estruturante, imunomodulador e dinamicamente envolvido em doenças cutâneas, tumorais e fibróticas.

Quanto aos mecanismos epigenéticos, nossos resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, quelóide e controle, em relação aos microRNAs miR21-5p e miR199a-3p, e os mRNAs dos genes *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* e *COL5A2*.

A análise do tamanho do efeito (r) revelou magnitudes moderadas a grandes para a maioria dos marcadores fibróticos e pró-fibróticos, indicando relevância biológica expressiva das diferenças observadas entre os grupos. Destacam-se o Col V (papilar e reticular) e os microRNAs miR-21 e miR-199, que apresentaram os maiores tamanhos de efeito, corroborando sua participação central nos processos de remodelamento e deposição exacerbada de MEC característicos das lesões queloidianas. Ressalta-se, neste aspecto, que a análise do tamanho do efeito é uma medida estatística que quantifica a magnitude da diferença, associação ou impacto observado em um estudo, independentemente do tamanho da amostra. Ela complementa o valor de p , mostrando o quanto uma intervenção ou diferença é relevante na prática, e não apenas se é estatisticamente significativa. Segundo Cohen, 1988, e referências subsequentes, o coeficiente “ r ” pode ser interpretado do seguinte modo: de 0,10 a 0,29, corresponde a um efeito pequeno, com diferença discreta e baixo impacto prático; de 0,30 a 0,49, corresponde a um efeito moderado, com diferença relevante e impacto médio; $\geq 0,50$, corresponde a um efeito grande, com diferença acentuada e impacto biológico importante [144].

Os microRNAs, 21 e 199 foram os escolhidos, no presente estudo, como alvos para investigação. Isto porque o primeiro, miR-21, de conhecida ação pró-fibrótica, embora amplamente descrito em doenças fibróticas e de outras naturezas, carece de conhecimento específico a respeito de sua ação na modulação do colágeno na MEC queloidiana, sobretudo do Col V. Já, o segundo, miR-199, descrito em várias doenças, sobretudo neoplásicas, com efeito variável segundo o tipo de tumor, apresenta também atuação em doenças fibróticas, incluindo os quelóides, nos quais parece ter papel anti-fibrótico. No entanto, ao contrário do miR-21, o papel do miR-199 nos processos fibróticos, sobretudo nas cicatrizes queloidianas, foi pouco estudado até o momento, sem associação com as alterações morfológicas de cada compartimento dérmico, sendo sua atuação na modulação matricial do quelóide, também, de grande interesse. O miR-21, um

dos microRNAs mais consistentemente expressos em doenças fibróticas, sobretudo o miR-21-5p, sabidamente, condiciona a formação de queloides por meio da ação na proliferação e apoptose de fibroblastos queloidianos e da regulação negativa da proteína Smad7, pela via de sinalização TGF- β /Smad, com ação pró-fibrótica, conforme mencionado [6,21,26,121,122,181]. O aumento da expressão do miR-21-5p nas cicatrizes queloidianas dos pacientes de nossa coorte corrobora seu caráter pró-fibrótico, estando em consonância com o descrito na literatura.

Além dos queloides, dados da literatura apontam aumento dos níveis de miR-21 em processos fibróticos no coração, rins, pulmões, pele e em tumores. No coração, parece atuar na remodelação patológica, com desencadeamento da fibrose; na fibrose pulmonar, o aumento de sua expressão promove a transição epitélio-mesenquimal das células epiteliais pulmonares; encontra-se também aumentado no epitélio tubular renal após lesões de isquemia / reperfusão, com objetivo de evitar a morte celular, podendo acarretar a fibrose renal e estando, nesses casos, aumentado não só nos fibroblastos, mas também em nível sérico; no sistema nervoso central, também apresenta aumento de expressão em situações de lesões traumáticas, no sítio da injúria; ainda, o aumento deste microRNA foi detectado no fígado, após experimentos de fibrose hepática, estando relacionado à fibrose da esclerodermia [122].

Outrossim, Rodrigues et al., 2023, apontaram, em seu estudo com pacientes de dois grupos, o primeiro com doença hepática gordurosa não alcoólica, e o segundo com carcinoma hepatocelular, que o miR-21-5p é um indutor chave no processo de progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica, da simples esteatose até a esteatohepatite não alcólica (NASH), e a carcinogênese associada à esta última [140]. Outro estudo revelou associação do miR-21 e do miR-199 com o desenvolvimento de hipertensão tipo H, relacionada à hiperhomocisteinemia em Cazaques, na China [182]. Ainda, alguns autores mostram que, na epiderme queloidiana, a expressão aumentada do miR-21 promove a proliferação, migração, invasão e redução da apoptose de queratinócitos [111]. Este microRNA propicia a migração celular e a reepitelização das feridas, por meio da ação sobre a TIMP3 (inibidor tecidual de

metaloproteinase 3) e a TIAM1 (invasão e metástase do linfoma de células T1) [116].

Já o miR-199a-3p, altamente expresso nos queloides em nosso estudo, foi mormente descrito, na literatura, para doenças não queloidianas, estando associado ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (DM2) grave e de DM2 associado à doença cardíaca coronariana [125], contribuindo para a sobrevivência tumoral na Síndrome de Sézary [123], inibindo a resposta inflamatória e promovendo autofagia de condrócitos na osteoartrite [127], promovendo estímulo de apoptose em células cancerígenas A549 [123], estando inibido em células de hepatocarcinoma [108], bem como no câncer de mama altamente metastático [123]. Deste modo, sua ação é variável, de acordo com o tipo de doença em que participa. Nos queloides, alguns autores descrevem a atuação do miR-199a-5p, que teria ação anti-fibrótica e estaria menos expresso nesta condição patológica [108,116,139]; a despeito de ter sido estudado em outras condições fibróticas [6,135,136], não foram identificados estudos que apontem o papel do miR 199a-3p nas cicatrizes queloidianas, levando-nos a sugerir, de acordo com nossos resultados de aumento da expressão deste microRNA no grupo queleide, que, nesta doença, o miR-199a-3p tenha papel pró-fibrótico.

Em relação ao aumento significativo da expressão dos marcadores genéticos *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* e *COL5A2* mRNAs, nos pacientes com queleide de nossa coorte, esses achados se relacionam, diretamente, com a expressão proteica aumentada para esses tipos de colágeno. Embora, como já mencionado, este aumento de expressão não tenha sido significativo, na comparação entre grupos, para o colágeno dos tipos I papilar, I reticular e III reticular, o aumento da expressão dos mRNAs de seus respectivos genes codificadores, *COL1A* e *COL3A1*, indicam que o colágeno dos tipos I e III foram sintetizados, corroborando a hipótese de que a imunomarcagem destas proteínas, sobretudo a do colágeno do tipo I, não tenha refletido o real conteúdo proteico presente nos queloides, uma vez que a presença de colágeno hialinizado acarretou prejuízo da exposição e identificação de seus epítomos.

Ao se realizar a integração entre os parâmetros do escore histológico KHS com os marcadores moleculares de nosso estudo, obtivemos que, em

relação à organização das fibras de colágeno, sua correlação com os marcadores de interesse apontou diferença para a presença de Col V papilar e *COL5A2*, com maior expressão desses marcadores em queloides com organização nodular, quando comparada à organização linear. Este achado reflete o importante papel do Col V na patogênese queloidiana, possivelmente relacionado à tentativa, de promover a regulação do diâmetro das fibrilas heterotípicas e o consequente acúmulo de colágeno desorganizado na matriz extracelular do sítio da lesão, sugerindo disfunção deste colágeno nos queloides. Quanto ao escore de espessura das fibras de colágeno, nossos dados mostram aumento significativo de colágeno tipo III reticular, nas amostras classificadas com escore misto em comparação às de fibras finas, sugerindo uma reorganização diferencial dos tipos de colágeno conforme o grau de espessamento fibrilar, possivelmente refletindo fases distintas de remodelamento da matriz dérmica.

Quanto às diferenças significativas encontradas entre o escore de hialinização do colágeno e o colágeno dos tipos I e V papilares, *miR-21*, *COL5A2* e *COL3A1*, tais achados indicam que a hialinização dérmica está intimamente associada à regulação diferencial dos tipos de colágeno fibrilares (I, III e V) e de *miR-21*, sugerindo um padrão ativo de remodelamento molecular durante o processo de maturação e compactação da matriz de colágeno no quelóide. Neste aspecto, acreditamos que o *miR-21*, sabidamente pró-fibrótico, poderia regular, epigeneticamente, a síntese destes tipos de colágeno mais expressos e/ou a função do Col V. O papel do Col V e dos genes *COL5A1* e *COL5A2* na gênese das cicatrizes queloidianas ainda é pouco relatado na literatura, com alguns estudos corroborando o aumento desses marcadores encontrados em nosso estudo [19,183,184]. Além disso, alguns autores apontam que o gene *COL3A1* está orientado em sequência com o gene *COL5A2*, com 22 kb entre eles, e que um estudo filogenético desses dois genes em humanos, baseado nas sequências dos domínios carboxi (C) terminais, indicou que esses, possivelmente, evoluíram de um gene ancestral comum [58], o que pode explicar o aumento de expressão conjunta destes no âmbito patológico dos queloides.

Em relação à correlação entre a celularidade do mesênquima e os marcadores do estudo, destacam-se: as diferenças significantes encontradas

entre o colágeno dos tipos III e V papilares, com maior expressão em pacientes com aumento da celularidade de forma discreta/moderada, comparada à celularidade normal; além desses, há diferença na expressão do Col V reticular, aumentado no grupo com aumento da celularidade de forma discreta/moderada, em comparação aos demais grupos. Estes achados sugerem uma relação direta entre as células mesenquimais fusocelulares, dentre elas os fibroblastos, presentes em quantidade aumentada no tecido conjuntivo queloidiano e sua maior atividade, com aumento da síntese de colágeno fibrilar por estas células. O aumento da celularidade, sobretudo dos fibroblastos residentes do tecido dérmico, nas cicatrizes queloidianas, são corroboradas por diversos estudos [4,6,159,163].

Correlacionando-se a vascularização tecidual com os marcadores moleculares e estruturais avaliados em toda a casuística, as diferenças significativas observadas para a expressão de colágeno tipo I papilar, Col V papilar, miR-21 e miR-199, indicam, em conjunto, que os queloides mais ativos, isto é, que estão em franca fase de remodelamento, apresentam maior deposição de colágeno dos tipos I e V e maior vascularização, processo regulado epigeneticamente por microRNAs pró-fibróticos, como o miR-21. Em relação ao miR-199, conforme já mencionado, possivelmente este microRNA apresenta papel variável de acordo com a doença; em nosso estudo, sugere-se que o miR-199a-3p tenha efeito pró-fibrótico, ao contrário do miR-199a-5p, descrito na literatura como anti-fibrótico [108,116,139]. Em processos cicatriciais fisiológicos, também é descrita a existência de uma relação direta entre as proporções de Col V e de colágeno I, sendo que, nestes casos, o aumento da proporção de Col V condiciona a formação de fibrilas mais finas [77].

Já, a correlação significativa entre o escore de infiltrado inflamatório com a expressão de *COL5A2*, pode indicar processo ativo da doença queloidiana, com expressão do gene codificador da cadeia $\alpha 2$ do Col V, que, sabidamente, se encontra distribuída amplamente nos tecidos, sobretudo na região perivascular. Importante destacar que, na região perivascular, também, são encontradas as células inflamatórias importantes no processo patogênico do quelóide. Neste contexto, o Col V, na pele humana, se apresenta com 2 isoformas: a primeira homotrimérica, constituída por três cadeias $\alpha 1$ idênticas

[$\alpha 1(V)_3$], que ocorre como microfibrilamentos de 5 a 10 nm de diâmetro na derme, e serve como conexão entre o colágeno dos tipos IV e VI na membrana basal epidérmica, auxiliando na estabilização da junção dermoepidérmica, e a segunda, heterotrimérica, constituída por duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ [$\alpha 1(V)_2, \alpha 2(V)$], mais comum e que forma fibrilas heterotípicas com outros tipos de colágeno, em especial com o colágeno I, sendo amplamente distribuída nos tecidos [73,77,79–81].

Em relação às alterações epidérmicas correlacionadas com os marcadores estruturais e moleculares, as diferenças significantes encontradas para os parâmetros Col V papilar, miR-21, miR-199, *COL5A2* e *COL3A1* se alinham com outros parâmetros histológicos já mencionados, apontando que, no quelóide, as modificações epidérmicas seguem em paralelo às alterações dérmicas patológicas, refletindo uma alteração global da arquitetura cutânea nesta doença.

Deste modo, os valores finais do escore histológico queloidiano proposto em nosso estudo, deflagrados pelos resultados de média e de mediana deste, indicaram atividade histológica moderada a acentuada na maioria das amostras, o que pode corroborar a maior parte das descrições histológicas para esta condição, existentes na literatura. Além disso, este escore revelou um padrão progressivo de remodelamento dérmico, com aumento da espessura dérmica, desorganização das fibras colágenas e hialinização. O escore KHS demonstrou correlação entre a organização das fibras de colágeno, sua espessura e hialinização, refletindo diferentes estágios de maturação do quelóide. Quanto à organização das fibras de colágeno, o padrão linear, predominante em pele normal, apresentou fibras finas, paralelas, e matriz frouxa, compatíveis com tecido jovem. Por outro lado, padrões mistos e nodulares mostraram desorganização acentuada, fibras espessas e hialinização, característicos de quelóides maduros, indicando remodelamento progressivo e deposição aberrante de matriz extracelular. Este gradiente morfológico reforça a ideia de que os quelóides não representam uma fase uniforme, mas sim um *continuum* de maturação fibrosa [185]. Quanto à espessura das fibras de colágeno, temos que o predomínio de fibras grossas em lesões maduras, correlacionado com tendência de maior tempo de evolução/existência da doença, sugere que o

espessamento fibrilar é marcador de progressão e consolidação da fibrose. A associação com maior expressão de colágeno III em escores mistos indica um remodelamento ativo e dinâmico da matriz extracelular, antes do acúmulo final de colágeno dos tipos I e V. Quanto à hialinização, sua presença, de moderada à densa nas lesões queloidianas, e ausente nos controles, confirma que este é um marcador de fibrose avançada e maturação da matriz. A correlação positiva com Col I, Col V, *COL5A2* e miR-21 sugere que a hialinização representa não apenas acúmulo passivo de colágeno, mas um processo ativo de regulação de fibroblastos pelos microRNAs pró-fibróticos.

Ao correlacionarmos todas as variáveis estudadas nos pacientes portadores de cicatrizes queloidianas de nossa coorte, a associação moderada a forte, encontrada entre colágeno I, III e V nos dois compartimentos dérmicos (papilar e reticular) e, ainda, colágeno I papilar e colágeno V papilar, sugere que o aumento na expressão ou deposição de um tipo de colágeno estaria associado ao aumento dos outros, o que indica sincronismo no processo de remodelamento da MEC. Já, a correlação forte entre miR-21-5p e miR-199a-3p, é compatível com o papel conhecido desses microRNAs na regulação epigenética de vias de fibrogênese. A correlação moderada entre o miR-199a-3p e a expressão de colágeno I papilar, pode sugerir participação deste microRNA na expressão aumentada do colágeno tipo I, desempenhando, neste caso, um papel pró-fibrótico. Por fim, as associações muito fortes encontradas entre mRNAs dos genes codificadores de colágeno (*COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1* e *COL5A2*), indicam coexpressão gênica relacionada ao processo de deposição de MEC e fibrose, o que também reforça que a regulação desses genes ocorre de forma coordenada. Esses achados sugerem um mecanismo integrado de regulação da fibrogênese, possivelmente mediado por microRNAs e genes de colágeno, refletido, também, nas características histológicas dos diferentes compartimentos dérmicos. Relatos da literatura se alinham com a maior parte de nossos achados, uma vez que apontam alguns genes que apresentam regulação positiva em queloides, incluindo os codificadores das cadeias $\alpha 1(V)$ e $\alpha 2(V)$ do Col V (*COLVA1* e *COLVA2*), cadeia pró- $\alpha 1(III)$ do colágeno tipo III, e cadeia pró- $\alpha 2(I)$ do colágeno tipo I [21,186].

Em síntese, os resultados obtidos em nosso estudo, que, compilados, demonstraram a existência de um gradiente de remodelamento dérmico, representando distintos estágios de maturação das lesões queloidianas, apresentam implicações clínicas relevantes, ao possibilitar a estratificação dos queloides conforme seu estado biológico, a identificação de biomarcadores com potencial prognóstico ou indicativo de atividade lesional, bem como fornecer subsídios para o desenvolvimento de terapias direcionadas e mais eficazes para o tratamento desta condição, estética e funcionalmente debilitante para os indivíduos acometidos.

6. CONCLUSÕES

- 1) A fibrogênese no quelóide é um processo contínuo de maturação tecidual, no qual alterações estruturais, celulares e moleculares contribuem para a persistência e progressão da lesão.
- 2) Componentes específicos da matriz e fatores epigenéticos emergem como reguladores-chave do fenótipo fibrótico, com potencial valor como biomarcadores e alvos terapêuticos: expressão de Col I, Col V, COL5A2 e miR-21-5p associam-se com fibras espessas e hialinização densa, enquanto o Col III predomina em matriz jovem e flexível.
- 3) A integração entre parâmetros morfológicos e moleculares identificou um gradiente de remodelamento da matriz, do padrão linear (inicial) ao nodular (maduro), demonstrando que o quelóide é uma lesão heterogênea e dinâmica.
- 4) Os escores histológicos são indicadores do estado funcional e da atividade queloidiana, e reforçam a ocorrência e graus de remodelamento nos diferentes compartimentos dérmicos.
- 5) A evolução do remodelamento dérmico do quelóide não depende de idade, gênero ou etnia/raça, sugerindo que mecanismos moleculares intrínsecos regulam a progressão das lesões. Em conjunto, os achados fornecem bases para abordagens diagnósticas e terapêuticas mais direcionadas e individualizadas no manejo desta doença.

REFERÊNCIAS

- [1] Tsai C-H, Ogawa R. **Keloid research: current status and future directions.** Scars Burn Heal 2019;5:205951311986865. <https://doi.org/10.1177/2059513119868659>.
- [2] Lee HJ, Jang YJ. **Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids.** Int J Mol Sci 2018;19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030711>.
- [3] Prox J, Arnold P, Becker-Pauly C. **Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease.** Matrix Biology 2015. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.010>.
- [4] Limandjaja GC, Niessen FB, Scheper RJ, Gibbs S. **The Keloid Disorder: Heterogeneity, Histopathology, Mechanisms and Models.** Front Cell Dev Biol 2020;8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00360>.
- [5] Chen J, Zhuo S, Jiang X, Zhu X, Zheng L, Xie S, et al. **Multiphoton microscopy study of the morphological and quantity changes of collagen and elastic fiber components in keloid disease.** J Biomed Opt 2011. <https://doi.org/10.1117/1.3569617>.
- [6] Liu Y, Chen X, Fischer KS, Fu S, Yuan L, Hu X. **Keloids revisited: Current concepts in treatment and differential diagnosis.** Cancer Lett 2025;625. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217802>.
- [7] Shan M, Wang Y. **Viewing keloids within the immune microenvironment.** Am J Transl Res 2022;14:718–27.
- [8] Kim HJ, Kim YH. **Comprehensive Insights into Keloid Pathogenesis and Advanced Therapeutic Strategies.** Int J Mol Sci 2024;25. <https://doi.org/10.3390/IJMS25168776>.

- [9] Liu Y, Xiong X, Cao N, Zhao Y. **Diagnosis and Treatment of Keloid: Method Summary and Effect Evaluation.** Clin Cosmet Investig Dermatol 2023;16:3775–83. <https://doi.org/10.2147/CCID.S446018>.
- [10] Arbi S, Eksteen EC, Oberholzer HM, Taute H, Bester MJ. **Premature Collagen Fibril Formation, Fibroblast-Mast Cell Interactions and Mast Cell-Mediated Phagocytosis of Collagen in Keloids.** Ultrastruct Pathol 2015;39:95–103. <https://doi.org/10.3109/01913123.2014.981326>.
- [11] Isaac C. **Estudo in vitro da ação de pentoxifilina em fibroblastos oriundos de cicatrizes hipertróficas pós-queimadura e de pele não-cicatricial.** Phd. Universidade de São Paulo, 2007.
- [12] Lee JYY, Yang CC, Chao SC, Wong TW. **Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar.** Am J Dermatopathol 2004;26:379–84. <https://doi.org/10.1097/00000372-200410000-00006>.
- [13] James AJ, Torres-Guzman RA, Chaker SC, Sigel ME, Perdakis G, Supp DM, et al. **Global insights into keloid formation: An international systematic review of regional genetic risk factors and commonalities.** Wound Repair and Regeneration 2024;32:746–57. <https://doi.org/10.1111/wrr.13203>.
- [14] Lee CC, Tsai CH, Chen CH, Yeh YC, Chung WH, Chen CB. **An updated review of the immunological mechanisms of keloid scars.** Front Immunol 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1117630>.
- [15] Damanik VI, Putra IB, Ginting O. **Correlation between Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels with Keloid Severity.** Open Access Maced J Med Sci 2019;7. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.022>.
- [16] Lee DE, Trowbridge RM, Ayoub NT, Agrawal DK. **High-mobility group box protein-1, matrix metalloproteinases, and Vitamin D in keloids and hypertrophic scars.** Plast Reconstr Surg Glob Open 2015;3. <https://doi.org/10.1097/GOX.0000000000000391>.

- [17] Armour A, Scott PG, Tredget EE. **Cellular and molecular pathology of HTS: Basis for treatment.** Wound Repair and Regeneration 2007;15:S6–17. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00219.x>.
- [18] Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. **Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment.** Matrix Biology 2016;51:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.013>.
- [19] Zhou B, Tu T, Gao Z, Wu X, Wang W, Liu W. **Impaired collagen fibril assembly in keloids with enhanced expression of lumican and collagen V.** Arch Biochem Biophys 2021;697. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108676>.
- [20] Cardenas D, Cinclair T, Dogaroiu A, Hinson C, Sink M, Bruce B, et al. **Wound Coverage, Adjuvant Treatments, and Surgical Outcomes for Major Keloid Scars: A Systematic Review and Meta-Analysis.** Aesthet Surg J Open Forum 2024;7. <https://doi.org/10.1093/ASJOF/OJAE129>.
- [21] Liu F, Li T, Zhan X. **Silencing circular RNAPTNP12 promoted the growth of keloid fibroblasts by activating Wnt signaling pathway via targeting microRNA-21-5p.** Bioengineered 2022;13:3503–15. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2029108>.
- [22] Kouwenberg CAE, Bijlard E, Timman R, Hovius SER, Busschbach JJV, Mureau MAM. **Emotional Quality of Life Is Severely Affected by Keloid Disease Pain and Itch Are the Main Determinants of Burden.** Plast Reconstr Surg 2015;136:150–1.
- [23] Sitaniya S, Subramani D, Jadhav A, Sharma YK, Deora MS, Gupta A. **Quality-of-life of people with keloids and its correlation with clinical severity and demographic profiles.** Wound Repair Regen 2022;30:409–16. <https://doi.org/10.1111/WRR.13015>.
- [24] Latoni DI, McDaniel DC, Tsao H, Tsao SS. **Update on the Pathogenesis of Keloid Formation.** JID Innov 2024;4. <https://doi.org/10.1016/j.xjidi.2024.100299>.

- [25] Suttho D, Mankhetkorn S, Binda D, Pazart L, Humbert P, Rolin G. **3D modeling of keloid scars in vitro by cell and tissue engineering.** Arch Dermatol Res 2017;309:55–62. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1703-2>.
- [26] Grafanaki K, Maniatis A, Sotiropoulou V, Pasmazi E, Tzouvelekis A. **Fibrotic Disease of the Skin and Lung: Shared Pathways, Environmental Drivers, and Therapeutic Opportunities in a Changing Climate.** Int J Mol Sci 2025;26. <https://doi.org/10.3390/IJMS26178394>.
- [27] Morelli Coppola M, Salzillo R, Segreto F, Persichetti P. **Triamcinolone acetonide intralesional injection for the treatment of keloid scars: patient selection and perspectives.** Clin Cosmet Investig Dermatol 2018. <https://doi.org/10.2147/CCID.S133672>.
- [28] Mari W, Alsabri SG, Tabal N, Younes S, Sherif A, Simman R. **Novel Insights on Understanding of Keloid Scar: Article Review.** Journal of the American College of Clinical Wound Specialists 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jccw.2016.10.001>.
- [29] Hammer GD, McPhee SJ. **Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine.** 8th ed. 1991.
- [30] Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. **The dynamic anatomy and patterning of skin.** Exp Dermatol 2016. <https://doi.org/10.1111/exd.12832>.
- [31] Mescher AL. **Junqueira's Basic Histology Text and Atlas.** 16th ed. 2021.
- [32] Fredman G, Skov L, Mann M, Dyring-Andersen B. **Towards Precision Dermatology: Emerging Role of Proteomic Analysis of the Skin.** Dermatology 2022;238:185–94. <https://doi.org/10.1159/000516764>.

- [33] Losquadro WD. **Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer.** Facial Plast Surg Clin North Am 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>.
- [34] Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. **The applied anatomy of human skin: A model for regeneration.** Wound Medicine 2020;28. <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>.
- [35] Tortora GJ, Derrickson B. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.** 10th ed. 2017.
- [36] Ganier C, Rognoni E, Goss G, Lynch M, Watt FM. **Fibroblast Heterogeneity in Healthy and Wounded Skin.** Cold Spring Harb Perspect Biol 2022;a041238. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041238>.
- [37] Labarrade F, Garcia I, Imbert I. **Collagen type V alpha 3 chain is involved in human skin basement membrane physiology and MMP-9 regulation.** Int J Cosmet Sci 2025;47:743–51. <https://doi.org/10.1111/ICS.13062>.
- [38] Ovalle WK, Nahirney PC. **NETTER BASES DA HISTOLOGIA** 2a EDIÇÃO. 2014.
- [39] Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, García Bustos V, Benavent Seguí J, Ferrández Izquierdo A, et al. **Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study.** J Anat 2014;225:98–108. <https://doi.org/10.1111/joa.12186>.
- [40] Smith LT, Holbrook KA, Madri JA. **Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin.** Am J Anat 1986;175:507–21. <https://doi.org/10.1002/AJA.1001750409>.
- [41] Gardeazabal L, Izeta A. **Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing.** Exp Dermatol 2024;33. <https://doi.org/10.1111/EXD.15052>.

- [42] Hasebe Y, Hasegawa S, Date Y, Nakata S, Yagami A, Iwata Y, et al. **Localization of collagen type 5 in the papillary dermis and its role in maintaining stem cell functions.** J Dermatol Sci 2018;89:205–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017>.

- [43] Biggs RM, Bradshaw AD. **Organ fibrosis: beyond collagen I expression. Fibroblast phenotype and basement membrane proteins.** Am J Physiol Cell Physiol 2025;328:C2023–31. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00077.2025>.

- [44] Naba A. **Mechanisms of assembly and remodelling of the extracellular matrix.** Nat Rev Mol Cell Biol 2024;25:865–85. <https://doi.org/10.1038/S41580-024-00767-3>.

- [45] Theocharis AD, Manou D, Karamanos NK. **The extracellular matrix as a multitasking player in disease.** FEBS J 2019;286:2830–69. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14818>.

- [46] Singh D, Rai V, K Agrawal D. **Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration.** Cardiol Cardiovasc Med 2023;7. <https://doi.org/10.26502/FCCM.92920302>.

- [47] Sun G, Wang Y, Ni K, Shen J, Liu D, Wang H. **COL5A2-mediated endoplasmic reticulum stress promotes macrophage M2 polarization in lung adenocarcinoma.** Cell Stress Chaperones 2025;30:100081. <https://doi.org/10.1016/J.CSTRES.2025.100081>.

- [48] Ricard-Blum S. **The Collagen Family.** Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3:1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.

- [49] Gelse K, Pöschl E, Aigner T. **Collagens - Structure, function, and biosynthesis.** Adv Drug Deliv Rev 2003;55:1531–46. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.

- [50] S. Ricard-Blum BDMR. **Unconventional collagens : types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI, and XIX** | Semantic Scholar 2000. <https://www.semanticscholar.org/paper/Unconventional-collagens-%3A-types-VI%2C-VII%2C-VIII%2C-IX%2C-Ricard-Blum-Dublet/8965ed43d25904e22a981a165a0f46302ea7025c> (accessed December 9, 2025).

- [51] Gordon MK, Hahn RA. **Collagens**. Cell Tissue Res 2010;339:247–57. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4>.

- [52] Shoulders MD, Raines RT. **Collagen structure and stability**. Annu Rev Biochem 2009;78:929–58. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.77.032207.120833>.

- [53] G. N. Ramachandran AHR. **Biochemistry of Collagen**. Boston, MA: Springer US; 1976. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4602-0>.

- [54] Sicari BM, Londono R, Dziki JL, Badylak SF. **Extracellular matrix as a bioscaffold for tissue engineering**. Tissue Engineering, Third Edition 2023:137–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824459-3.00005-6>.

- [55] Kanniyappan H, Chathurika Rathnayake RA, Osamor J, Islam M, Wang RR. **The role of collagen and collagen I/III ratio in pathological conditions: insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches**. Front Bioeng Biotechnol 2025;13. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2025.1679625/PDF>.

- [56] Shahrajabian MH, Sun W. **Mechanism of Action of Collagen and Epidermal Growth Factor: A Review on Theory and Research Methods**. Mini Rev Med Chem 2024;24:453–77. <https://doi.org/10.2174/1389557523666230816090054>.

- [57] Onursal C, Dick E, Angelidis I, Schiller HB, Staab-Weijnitz CA. **Collagen Biosynthesis, Processing, and Maturation in Lung Ageing**. Front Med (Lausanne) 2021;8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.593874>.

- [58] Kuivaniemi H, Tromp G. **Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases.** *Gene* 2019;707:151–71. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>.
- [59] Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. **The Biosynthesis of Collagen and Its Disorders.** *New England Journal of Medicine* 1979;301:77–85. <https://doi.org/10.1056/NEJM197907123010204;SUBPAGE:STRING:FULL>.
- [60] Bruce Alberts AJJLMRKR and PW. **Molecular Biology of the Cell - NCBI Bookshelf 2002.** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/> (accessed December 9, 2025).
- [61] Wang M, Monticone RE, McGraw KR. **Proinflammation, profibrosis, and arterial aging.** *Aging Med (Milton)* 2020;3:159–68. <https://doi.org/10.1002/AGM2.12099>.
- [62] Sun W, Shahrajabian MH, Ma K, Wang S. **Advances in Molecular Function and Recombinant Expression of Human Collagen.** *Pharmaceuticals (Basel)* 2025;18. <https://doi.org/10.3390/PH18030430>.
- [63] Bruckner P. **Suprastructures of extracellular matrices: Paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules.** *Cell Tissue Res* 2010;339:7–18. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0864-0>.
- [64] Nizamoglu M, Burgess JK. **The Multi-Faceted Extracellular Matrix: Unlocking Its Secrets for Understanding the Perpetuation of Lung Fibrosis.** *Curr Tissue Microenviron Rep* 2021;2:53–71. <https://doi.org/10.1007/S43152-021-00031-2>.
- [65] Kołakowski A, Dziemitko S, Chmielecka A, Żywno H, Bzdęga W, Charytoniuk T, et al. **Molecular Advances in MAFLD-A Link between Sphingolipids and Extracellular Matrix in Development and Progression to Fibrosis.** *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911380>.

- [66] Naomi R, Ridzuan PM, Bahari H. **Current Insights into Collagen Type I. Polymers (Basel)** 2021;13. <https://doi.org/10.3390/POLYM13162642>.

- [67] Verdonk SJE, Storoni S, Micha D, van den Aardweg JG, Versacci P, Celli L, et al. **Is Osteogenesis Imperfecta Associated with Cardiovascular Abnormalities? A Systematic Review of the Literature.** *Calcif Tissue Int* 2024;114:210–21. <https://doi.org/10.1007/S00223-023-01171-3>.

- [68] Hasselbalch HC, Junker P, Skov V, Kjær L, Knudsen TA, Larsen MK, et al. **Revisiting Circulating Extracellular Matrix Fragments as Disease Markers in Myelofibrosis and Related Neoplasms.** *Cancers (Basel)* 2023;15. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15174323>.

- [69] Carla de Oliveira C, Rosolia Teodoro W, Paula Pereira Velosa A, Hajime Yoshinari N. **Autoimmunity and Collagen V (*)**. *Rev Bras Reumatol* 2006;46:194–8.

- [70] Theocharidis G, Drymoussi Z, Kao AP, Barber AH, Lee DA, Braun KM, et al. **Type VI collagen regulates dermal matrix assembly and fibroblast motility.** *Journal of Investigative Dermatology* 2016;136:74–83. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.352>.

- [71] Malone JP, Alvares K, Veis A. **Structure and assembly of the heterotrimeric and homotrimeric C-propeptides of type I collagen: significance of the alpha2(I) chain.** *Biochemistry* 2005;44:15269–79. <https://doi.org/10.1021/BI0508338>.

- [72] Kihara T, Imamura Y, Takemura Y, Mizuno K, Adachi E, Hayashi T. **Intercellular accumulation of type V collagen fibrils in accordance with cell aggregation.** *J Biochem* 2008;144:625–33. <https://doi.org/10.1093/JB/MVN109>.

- [73] Mak KM, Png CYM, Lee DJ. **Type V Collagen in Health, Disease, and Fibrosis.** *Anatomical Record* 2016. <https://doi.org/10.1002/ar.23330>.

- [74] Hans Peter Bächinger KMJAVSPB. **Collagen formation and structure - Oregon Health & Science University 2010.**
<https://ohsu.elsevierpure.com/en/publications/collagen-formation-and-structure-2/> (accessed December 9, 2025).
- [75] Smith SM, Birk DE. **Focus on Molecules: Collagens V and XI.** Exp Eye Res 2012;98:105–6. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.08.003>.
- [76] Linsenmayer TE, Gibney E, Igoe F, Gordon MK, Fitch JM, Fessler LI, et al. **Type V Collagen: Molecular Structure and Fibrillar Organization of the Chicken al(V) NH2-terminal Domain, a Putative Regulator of Corneal Fibrillogenesis.** 1993.
- [77] Roulet M, Ruggiero F, Karsenty G, LeGuellec D. **A comprehensive study of the spatial and temporal expression of the col5a1 gene in mouse embryos: a clue for understanding collagen V function in developing connective tissues.** Cell Tissue Res 2007;327:323–32. <https://doi.org/10.1007/S00441-006-0294-1>.
- [78] Limandjaja GC, van den Broek LJ, Waaijman T, van Veen HA, Everts V, Monstrey S, et al. **Increased epidermal thickness and abnormal epidermal differentiation in keloid scars.** British Journal of Dermatology 2017. <https://doi.org/10.1111/bjd.14844>.
- [79] Cottrell TR, Wise RA, Wigley FM, Boin F. **The degree of skin involvement identifies distinct lung disease outcomes and survival in systemic sclerosis.** Ann Rheum Dis 2014;73:1060–6. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202849>.
- [80] Leroy EC. **SYSTEMIC SCLEROSIS A Vascular Perspective.** vol. 22. 1996.
- [81] Pandey JP, LeRoy EC. **Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and**

- coronary restenosis.** Arthritis Rheum 1998;41:10–5.
[https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199801\)41:1<10::AID-ART2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199801)41:1<10::AID-ART2>3.0.CO;2-P).
- [82] Ehrlich HP, Desmoulière A, Diegelmann RF, Cohen IK, Compton CC, Garner WL, et al. **Morphological and immunochemical differences between keloid and hypertrophic scar.** Am J Pathol 1994;145:105–13.
- [83] Yin C, Wang C, Wang C. **Aberrantly Expressed Small Noncoding RNAome in Keloid Skin Tissue.** Front Genet 2022;13.
<https://doi.org/10.3389/FGENE.2022.803083>.
- [84] Liu M. **Cytokines, chemokines and growth factors involved in keloids pathogenesis.** An Bras Dermatol 2025;100:300–7.
<https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.01.010>.
- [85] Limandjaja GC, Niessen FB, Scheper RJ, Gibbs S. **Hypertrophic scars and keloids: Overview of the evidence and practical guide for differentiating between these abnormal scars.** Exp Dermatol 2021;30:146–61.
<https://doi.org/10.1111/exd.14121>.
- [86] Casley-Smith JR. **The fine structure and functioning of tissue channels and lymphatics .** Lymphology 1980;13:177–83.
- [87] Tammela T, Alitalo K. **Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise.** Cell 2010;140:460–76.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.045>.
- [88] Leak LV. **Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface.** Microvasc Res 1970;2:361–91.
- [89] Zhang GY, Zhao YX, Li QF, Jiang CH, Zhu L. **Decreased Lymphangiogenesis in the Skin of Patients with Keloid.** WOUND REPAIR AND REGENERATION 2018;26.

- [90] Liu J, Yang C, Zhang H, Hu W, Bergquist J, Wang H, et al. **Quantitative proteomics approach reveals novel biomarkers and pathological mechanism of keloid.** *Proteomics Clin Appl* 2022;16. <https://doi.org/10.1002/prca.202100127>.
- [91] Zhao S-Y, Wu D, Cheng C, Xie J-H. **Advances and future directions in keloid research: Pathogenesis, diagnosis and personalized treatment strategies.** *World J Clin Cases* 2023;11:8094–8. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i34.8094>.
- [92] Hunzelmann N, Anders S, Sollberg S, Schönher E, Krieg T. **Co-ordinate induction of collagen type I and biglycan expression in keloids.** *British Journal of Dermatology* 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1996.tb01502.x>.
- [93] Zhang X, Alanazi YF, Jowitt TA, Roseman AM, Baldock C. **Elastic Fibre Proteins in Elastogenesis and Wound Healing.** *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23084087>.
- [94] Tan S, Khumalo N, Bayat A. **Understanding keloid pathobiology from a quasi-neoplastic perspective: Less of a scar and more of a chronic inflammatory disease with cancer-like tendencies.** *Front Immunol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01810>.
- [95] Duan X, Wu Y, Zhang Z, Lu Z. **Identification and analysis of dysregulated lncRNA and associated ceRNA in the pathogenesis of keloid.** *Ann Transl Med* 2020;8:222–222. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.01.07>.
- [96] Cai Y, Zhu S, Yang W, Pan M, Wang C, Wu W. **Downregulation of β -catenin blocks fibrosis via Wnt2 signaling in human keloid fibroblasts.** *Tumor Biology* 2017;39. <https://doi.org/10.1177/1010428317707423>.
- [97] Roh MR, Kumar R, Rajadurai A, Njauw C, Ryoo UH, Chung KY, et al. **Beta-catenin causes fibrotic changes in the extracellular matrix via upregulation**

of collagen I transcription. British Journal of Dermatology 2017;177:312–5. <https://doi.org/10.1111/bjd.15079>.

- [98] Da Silva IR, Da Tiveron LCRC, Da Silva MV, Peixoto AB, Carneiro CAX, Dos Reis MA, et al. **In situ cytokine expression and morphometric evaluation of total collagen and collagens Type I and Type III in Keloid scars.** Mediators Inflamm 2017;2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6573802>.
- [99] Prananda AT, Syahputra RA. **Photobiomodulation therapy in keloid management: a comprehensive review.** Front Med (Lausanne) 2025;12. <https://doi.org/10.3389/fmed.2025.1550662>.
- [100] Feng F, Liu M, Pan L, Wu J, Wang C, Yang L, et al. **Biomechanical Regulatory Factors and Therapeutic Targets in Keloid Fibrosis.** Front Pharmacol 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.906212>.
- [101] Peltonen J, Hsiao LL, Sollberg S, Aumailley M, Timpl R, Chu ML, et al. **Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and transforming growth factor-beta 1 mRNA.** J Invest Dermatol 1991;97:240–8. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12480289>.
- [102] Limandjaja GC, van den Broek LJ, Breetveld M, Waaijman T, Monstrey S, de Boer EM, et al. **Characterization of In Vitro Reconstructed Human Normotrophic, Hypertrophic, and Keloid Scar Models .** Tissue Eng Part C Methods 2018;24:242–53. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0464>.
- [103] Ud-Din S, Bayat A. **Keloid scarring or disease: Unresolved quasi-neoplastic tendencies in the human skin.** Wound Repair and Regeneration 2020;28:422–6. <https://doi.org/10.1111/wrr.12793>.
- [104] Al A-Kokko L, Tala R, Savolainen E-R. **Collagen. Gene Expression in Keloids: Analysis of Collagen Metabolism and Type I, III, IV, and V Procollagen mRNAs in Keloid Tissue and Keloid Fibroblast Cultures.** J Invest Dermatol 1987;89:238–44. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12471056>.

- [105] Yu X, Zhu X, Xu H, Li L. **Emerging roles of long non-coding RNAs in keloids.** Front Cell Dev Biol 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.963524>.
- [106] He Y, Zhang Z, Yin B, Li S, Wang P, Lan J, et al. **Identifying miRNAs Associated with the Progression of Keloid through mRNA-miRNA Network Analysis and Validating the Targets of miR-29a-3p in Keloid Fibroblasts.** Biomed Res Int 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6487989>.
- [107] De Felice B, Manfellotto F, Garbi C, Santoriello M, Nacca M. **MiR-34 modulates apoptotic gene expression in Ingenol mebutate treated keloid fibroblasts.** Mol Med Rep 2018;17:7081–8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8749>.
- [108] Wu ZY, Lu L, Liang J, Guo XR, Zhang PH, Luo SJ. **Keloid microRNA expression analysis and the influence of miR-199a-5p on the proliferation of keloid fibroblasts.** Genetics and Molecular Research 2014;13:2727–38. <https://doi.org/10.4238/2014.April.14.2>.
- [109] Shi K, Qiu X, Zheng W, Yan D, Peng W. **MiR-203 regulates keloid fibroblast proliferation, invasion, and extracellular matrix expression by targeting EGR1 and FGF2.** Biomedicine and Pharmacotherapy 2018;108:1282–8. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.152>.
- [110] Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. **MicroRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians.** Heart 2015;101:921–8. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305402>.
- [111] Lyu L, Zhao Y, Lu H, Liu Z, Guo J, Lu D, et al. **Integrated Interaction Network of MicroRNA Target Genes in Keloid Scarring.** Mol Diagn Ther 2019;23:53–63. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0378-0>.
- [112] Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, Seto AG, Hong SJ, Mustoe TA, et al. **A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix**

Expression and Fibroplasia in the Skin. Journal of Investigative Dermatology 2019;139:1073–81. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.11.007>.

- [113] Li Y, Zhang J, Lei Y, Lyu L, Zuo R, Chen T. **MicroRNA-21 in Skin Fibrosis: Potential for Diagnosis and Treatment.** Mol Diagn Ther 2017;21:633–42. <https://doi.org/10.1007/s40291-017-0294-8>.
- [114] Deng Z, He Y, Yang X, Shi H, Shi A, Lu L, et al. **MicroRNA-29: A Crucial Player in Fibrotic Disease.** Mol Diagn Ther 2017;21:285–94. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0253-9>.
- [115] Zhou R, Wang C, Wen C, Wang D. **miR-21 promotes collagen production in keloid via Smad7.** Burns 2017;43:555–61. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.09.013>.
- [116] Yu X, Li Z, Chan MTV, Wu WKK. **microRNA deregulation in keloids: An opportunity for clinical intervention?** Cell Prolif 2015;48:626–30. <https://doi.org/10.1111/cpr.12225>.
- [117] Kashiyama K, Mitsutake N, Matsuse M, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, et al. **MiR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts.** Journal of Investigative Dermatology 2012;132:1597–604. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.22>.
- [118] Zhang GY, Wu LC, Liao T, Chen GC, Chen YH, Zhao YX, et al. **A novel regulatory function for miR-29a in keloid fibrogenesis.** Clin Exp Dermatol 2016;41:341–5. <https://doi.org/10.1111/ced.12734>.
- [119] Huang Y, Wang Y, Lin L, Wang P, Jiang L, Liu J, et al. **Overexpression of miR-133a-3p inhibits fibrosis and proliferation of keloid fibroblasts by regulating IRF5 to inhibit the TGF- β /Smad2 pathway.** Mol Cell Probes 2020;52. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101563>.

- [120] Lv W, Ren Y, Wu M, Luo X, Yu J, Zhang Q, et al. **Identifying miRNA modules associated with progression of keloids through weighted gene co-expression network analysis and experimental validation in vitro.** Burns 2021;47:1359–72. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2020.11.013>.
- [121] Yan L, Wang LZ, Xiao R, Cao R, Pan B, Lv XY, et al. **Inhibition of microRNA-21-5p reduces keloid fibroblast autophagy and migration by targeting PTEN after electron beam irradiation.** Laboratory Investigation 2020;100:387–99. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0323-9>.
- [122] Liu RH, Ning B, Ma XE, Gong WM, Jia TH. **Regulatory roles of microRNA-21 in fibrosis through interaction with diverse pathways (Review).** Mol Med Rep 2016;13:2359–66. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4834>.
- [123] Wang Q, Ye B, Wang P, Yao F, Zhang C, Yu G. **Overview of microRNA-199a regulation in cancer.** Cancer Manag Res 2019;11:10327–35. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S231971>.
- [124] Tanaka N, Minemura C, Asai S, Kikkawa N, Kinoshita T, Oshima S, et al. **Identification of mir-199-5p and mir-199-3p target genes: Paxillin facilitates cancer cell aggressiveness in head and neck squamous cell carcinoma.** Genes (Basel) 2021;12. <https://doi.org/10.3390/genes12121910>.
- [125] Ruan R, Liu Y, Zhang X. **Circulating mir-199-3p screens the onset of type 2 diabetes mellitus and the complication of coronary heart disease and predicts the occurrence of major adverse cardiovascular events.** BMC Cardiovasc Disord 2023;23. <https://doi.org/10.1186/s12872-023-03601-4>.
- [126] Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. **Special Report The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas.** 2019.
- [127] Yan M, Zhang DW, Yang M. **Saikosaponin D alleviates inflammatory response of osteoarthritis and mediates autophagy via elevating**

microRNA-199-3p to target transcription Factor-4. J Orthop Surg Res 2024;19. <https://doi.org/10.1186/s13018-024-04607-0>.

- [128] Keßler J, Rot S, Bache M, Kappler M, Würfl P, Vordermark D, et al. **miR-199a-5p regulates HIF-1 α and OSGIN2 and its expression is correlated to soft-tissue sarcoma patients' outcome.** Oncol Lett 2016;12:5281–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5320>.
- [129] Hong SA, Lee S, Park J, Hong M, Yoon JS, Lee H, et al. **miR-199a and miR-199b facilitate diffuse gastric cancer progression by targeting Frizzled-6.** Sci Rep 2023;13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44716-0>.
- [130] Friedman' HM, Koropchak2 C. **Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 Cell Strains for Isolation of Viruses from Clinical Specimens.** 1978.
- [131] Lu H, Yang Y, Ou S, Qi Y, Li G, He H, et al. **The silencing of miR-199a-5p protects the articular cartilage through MAPK4 in osteoarthritis.** Ann Transl Med 2022;10:601–601. <https://doi.org/10.21037/atm-22-2057>.
- [132] Miao G, Pan J, Wang L, Li F. **Analysis of the correlation between the levels of HIF-1 α and miR-199a in lesions and the psoriasis severity index.** Postepy Dermatol Alergol 2024;41:521–4. <https://doi.org/10.5114/ada.2024.143495>.
- [133] Wu J, Fang L, Cen Y, Qing Y, Chen J, Li Z. Title: **MiR-21 Regulates Keloid Formation by Downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad Signaling Pathway** **MiR-21 Regulates Keloid Formation by Downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad Signaling Pathway** Authors' full names, highest academic degrees, and affiliations 2019. <https://doi.org/10.1093/jbcr/irz089/5513773>.
- [134] Liu Y, Li Y, Li N, Teng W, Wang M, Zhang Y, et al. **TGF- β 1 promotes scar fibroblasts proliferation and transdifferentiation via up-regulating MicroRNA-21.** Sci Rep 2016;6. <https://doi.org/10.1038/srep32231>.

- [135] Yang X, Ma L, Wei R, Ye T, Zhou JK, Wen M, et al. **Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activating TGF- β pathway**. Signal Transduct Target Ther 2020;5. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-0169-Z>.
- [136] Choi MS, Hong JS, Lee DH, Lee YS. **MicroRNA miR-199a-3p alleviates liver fibrosis by targeting CDK17 in activated hepatic stellate cells**. Biochem Biophys Res Commun 2024;733. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150727>.
- [137] Liu E, Sun Y, Yang L, Jiang H, Sun F, Chen L, et al. **Investigating the regulation of the miR-199a-3p/TGF- β /Smad signaling pathway by BSHXF drug-containing serum combined with ADSCs for delaying intervertebral disc degeneration**. Front Pharmacol 2025;16. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2025.1583635>.
- [138] Bijlard E, Kouwenberg CAE, Timman R, Hovius SER, Busschbach JJV, Mureau MAM. **Burden of keloid disease: A cross-sectional health-related quality of life assessment**. Acta Derm Venereol 2017;97:225–9. <https://doi.org/10.2340/00015555-2498>.
- [139] Duan X, Wu Y, Zhang Z, Lu Z. **Identification and analysis of dysregulated lncRNA and associated ceRNA in the pathogenesis of keloid**. Ann Transl Med 2020;8:222–222. <https://doi.org/10.21037/ATM.2020.01.07>.
- [140] Rodrigues PM, Afonso MB, Simão AL, Islam T, Gaspar MM, O'Rourke CJ, et al. **miR-21-5p promotes NASH-related hepatocarcinogenesis**. Liver Int 2023;43:2256–74. <https://doi.org/10.1111/LIV.15682>.
- [141] Wu HY, Zhou CM, Gao Y, Wen YH, Hu YT, Zhao HL, et al. **circSP199a, a circularized RNA sponge targeting miR-199a-5p and -3p, mitigates mouse cardiac hypertrophy and fibrosis**. Acta Pharmacol Sin 2025. <https://doi.org/10.1038/S41401-025-01620-9>.

- [142] Ogawa R. **Japan Scar Workshop (JSW) Scar Scale (JSS) for Assessing Keloids and Hypertrophic Scars**. Textbook on Scar Management, Springer International Publishing; 2020, p. 133–40. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44766-3_15.

- [143] Lee JYY, Yang CC, Chao SC, Wong TW. **Histopathological differential diagnosis of keloid and hypertrophic scar**. Am J Dermatopathol 2004;26:379–84. <https://doi.org/10.1097/00000372-200410000-00006>.

- [144] Cohen J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences Second Edition** 1988.

- [145] Pruijboom T, Scheltinga MR. **Keloid Formation due to Repetitive Mammographies**. Case Rep Dermatol 2018;10:257–62. <https://doi.org/10.1159/000495020>.

- [146] Mari W, Alsabri SG, Tabal N, Younes S, Sherif A, Simman R. **Novel Insights on Understanding of Keloid Scar: Article Review**. J Am Coll Clin Wound Spec 2016;7:1–7. <https://doi.org/10.1016/J.JCCW.2016.10.001>.

- [147] Jfri A, Rajeh N, Karkashan E. **A Case of Multiple Spontaneous Keloid Scars**. Case Rep Dermatol 2015;7:156–60. <https://doi.org/10.1159/000437249>.

- [148] English RS, Shenefelt PD. **Keloids and hypertrophic scars**. Dermatologic Surgery 1999;25:631–8. <https://doi.org/10.1046/J.1524-4725.1999.98257.X>.

- [149] Carswell L, Borger J. **Hypertrophic Scarring Keloids**. StatPearls 2023.

- [150] Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim DH. **3D bioprinting for engineering complex tissues**. Biotechnol Adv 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011>.

- [151] Peng Q, Lu Y, Huang R, Chen • Rui. **Should We Do Postoperative Radiotherapy After Keloid Excision as Soon as Possible? A Systematic Review and Meta-Analysis 2025.** <https://doi.org/10.1007/s00266-025-04869-x>.

- [152] Berman B, Bieleley HC. **Keloids.** 1995.

- [153] V. C, Y. K, K. P. B, Joish UK. **A retrospective study of demographic profile of keloid over the pinna in central Karnataka.** International Journal of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery 2018;4:726. <https://doi.org/10.18203/issn.2454-5929.ijohns20181860>.

- [154] Matsumoto NM, Peng WX, Aoki M, Akaishi S, Ohashi R, Ogawa R, et al. **Histological analysis of hyalinised keloidal collagen formation in earlobe keloids over time: collagen hyalinisation starts in the perivascular area.** Int Wound J 2017;14:1088–93. <https://doi.org/10.1111/IWJ.12763>.

- [155] Serror K, Ferrero L, Boismal F, Sintès M, Thery M, Vianay B, et al. **Evidence of inter- and intra-keloid heterogeneity through analysis of dermal fibroblasts: A new insight in deciphering keloid physiopathology.** Exp Dermatol 2023;32:1096–107. <https://doi.org/10.1111/EXD.14817>.

- [156] Zheng B, Qiao J, Yu X, Zhou H, Wang A, Zhang X. **Identification of potential biomarkers and mechanisms for keloid disorder based on comprehensive bioinformatics analysis and machine learning algorithms.** BMC Med Genomics 2025;18. <https://doi.org/10.1186/s12920-025-02174-9>.

- [157] Ferringer T. **Alterations in collagen and elastin.** Dermatopathology 2025:275–96. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-93059-8.00013-3>.

- [158] Jumper N, Paus R, Bayat A. **Functional histopathology of keloid disease.** Histol Histopathol 2015;30:1033–57. <https://doi.org/10.14670/HH-11-624>.

- [159] Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. **Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment.** *Matrix Biology* 2016;51:37–46. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.013>.
- [160] Park TH, Lee B, Park JH. **Do histopathologic parameters affect the rate of recurrence in auricular Keloid patients?** *Journal of Craniofacial Surgery* 2015;26:e571–3. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000002125>.
- [161] Jiao H, Zhang T, Fan J, Xiao R. **The superficial dermis may initiate keloid formation: Histological analysis of the keloid dermis at different depths.** *Front Physiol* 2017;8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00885>.
- [162] Jiang XS, Chen S, Chen JX, Zhu XQ, Zheng LQ, Zhuo SM, et al. **Monitoring process of human keloid formation based on second harmonic generation imaging.** *Laser Phys* 2011;21:1661–4. <https://doi.org/10.1134/s1054660x11170087>.
- [163] Arbi S, Eksteen EC, Oberholzer HM, Taute H, Bester MJ. **Premature Collagen Fibril Formation, Fibroblast-Mast Cell Interactions and Mast Cell-Mediated Phagocytosis of Collagen in Keloids.** *Ultrastruct Pathol* 2015. <https://doi.org/10.3109/01913123.2014.981326>.
- [164] Kaku C, Ichinose S, Dohi T, Tosa M, Ogawa R. **Keloidal Collagen May Be Produced Directly by α SMA-positive Cells: Morphological Analysis and Protein Shotgun Analysis.** *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2023;11:E4897. <https://doi.org/10.1097/GOX.00000000000004897>.
- [165] Kielty CM, Grant ME. **Chapter 2, Part I The Collagen Family: Structure, Assembly, and Organization in the Extracellular Matrix.** 2002.
- [166] Monnier VM. **Nonenzymatic Glycosylation, the Maillard Reaction and the Aging Process.** vol. 45. 1990.

- [167] Kelley RO, Hajdu SI. **Hyaline Change: A Review**. Hum Pathol 1972;12:135–51. <https://doi.org/10.1186/s13643-023-02192-7>.
- [168] Yang Y, Liu L, Yang R, Ding X, Li Y, Liu H, et al. **Blood perfusion in hypertrophic scars and keloids studied by laser speckle contrast imaging**. Skin Res Technol 2021;27:789–96. <https://doi.org/10.1111/SRT.13020>.
- [169] Touchi R, Ueda K, Kurokawa N, Tsuji M. Central **regions of keloids are severely ischaemic**. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery 2016;69:e35–41. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2015.11.006>.
- [170] Ross MHP, Pawlina W. **Histology: A Text and Atlas**, 8th. Wolters Kluwer 2020;12. <https://doi.org/10.1186/s13643-023-02192-7>.
- [171] Pearse AGE. **Histochemistry: Theoretical and Applied**. Churchill Livingstone 1980;1. <https://doi.org/10.1186/s13643-023-02192-7>.
- [172] Bancroft JD, Gamble M. **Theory and Practice of Histological Techniques**. Elsevier 2019. <https://doi.org/10.1186/s13643-023-02192-7>.
- [173] Artlett CM. **The IL-1 family of cytokines. Do they have a role in scleroderma fibrosis?** Immunol Lett 2018;195:30–7. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.11.012>.
- [174] Romanowska-Próchnicka K, Dziewit M, Lesiak A, Reich A, Olesińska M. **Scleroderma and scleroderma-like syndromes**. Front Immunol 2024;15. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1351675>.
- [175] Chu YH, Pang BY, Yang M, Meng Q, Leng Y. **The intervention of curcumin on rodent models of hepatic fibrosis: A systematic review and meta-analysis**. PLoS One 2024;19. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0304176>.
- [176] Ali KM, Rahim Fattah FH, Omar SH, Gubari MIM, Yousefifard M, Hosseini M. **Mesenchymal Stromal Cells Derived Conditioned Medium in Pulmonary**

Fibrosis: A Systematic Review and Meta-analysis. Arch Iran Med 2020;23:870–9. <https://doi.org/10.34172/AIM.2020.116>.

[177] Lima IC de, Wu SV, Silva LM, Freitas JJ da S, Carneiro FRO, Oliveira FRT, et al. **Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase.** Rev Panamazonica Saude 2020;11:202000259–2176. <https://doi.org/10.5123/S2176-6223202000259>.

[178] Sun M, Connizzo BK, Adams SM, Freedman BR, Wenstrup RJ, Soslowsky LJ, et al. **Targeted deletion of collagen V in tendons and ligaments results in a classic Ehlers-Danlos syndrome joint phenotype.** American Journal of Pathology 2015;185:1436–47. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.031>.

[179] Wei J, Gao X, Li Z, Jia Y, Li C, Liu J. **Targeting Tumor Differentiation Grade-related Genes Prognostic Signature Including COL5A1 Based on Single-cell RNA-seq in Gastric Cancer.** Int J Med Sci 2025;22:2533–44. <https://doi.org/10.7150/IJMS.107509>.

[180] Lorentzen L, Henriksen NA, Juhl P, Mortensen JH, Ågren MS, Karsdal MA, et al. **Type V Collagen is Persistently Altered After Inguinal Hernia Repair.** Scand J Surg 2018;107:212–7. <https://doi.org/10.1177/1457496918766694>.

[181] Wu J, Fang L, Cen Y, Qing Y, Chen J, Li Z. **MiR-21 Regulates Keloid Formation by Downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad Signaling Pathway.** J Burn Care Res 2019;40:809–17. <https://doi.org/10.1093/JBCR/IRZ089>.

[182] He X, Ma R, Li Y, Wang H, Yan Y, Mao Y, et al. **Association of H-Type Hypertension with miR-21, miR-29, and miR-199 in Kazahks of Xinjiang, China.** Int J Hypertens 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4632087>.

[183] Bi S, Liu R, Wu B, He L, Gu J. **Bioinformatic Analysis of Key Genes and Pathways Related to Keloids.** Biomed Res Int 2021;2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5897907>.

- [184] Yang H, Lv D, Li X, Chen Y, Xu H, Wu H, et al. **Comprehensive analysis of keloid super-enhancer networks reveals FOXP1-mediated anti-senescence mechanisms in fibrosis.** Cell Mol Biol Lett 2025;30. <https://doi.org/10.1186/S11658-025-00763-1>.
- [185] Shih B, Garside E, McGrouther DA, Bayat A. **Molecular dissection of abnormal wound healing processes resulting in keloid disease.** Wound Repair Regen 2010;18:139–53. <https://doi.org/10.1111/J.1524-475X.2009.00553.X>.
- [186] Chen W, Fu X, Sun X, Sun T, Zhao Z, Sheng Z. **Analysis of Differentially Expressed Genes in Keloids and Normal Skin_2003.** Journal of Surgical Research 2002.

ANEXO

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

1. Título da pesquisa: ***“AÇÃO DOS CORTICOSTERÓIDES EM CICATRIZES CUTÂNEAS QUELOIDIANAS: AVALIAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR, PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E FIBRILOGÊNESE”***.

2. Pesquisador principal: Dr^a WALCY PAGANELLI ROSOLIA TEODORO. CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADORA FMUSP. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº CRBio: 106457/01-D. UNIDADE HCFMUSP: DISCIPLINA DE REUMATOLOGIA e Pesquisador associado: DR. CÉSAR ISAAC CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO HC. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CREMESP 56601. UNIDADE DO HCFMUSP: DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA

3. Departamento / Instituto: Departamento de Clínica Médica / Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar desta pesquisa ***“AÇÃO DOS CORTICOSTERÓIDES EM CICATRIZES CUTÂNEAS QUELOIDIANAS: AVALIAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR, PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E FIBRILOGÊNESE”***

Você é portador (a) de uma cicatriz anormal chamada de QUELÓIDE e está em tratamento no Grupo de Pequenas Cirurgias do Ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Como parte principal do seu tratamento, você será submetido (a) à uma cirurgia plástica reparadora para retirada de toda ou de parte de sua cicatriz.

Normalmente essa cicatriz depois de retirada é descartada, mas ela pode ajudar numa pesquisa médica.

Em nossa pesquisa, usaremos as células e a substância presente ao redor destas células, dos pedaços de pele, para realizar estudos que poderão ser úteis no tratamento de pacientes portadores de cicatrizes como a sua.

Somente a pele que será descartada na sua cirurgia após a realização da biópsia para confirmação de seu diagnóstico será destinada às nossas pesquisas, de modo que não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico já programado de retirada da sua cicatriz adotado pelo seu médico; ou seja, nada será alterado na sua cirurgia, apenas o destino da pele retirada é que será diferente.

Além disso, uma pequena quantidade de sangue poderá ser coletada da veia de seu braço (entre 3 e 5 ml de sangue), no ato da sua cirurgia, para, assim como o pedaço de pele, ser utilizado em nossa pesquisa com o objetivo adicional de comparar as alterações existentes na pele retirada e as substâncias presentes no sangue do paciente com quelóide. Esse procedimento poderá causar, eventualmente, leve desconforto no local onde foi puncionado, que geralmente é transitório. Também pode surgir algumas manchas arroxeadas (equimoses) no local da coleta, também transitórias (com duração de alguns dias, não necessitando de nenhum tratamento específico).

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que apresenta como objetivo determinar as causas das cicatrizes queloidianas e a interferência da ação dos medicamentos corticoesteróides nessas cicatrizes, para que, com a exata compreensão de como essas cicatrizes se desenvolvem, seja possível, no futuro, o desenvolvimento de novos tratamentos melhores e mais eficazes para os pacientes com quelóides, beneficiando não só você como outras pessoas que tenham a mesma enfermidade.

As informações obtidas neste estudo serão analisadas em conjunto com dados de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. É assegurada a sua assistência durante toda pesquisa, com acompanhamento ambulatorial periódico, bem como é garantido o livre acesso à todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que você queira saber antes, durante e depois da sua participação.

É garantido que seu nome será mantido em segredo e que você poderá recusar-se a participar do estudo ou deixar de participar do estudo a qualquer momento que desejar, sem que a continuidade de seu tratamento na instituição seja prejudicada.

É garantido, ainda, o recebimento, pelo participante do estudo, de uma via deste Termo de Consentimento, assinada pelo pesquisador.

Não haverá despesas pessoais aos participantes do estudo, do mesmo modo que não haverá compensação financeira ou benefícios diretos relacionados à sua participação, uma vez que este é um estudo experimental envolvendo células presentes na pele e substâncias que circundam essas células, bem como substâncias presentes no sangue de pacientes com quelóides. No entanto, é garantida sua indenização, caso o (a) Sr.(a) sofra algum dano decorrente desta pesquisa.

O material biológico, no caso a pele obtida de sua cirurgia para esta pesquisa, será armazenado de acordo com a Resolução 441/2011 e se a mesma for utilizada para pesquisa futura, mediante aprovação do sistema CEP-CONEP, será pedido novo consentimento.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de dúvidas. A pesquisadora principal é a Dr^a. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, que pode ser encontrada na Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no Laboratório de Investigação Médica 17 (LIM17), tel: (11) 3061-7211, [email:walcy.teodoro@fm.usp.br](mailto:walcy.teodoro@fm.usp.br). O pesquisador colaborador da área clínica é o Dr. César Isaac, que pode ser encontrado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP no 8º andar do Instituto Central –Divisão de Cirurgia Plástica, tel: 2661-6636, [email:cesar.isaac@hc.fm.usp.br](mailto:cesar.isaac@hc.fm.usp.br).

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Rua Ovídio Pires de Campos, 225 –5º andar –tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; [e-mail:cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br)

Assim sendo, fui suficientemente informado (a) a respeito do estudo: "AÇÃO DOS CORTICOSTERÓIDES EM CICATRIZES CUTÂNEAS QUELOIDIANAS: AVALIAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR, PROTEÍNAS DE SINALIZAÇÃO E FIBRILOGÊNESE".

Eu discuti as informações com a Pesquisadora Responsável (Dr^a. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro) ou pessoas por ela delegadas (Dr^a. Valeria Berton Liguori Zacchi/ Dr. César Isaac) sobre minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos, os riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

..... Data...//...//....
Assinatura do(a) paciente/Representante Legal

(Somente para o responsável do projeto)

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

..... Data...//...//....
Assinatura do Responsável pelo estudo

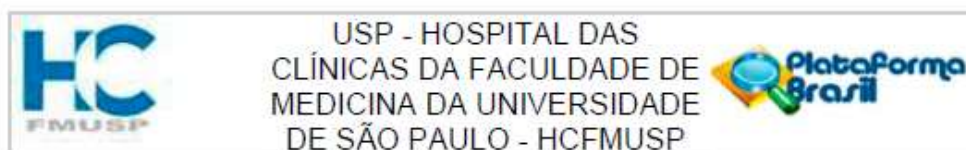
DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NOME:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

ANEXO B – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ação dos Corticosteróides em Cicatrizes Cutâneas Queloidianas: Avaliação da Matriz Extracelular, Proteínas de Sinalização e Fibrilogênese

Pesquisador: Walcy Paganelli Rosolia Teodoro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24414619.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.801.459

Apresentação do Projeto:

O projeto apresentado será tema de tese de Doutorado da aluna Valeria Berton Liguori Zacchi, sob a orientação da Dra. Walcy P. R. Teodoro e tem como objetivo avaliar elementos celulares em cicatrizes cutâneas queloidianas.

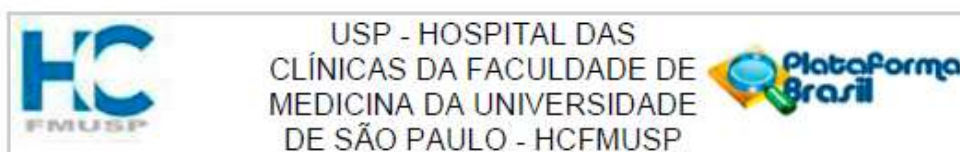
Trata-se de estudo primário, observacional e experimental sobre a expressão das proteínas da matriz fibrilar, caracterizado pela composição dos tipos de colágeno, ação das metaloproteinases e seus inibidores na pele, assim como o mecanismo de sinalização e transcrição celular em cultura de fibroblastos de cicatrizes queloidianas com e sem ação prévia de corticosteróides, no momento de seu tratamento cirúrgico, em indivíduos portadores de cicatrizes queloidianas.

O projeto de pesquisa será desenvolvido no Laboratório de Matriz Extracelular da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM17) e no Laboratório de Cultura Celular e Cicatrização de Feridas da Disciplina de Cirurgia Plástica e Microcirurgia (LIM04).

Serão avaliados fragmentos de pele retirados no momento da cirurgia plástica de reparação da cicatriz e que seriam descartados após o diagnóstico pela biópsia.

Serão selecionados, 21 (vinte e um) pacientes portadores de cicatrizes queloidianas em qualquer parte do corpo, em acompanhamento no Grupo de Pequenas Cirurgias do Ambulatório de Cirurgia Plástica CPI 5000 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo,

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.801.459

que serão divididos em 3 grupos: -Quelóides que não receberam tratamento com corticosteroides; - Quelóides tratados com corticosteroides entre 3 e 6 meses; -Quelóides tratados com corticosteroides há menos de 3 meses.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do projeto é de avaliar a expressão das proteínas da matriz fibrilar, caracterizado pela composição dos tipos de colágeno, ação das metaloproteinases e seus inibidores na pele, assim como analisar o mecanismo de sinalização e transcrição celular em cultura de fibroblastos de cicatrizes queloidianas com e sem ação prévia de corticosteróides, no momento de seu tratamento cirúrgico.

Objetivos secundários:

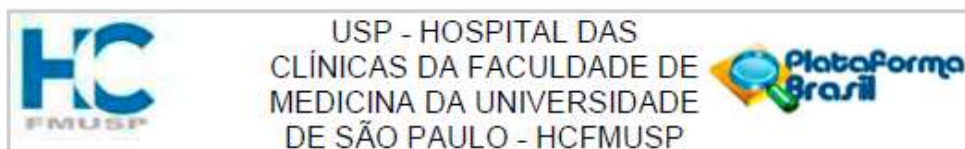
1. Avaliar o perfil das citocinas IL-1, IL-6, TNF-, TGF no soro de pacientes portadores de cicatrizes queloidianas.
2. Analisar 21 integrina, alfa-actina de músculo liso, as metaloproteinases, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-19 e seus inibidores TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-9, TIMP-19 na pele destes pacientes.
3. Estudar o efeito dos corticoesteróides:
 - a. Na pele cicatricial queloidiana:
 - i. Por meio da análise dos componentes celulares e fibrilares da matriz extracelular (MEC).
 - ii. Por meio da avaliação destes com os proteoglicanos presentes na MEC.
 - b. Em cultura de fibroblastos queloidianos:
 - i. Avaliação da sinalização celular por meio das proteínas SMAD e Wnt- catenina
 - ii. Avaliação dos mecanismos de transcrição celular por meio dos microRNAs 21e 29.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos da pesquisa estão no momento da intervenção cirúrgica de exérese do quelóide e coleta dos fragmentos cutâneos para o estudo, onde os espécimens de pele serão provenientes de tecido cicatricial ressecado durante o tratamento cirúrgico desses pacientes, não acarretando lesões cutâneas adicionais que possam ser prejudiciais aos indivíduos participantes da pesquisa. Algum desconforto gerado durante o ato, por ocasião de anestesia local e dor pós-operatória já estariam presentes originalmente devido ao procedimento operatório em si.

Quanto ao material sanguíneo coletado mediante punção venosa, o procedimento de coleta poderá

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.801.459

causar, eventualmente, leve desconforto no local, que geralmente é transitório. Também podem surgir algumas equimoses no local da coleta, também transitórias (com duração de alguns dias, não necessitando de nenhum tratamento específico). Toda evolução clínica será acompanhada por médicos capacitados para solucionar eventuais intercorrências decorrentes dos mesmos.

O principal benefício será a perspectiva de tratamentos mais precisos e efetivos para portadores de semelhante morbidade no futuro, através do conhecimento adquirido neste estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante, cujos resultados podem ser de extrema importância para o tratamento mais eficaz desses pacientes. Cronograma exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora encaminhou nova versão do TCLE com as modificações solicitadas, de maneira adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

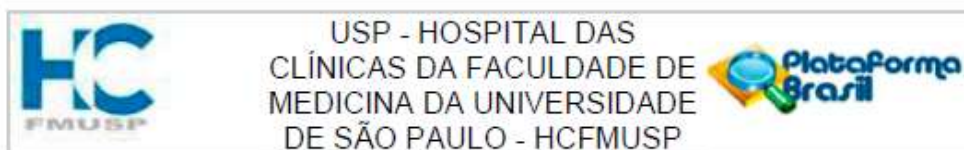
Projeto sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.801.469

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1444526.pdf	18/12/2019 09:49:33		Aceito
Outros	Memo_Plat.pdf	18/12/2019 09:49:18	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEqueloidemodificado.pdf	14/11/2019 14:18:14	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	projetoassinado.pdf	24/10/2019 19:57:27	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	custos.pdf	24/10/2019 19:51:47	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	15/10/2019 13:20:22	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto_Pesquisa_final.pdf	04/10/2019 18:32:03	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DOCTORADO_VALERIA_2019_FINAL.pdf	04/10/2019 18:27:55	Walcy Paganelli Rosolia Teodoro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 16 de Janeiro de 2020

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO C – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Journal of Investigative Dermatology



A morpho-molecular gradient of keloid fibrosis revealed by histologic scoring and microRNA–collagen dynamics

Journal:	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
Manuscript ID:	Draft
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Berton, Valeria; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia Baldavira, Camila; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Departamento de Patologia Silva, Elita; Centro Hospitalar de Santo André, Sao Paulo, SP, BR, Departamento de Cirurgia Plástica Santos, Aritania; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil, Laboratorio de Carboidratos e Radioimunoensaios (LIM18) Matheus, Luiz Henrique; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil, Laboratorio de Carboidratos e Radioimunoensaios (LIM18) Lobo, Thays; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia Almeida, Jaíne; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia Queiroz, Zelita Aparecida ; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia Velosa, Ana Paula; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia Capelozzi, Vera; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Departamento de Patologia Teodoro, Walcy; Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR, Divisao de Reumatologia
Keywords:	Skin, Collagen, Keloid, Histological score, microRNA

Journal of Investigative Dermatology
Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission and payment



PayPal has routed, processed, and secured your payment information, [More information about PayPal](#)

Submitted to
Journal of Investigative Dermatology

Manuscript ID
JID-2025-1372

Title
A morpho-molecular gradient of keloid fibrosis revealed by histologic scoring and microRNA-collagen dynamics

Authors
Berton, Valeria
Baldavira, Camila
Silva, Elita
Santos, Aritania
Matheus, Luiz Henrique
Lobo, Thays
Almeida, Jaíne
Queiroz, Zelita Aparecida
Velosa, Ana Paula
Capelozzi, Vera
Teodoro, Walcy

Date Submitted
15-Dec-2025

Payment Method
Valeria Berton
PayPal Redirect 50,00 USD
Payment received on: 15-Dec-2025

Auth. Number:
BE1P6A8B1506