

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Andréa Silva de Pinho

**CINÉTICA DA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS ISOLADOS
A PARTIR DA PELE DO COURO CABELUDO DE NEONATOS E LACTENTES
COM HIDROCEFALIA**

Belo Horizonte
2018

Andréa Silva de Pinho

**CINÉTICA DA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS ISOLADOS
A PARTIR DA PELE DO COURO CABELUDO DE NEONATOS E LACTENTES
COM HIDROCEFALIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Duval Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2018

Pinho, Andréa Silva de.

P654c Cinética da proliferação e migração de fibroblastos isolados a partir da pele do couro cabeludo de neonatos e lactentes com hidrocefalia [manuscrito]. / Andréa Silva de Pinho. - - Belo Horizonte: 2018.

79 f. : il.

Orientador: Ivana Duval de Araújo.

Coorientador: Alfredo Miranda de Góes.

Área de concentração: Ciências aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1.Hidrocefalia. 2. Cicatrização. 3. Fibroblastos. 4. Fístula Cutânea. 5. Recém-Nascido. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval de. II. Góes, Alfredo Miranda de. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WL 350




FOLHA DE APROVAÇÃO

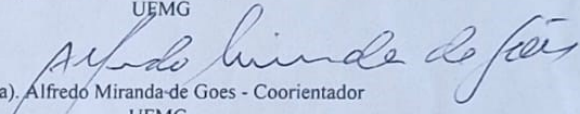
CINÉTICA DA PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DE FIBROBLASTOS ISOLADOS A
PARTIR DA PELE DO COURO CABELUDO DE NEONATOS E LACTENTES COM
HIDROCEFALIA

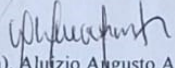
ANDRÉA SILVA DE PINHO

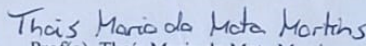
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores Intervinentes na Cicatrização Tecidual.

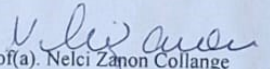
Aprovada em 05 de novembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

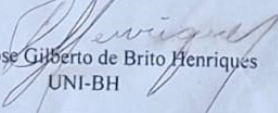

Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador
UFMG


Prof(a). Alfredo Miranda de Goes - Coorientador
UFMG


Prof(a). Aluzio Augusto Arantes Junior
UFMG


Prof(a). Thais Maria da Mata Martins
UFMG


Prof(a). Nelci Zapon Collange
UNIFESP


Prof(a). Jose Gilberto de Brito Henriques
UNI-BH

Belo Horizonte, 5 de novembro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Profa. Sandra Goulart de Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Hallal Fakury

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe: Prof. Marco Antônio Gonçalves Rodrigues

Subchefe: Prof. Bernardo Almeida Campos

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE MEDICINA

Coordenador: Prof. Túlio Pinho Navarro

Subcoordenadora: Profa. Vivian Resende

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Agnaldo Soares Lima

Prof. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Renato Santiago Gomez

Representante discente: Taíse Miriam Cruz Mosso Ramos

Às minhas filhas Bárbara e Bruna e a meus pais, incansáveis no exemplo, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” Antoine de Saint-Exupéry

E nessa caminhada, encontrei admiráveis pessoas, que foram solidificando o meu sonho...

Prof.^a Dr.^a Ivana Duval Araújo, pela oportunidade, confiança, paciência e orientação cuidadosa, te agradeço. Acreditou na incerteza, quando aceitou me orientar numa hipótese que contraria a literatura.

Ao Dr. Anilton Cesar Vasconcelos, responsável pelo direcionamento do trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, onde encontrei pesquisadores que me encantaram e me acolheram. Marcelo Coutinho de Miranda, quietinho, do seu lugar, antenado e sugerindo opções na condução do trabalho. Mariana, Pricila....

À Thais Maria da Mata Martins, que iniciou os experimentos, e ajudou-nos a decifrar a melhor técnica de cultura dos fibroblastos. E ainda me honrou com a presença na qualificação do doutorado.

À Mariane Izabella Abreu de Melo, principal colaboradora, sempre bem-humorada, solícita e disponível, sem a qual não seria possível este trabalho. Muitas vezes pensamos em desistir, mas acreditou na hipótese, e no final, espero ter sido recompensada pelo seu belo trabalho!

Ao querido Prof. Dr. Alfredo Góes que me aceitou sem ao menos me conhecer e confiou na minha proposta.

Aos colegas dos Serviços de Neurocirurgia do Hospital Municipal Odilon Behrens, São Camilo, Socor, Vera Cruz. Meus queridos residentes, companheiros na incessante busca do conhecimento. Lembrança especial aos amigos Paulo Pinheiro, Fabio

Santana, Orlandil Donato, Eustáquio Claret, Thiago Romie, Felipe Maluf, Bernardo Aramuni e a especial companheira de escalada, Audrey Beatriz dos Santos Araújo.

Às minhas amadas crianças e seus pais, que incentivaram e entenderam a importância deste projeto.

Minha amiga de toda hora, Patricia Epifanio!!

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização;

Meus sinceros agradecimentos.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós” (Chico Xavier).

RESUMO

Introdução: A fístula cutânea e deiscência de sutura são complicações que podem ocorrer no pós-operatório de derivações liquóricas de crianças com hidrocefalia. Na literatura já é conhecida uma maior prevalência destas complicações abaixo de seis meses de vida e que a cicatrização difere conforme a idade. **Objetivo:** Avaliar a taxa de proliferação e migração de fibroblastos isolados da pele de couro cabeludo de neonatos e lactentes operados com hidrocefalia, considerando também o estado nutricional. **Casuística e Método:** Foram realizadas biópsias de pele do couro cabeludo de crianças, quando submetidas a tratamento cirúrgico de hidrocefalia. Foram cultivados e testados os fibroblastos das seguintes triplicatas: 3 neonatos nutridos, 3 neonatos desnutridos, 3 lactentes até 6 meses de vida nutridos e 3 lactentes até 6 meses de vida. Na quarta passagem (P4) foram realizados os ensaios. Foi construída a curva de crescimento celular através da contagem direta, avaliada a viabilidade celular por método colorimétrico da metabolização pelos fibroblastos do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), e a velocidade de migração dos fibroblastos medida através do cálculo das áreas de preenchimentos de ferida (*scratch*) nas placas de cultura, em fotografias. **Resultado:** Os fibroblastos dos neonatos têm uma capacidade inicial de proliferação mais rápida em relação aos lactentes, e logo atingem um platô, assumindo uma curva de crescimento sigmoide. Os lactentes apresentam uma curva exponencial de crescimento. A desnutrição reduziu a velocidade de crescimento, quando neonatos. Não houve diferença significativa na metabolização do MTT em todos os grupos. A taxa de migração foi semelhante para cada faixa etária, mas quanto ao momento cirúrgico, novamente o grupo operado antes de um mês de vida migrou significativamente mais lento. **Conclusão:** Os fibroblastos extraídos no primeiro mês de vida, *in vitro*, tem comportamento diferente em relação aos lactentes até 6 meses, com uma velocidade menor de proliferação e migração. As circunstâncias envolvidas no caso de falha da cicatrização nos levam a evitar a cirurgia no primeiro mês de vida e postergar por um tempo maior que o habitual a retirada dos fios de sutura.

Palavras-chave: hidrocefalia; cicatrização; fibroblastos; fístula cutânea; recém-nascido.

ABSTRACT

Introduction: Cerebrospinal fluid wound leakage and suture dehiscence are complications that can occur in the postoperative period of cerebrospinal fluid shunts from hydrocephalic infants. In the literature, it is already known a higher prevalence of these complications below one year of life and that cicatrization differs according to age.

Objetives: To evaluate the rate of proliferation and migration of fibroblast in neonates, compared to infants, operated on hydrocephalus, also observing nutritional status.

Material and Method: Skin biopsies from the scalp of newborns and infants were performed during hydrocephalus surgery of different etiologies. The skins were treated and cultured. In the fourth passage tests were carried out. The cell growth curve was constructed, the cell viability that was measured by the metabolism of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at pre-established times and the rate of fibroblast migration by measuring fills of scratch on the culture plate, calculated from photographs. The triplicates were: 3 nourished newborns operated at 1 month of age, 3 malnourished newborns operated at 1 month of age, 3 nourished infants operated between 1 and 6 months of life, and 3 malnourished infants operated between 1 and 6 months of life. **Results:** The cellular growth of the groups operated before one month of life behaved significantly differently when compared to those operated after the first month of life. The fibroblasts of children operated before one month of life had a sigmoid growth profile and those operated from one month an exponential profile. Nutritional status influenced cell growth. There was no significant difference in the metabolism of MTT, that is, cell viability, considering age and nutrition. About the migration ability, shows that children fibroblast of the same age group behaves in a similar way, but when compared to the surgical moment, again the group operated before one month of life migrates significantly slower. **Conclusion:** Neonatal fibroblasts have an initial doubling capacity similar to infants, but they lose this ability more rapidly. Malnutrition affects the growth rate in the first month of life. The neonatal fibroblast is slower in the first 24 hours, considering the migration. The metabolic pathways responsible for these results should be studied, and we advise that if possible children should be operated on after the first month of life or operative points should be maintained longer than usual when operated in the first month of life.

Keywords: hydrocephalus; wound leakage; wound healing; fibroblasts, neonate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotomicrografia do aspecto morfológico ao microscópio óptico dos fibroblastos aderidos a uma confluência de 80%, com aumento de 4x.....	28
Figura 2 – Fotomicrografia do aspecto morfológico ao microscópio óptico dos fibroblastos após tripsinização, com aumento de 4x.....	28
Figura 3 – Fotomicrografia de fibroblastos com cristais de formazan vista ao microscópio óptico em aumento de 4x.....	31
Figura 4 – Fotomicrografia das células do paciente 8 após realização do scratch....	32
Figura 5 – Fotomicrografias das migrações dos fibroblastos do paciente 8 na área da ferida em 6 horas, 10 horas e 24 horas.....	32
Figura 6 – Fotomicrografia com cálculo da área migrada	32
Figura 7 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 1, neonatos nascidos com percentil de peso > 10	35
Figura 8 – Representação gráfica da metabolização dos fibroblastos do grupo 1, neonatos nascidos com percentil de peso > que 10	36
Figura 9 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos de neonatos nascidos com percentil de peso > 10	37
Figura 10 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 2, neonatos nascidos com percentil de peso ≤ 10	38
Figura 11 – Representação gráfica da metabolização do MTT por fibroblastos dos pacientes do grupo 2, neonatos nascidos com percentil de peso ≤ 10	39
Figura 12 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 2	40
Figura 13 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 3, lactentes operados até 6 meses de vida e nascidos com percentil de peso >10	41
Figura 14 – Metabolização do MTT por fibroblastos das crianças do grupo 3, lactentes operados até 6 meses de vida e percentil de peso ao nascimento > 10	42

Figura 15 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 3, lactentes operados até 6 meses de vida e percentil de peso ao nascimento > 10	43
Figura 16 – Representação gráfica das curvas de crescimentos dos fibroblastos dos pacientes do grupo 4, lactentes operados até 6 meses de vida e nascidos com percentil de peso ≤ 10	44
Figura 17 – Metabolização do MTT por fibroblastos dos pacientes do grupo 4, operados entre 1 e 6 meses de vida e com percentil de peso ao nascimento ≤ 10 ..	45
Figura 18 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 4, operados entre 1 e 6 meses de vida e com percentil de peso ao nascimento ≤ 10	46
Figura 19 – Representação gráfica de comparação entre os crescimentos dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos	48
Figura 20 – Representação gráfica de comparação da viabilidade celular através da metabolização de MTT dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos	49
Figura 21 – Representação gráfica comparando a migração dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros relativos ao crescimento, viabilidade e capacidade de migração dos fibroblastos dos quatro grupos analisados em conjunto	47
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	24
3 CASUÍSTICA E MÉTODO	25
3.1 Aprovação Ética	25
3.2 Casuística	25
3.3 Isolamento e cultivo de fibroblastos da pele do couro cabeludo	26
3.3.1 <i>Curva de crescimento celular</i>	29
3.3.2 <i>Ensaio de viabilidade celular por meio da metabolização do MTT por fibroblastos</i>	30
3.3.3 <i>Taxa de migração dos fibroblastos: Scratch</i>	31
3.4 Análise estatística	33
4 RESULTADO	34
4.1 Primeiro grupo: Neonatos com percentil de peso ao nascimento > 10	34
4.2 Segundo grupo: Neonatos nascidos com percentil de peso ≤ a 10	37
4.3 Terceiro grupo: Lactentes até 6 meses de vida, e nascidos com percentil de peso ao nascimento > que 10	40
4.4 Quarto grupo: Lactentes operados até 6 meses de vida, e nascidos com percentil de peso ≤ a 10	43
4.5 Comparação entre os grupos	46
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÃO	57
7 PERSPECTIVAS	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	64

APÊNDICE A – Biopsia de couro cabeludo de uma criança operada de hidrocefalia aos 4 meses de idade e com percentil de peso ao nascimento de 10, caracterizando desnutrição intra-útero	64
APÊNDICE B – Protocolo de contagem celular	67
APÊNDICE C – Dados dos grupos	69
ANEXOS	76
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP.....	76

1 INTRODUÇÃO

A hidrocefalia tem causas variadas e tratamentos específicos. Do ponto de vista prático, trata-se de um desequilíbrio entre formação, circulação e/ou absorção de líquido, com acúmulo deste nos ventrículos. Geralmente as hidrocefalias são classificadas em obstrutivas (não comunicantes) ou não obstrutivas (comunicantes), o que fornece detalhes para abordagem diagnóstica e terapêutica. Avanço significativo e determinante na história do tratamento da hidrocefalia foi a introdução do uso de drenagens valvuladas unidirecionais com o objetivo de derivar o líquido em excesso nos ventrículos cerebrais para outras cavidades corporais, anulando a base fisiopatológica da hipertensão intra-craniana. Embora a derivação possa ser feita para o átrio direito, seio sagital, tórax e outras cavidades, a variedade mais largamente empregada é a derivação ventrículo-peritoneal (DVP), principalmente abaixo dos 6 meses de vida, considerando principalmente as etiologias e menor taxa de complicação. Toda hidrocefalia considerada obstrutiva pode beneficiar-se com procedimentos endoscópicos. Hidrocefalia decorrente da obstrução do fluxo líquórico no nível do forame de Monro, do aqueduto cerebral, dos forames de Luschka e Magendie pode ser tratada por uma septostomia, abertura do forame de Monro e/ou terceiroventriculostomia, técnica que permite ao neurocirurgião restabelecer o fluxo líquórico, comunicando o compartimento obstruído com o restante do espaço subaracnóideo[1,2].

É uma doença desafiadora para o neurocirurgião pediátrico, tanto pelo fato de ser frequente e definitiva, quanto pelas suas sequelas desastrosas, principalmente as infecciosas e as cognitivas. Do total de procedimentos cirúrgicos realizados pela especialidade, o tratamento da hidrocefalia ocupa proporção de destaque, perfazendo, em conjunto com o tratamento da mielomeningocele e das craniossinostoses, 60% do total[2].

As hidrocefalias congênitas e adquiridas tendem a ter a mesma incidência, destacando-se a mielomeningocele no primeiro grupo e a prematuridade e a meningite no segundo[2]. As principais complicações da derivação ventriculoperitoneal são o mal funcionamento da válvula (33%) e a infecção (0-30%). Incluídas as cirurgias devido

às complicações, há cerca de 2,5 procedimentos por paciente em média durante a infância.

A infecção pós-operatória em um cérebro em desenvolvimento, é complicação grave e apresenta substancial risco de morbidade, incluindo convulsões e declínio intelectual. Ocorre nos primeiros meses após a cirurgia e o tratamento requer remoção do sistema de derivação, colocação de derivação ventricular externa ou punções de alívio periódicas, antibióticos e recolocação do sistema de derivação. Envolve um mínimo de duas cirurgias e um período de internação de três a quatro semanas, além do risco de mortalidade a longo prazo de 30%, o dobro em relação às crianças que não apresentam infecção[3-11].

Vários fatores de risco para infecção têm sido identificados na literatura, incluindo a doença causadora da hidrocefalia, a idade gestacional, idade cronológica, o peso ao nascimento e a cirurgia, presença de derivação prévia, colonização da pele do paciente, técnica e duração da cirurgia, perfuração das luvas na cirurgia, formação de coleção ou fístula cutânea pós-operatória e deiscência. Atribuído à diversidade de metodologia empregada e ausência de estudos randomizados, há certo consenso apenas no maior índice de infecção em neonatos, pré-termos e em presença de fístula líquórica pós-operatória[3-11].

A fístula cutânea é uma complicação relativamente rara, que pode ocorrer no pós-operatório de derivações líquóricas, geralmente acompanhadas de deiscência de sutura, em qualquer das duas incisões de pele, craniana ou cefálica, sendo mais comum craniana. A fístula ocorre com maior frequência em crianças menores de 1 mês, e até 6 meses[3,6,8,12]. Há saída de líquido através da pele, na área de sutura, havendo comunicação do meio externo com o sistema nervoso central e muitas vezes com exposição do sistema de derivação, e conseqüente contaminação bacteriana. A frequência relatada na literatura varia de 0 a 6,8%, com diagnóstico em média 4,9 dias no pós-operatório, variando de 1 a 43 dias, sendo fator comprovadamente associado a infecção do sistema nervoso central e aumentando em 27 vezes a sua frequência, chegando a índices de infecção de 57,1 até 90%[3,6,8,12].

Alguns autores associam a fístula à disfunção mecânica da derivação ventriculoperitoneal; obstrução ou desconexão. E, se o sistema estiver patente, haveria uma diferença tão pequena entre a pressão ventricular e abdominal em crianças; associada à presença de fontanelas e suturas abertas; imaturidade do sistema absortivo e menor força de propulsão para a circulação liquórica, insuficiente para abrir e drenar a válvula, levando o liquor a migrar em torno do cateter ventricular e acumular no subcutâneo, exercendo efeito hidráulico na ferida. A curta distância entre a abertura da dura-máter e o ventrículo por alargamento extremo do sistema ventricular e pequeno manto cortical; comum nesta faixa etária; reduz a barreira mecânica que o líquido percorre até o subcutâneo do couro cabeludo. Em neonatos, além destes fatores, a pele é fina, com menos tecido gorduroso subcutâneo, deixando o tecido mais frouxo e com menor resistência ao líquido. Grandes aberturas da dura-máter durante o procedimento cirúrgico, a trepanação coincidindo com a ferida, excesso de dissecação do subcutâneo e válvulas de alta pressão de abertura predispoem ao seu aparecimento [5,8,9]. Para prevenir a fístula na faixa etária abaixo de seis meses têm sido preconizadas válvulas de baixa pressão ou programáveis, mudança de posição do orifício de trepanação para a região frontal, mínima incisão dural, colocação do catéter onde há maior espessura cerebral e posicionamento pós-operatório com a cabeça elevada. Em crianças prematuras, abaixo de 5 semanas de vida, com hidrocefalia extrema ou pele fina associada a macrocrania, onde há maior risco de desenvolver fístula, a válvula com programação de pressão de abertura entre 30 e 40 mmHg, com alta drenagem liquórica até o 10º a 14º dia onde ocorre a epitelização da pele, mostrou redução da ocorrência de fístulas [8,9].

Trabalhos citam situações observadas nas crianças que desenvolvem fístula pós-operatória, propõem alterações na conduta cirúrgica das crianças reconhecidas como de risco, mas não estudam a origem e os fatores envolvidos diretamente na formação das fístulas e deficiência na cicatrização.

Fato interessante ressaltar é que a coleção liquórica subcutânea ocorre em todas as faixas etárias, em uma frequência de até 21,4 %, mas sem extravasamento pela ferida na maioria das vezes[11].

A deficiência na cicatrização não é questionada, já que os poucos trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro* em seres humanos e animais classificam a cicatrização no período neonatal biologicamente mais rápida e eficaz que a de adultos [13-18].

A composição da pele e da matriz extracelular (MEC) difere em fetos, neonatos e adultos. Há diferença qualitativa da matriz extracelular produzida por fibroblastos de neonatos e crianças acima de 1 mês. A pele das crianças; em relação a adultos; tem maior número de glândulas sudoríparas e menor espessura [13-15].

A cicatrização, na sua definição mais simples, é uma interação de várias células com o meio extracelular. Uma coordenada e coletiva migração celular é parte importante da cicatrização semelhante ao desenvolvimento embrionário e a invasão tumoral.

A pele contém diferentes células em uma área de matriz extracelular fortemente organizada. Está exposta a muitos fatores externos e endógenos que desintegram sua estrutura e funções. A pele tem plasticidade e capacidade de regeneração únicas. A reconstrução da continuidade anatômica e a restauração das funções dos tecidos danificados é um processo complexo e dinâmico coordenado no tempo, chamado cicatrização de feridas.

A cicatrização de feridas é dividida em fase exsudativa (hemostasia, coagulação, ativação da resposta imune local, fagocitose e migração celular), proliferativa (granulação, a contração e a epitelização) e reparadora (remodelação). São organizadas e reguladas com precisão por um complexo de interação entre as células, vias sinalizadoras e a MEC.

Imediatamente após a ferida, os vasos sanguíneos contraem, aglomerados de fibrina se formam, fatores de crescimento como PGDF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e EGF (fator de crescimento epidermal) são liberados, e células inflamatórias migram para a ferida (neutrófilos, monócitos). A MEC com os proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno e elastina irão substituir o coágulo. Muitos tipos de citocinas e fatores de crescimento participam dessa fase, como a família do fator de crescimento transformante β (TGF- β , incluindo TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), a família da interleucina (IL) e a fatores de angiogênese (p.ex., fator de crescimento

epidérmico vascular). Esta fase continua dias e semanas. Durante 1 a 3 dias os queratinócitos epidérmicos, na região em torno da ferida, migram para o leito da ferida e iniciam a reconstituição da epiderme. Este processo conhecido como reepitelização é essencial para a reconstituição da epiderme funcional e impedir o desenvolvimento de infecções. Os fibroblastos dérmicos migram em direção a ferida e iniciam a síntese de componentes da MEC e posteriormente sua remodelação. Os fibroblastos na área da ferida se transformam em miofibroblastos, cuja função é a contração das bordas da ferida. Neste estágio os miofibroblastos proliferam e sintetizam componentes da MEC enquanto mantém a integridade tissular e promovem a contração da ferida [17]. Já se demonstrou que os miofibroblastos são encontrados apenas na ferida adulta. Nenhum ou muito poucos miofibroblastos podem ser encontrados na ferida fetal [18-23]. A medida que a tensão mecânica da ferida aumenta, os miofibroblastos tornam-se mais aparentes. A contração dos miofibroblastos aumenta a rigidez e tensão mecânica da matriz extracelular. O aumento da rigidez da MEC e sinalização mecânica aumenta o feedback positivo e estimula a diferenciação dos miofibroblastos. Neste aspecto a contração e a regeneração são processos mutuamente antagônicos. Desenvolver um tecido novo e saudável na área ferida depende da proliferação celular, migração e diferenciação. Alteração nos mecanismos que regulam estes processos em qualquer estágio levam a alteração na cicatrização. A cicatrização pode ser lenta (desnutrição, diabetes, etc) ou acelerada (cicatrizes hipertróficas).

Os fibroblastos participam das três fases da cicatrização e a qualidade da proliferação e migração dos fibroblastos, são essenciais neste processo cadencial. Estudos de microscopia eletrônica são consistentes em demonstrar populações residentes de fibroblastos que proliferam rapidamente em resposta a lesões. Os fibroblastos iniciam a cicatrização e são primordiais neste processo. Há proliferação local e migração para tecidos adjacentes já nas primeiras 24 horas, em particular perivascular tem sido aceito como o mecanismo em que o número de fibroblastos aumenta[13,17].

Feridas fetais e adultas se curam por meio de mecanismos celulares diferentes e os fibroblastos são diretamente responsáveis por este desfecho. A cicatrização de feridas fetais é caracterizada pela regeneração da arquitetura dérmica normal, rápida reepitelização, restauração da neurovasculatura e dos anexos dérmicos. Envolve um perfil de fatores de crescimento distinto, uma resposta inflamatória mais baixa com um

perfil alto de citocinas antiinflamatórias, menor estresse biomecânico, uma MEC rica em ácido hialurônico e colágeno tipo III e grande potencial de transformação em células-tronco[19].

Existem pelo menos quatro mecanismos para mostrar a diferença da cicatrização da ferida entre a pele fetal e a pele do adulto. O estágio inicial da cicatrização em adultos é caracterizado por uma reação inflamatória com migração de neutrófilos e macrófagos, mas a inflamação não é aparente no feto. Estudos mostram que menos células inflamatórias são encontradas na ferida fetal do que na ferida adulta.

Estudos descobriram que várias citocinas, incluindo IL-6 e IL-8, estão significativamente aumentadas no processo de cicatrização em adultos, comparadas com as do processo de cicatrização fetal. Por outro lado, enquanto a IL-10 é maior na cicatrização fetal do que na cicatrização de adultos, as concentrações de TGF- β 1 e TGF- β 2 são maiores na ferida adulta, e o TGF- β 3 é menor na ferida adulta. O conteúdo da MEC é significativamente diferente entre as feridas fetal e adulta. Os fibroblastos produzem MEC a uma taxa mais alta na ferida fetal, e a proporção de colágeno tipo III para tipo I é maior na ferida fetal, e há uma organização de deposição de colágeno mais regular e menor rigidez[24-31].

A MEC fetal contém altos níveis de glicosaminoglicanos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina), uma organização estrutural única de proteoglicanos e glicoproteínas comparados com feridas de adultos e que podem regular a atividade celular e remodelamento de ferida de forma diferente.

A cicatrização fetal se dá sob circunstâncias diferentes (líquido amniótico), e sem forças de tensão, levando a crer em um ambiente intraútero favorável a cicatrização, que não ocorreria no período neonatal[17,18]. Vários fatores estão envolvidos e demonstrados em vários trabalhos. O tamanho da ferida ou o tipo interfere na incidência de cicatriz em fetos de ovelhas[19]. Feridas fetais de coelhos mantidas no ambiente intraútero e as transplantadas para o peritônio não cicatrizam por segunda intenção em nenhum dos dois ambientes. As feridas que cicatrizaram no ambiente peritoneal apresentam maior resistência a tração, atribuído à diferença da concentração de IGF-1[32]. Enxertos com feridas de tecido fetal que cicatrizam

expostos ao ar, formam cicatriz, enquanto os colocados no subcutâneo de ratos adultos, se curam com regeneração. O oxigênio interfere na cicatrização, mas não é o único fator a ser considerado[33].

A tendência na literatura, com menor consistência, em relação ao período fetal, é considerar a cicatrização neonatal melhor que em adultos, considerando-a uma transição[20,24-31]. Seria uma lenta transição com diferenças multifatoriais entre a cicatrização fetal e dos adultos: rápido fechamento da ferida, grau de resposta inflamatória da ferida, maturidade e competência do sistema imune, grau de organização e diferenciação tecidual, padrão de deposição do colágeno, composição e organização da matriz extracelular da ferida, presença ou ausência do líquido amniótico rico em fatores de crescimento e outros, diferenças na oxigenação tissular, metabolismo da ferida e pH, grau de tensão tissular e função, presença ou ausência de inflamação aguda[19].

Fibroblastos neonatais parecem apresentar uma maior plasticidade e resistem mais a passagens celulares, que vai se perdendo com a idade[27,31]. Também foram identificados grande número de genes de expressão que estão envolvidos na reparação tissular, em neonatos e adultos[30].

Os fibroblastos se comportam de forma diferente em estímulos com fatores de crescimento nas culturas em recém-nascidos, adultos e idosos[20,24,25].

Fibroblastos de alguns órgãos continuam a se desenvolver e se multiplicam no período neonatal até alcançar a capacidade de um adulto[30]. Fibroblastos tem origem embriológica diversa e cada linhagem se comporta de forma diferente em culturas e em resposta a estímulos[18-21]. Feridas de diferentes etiologias e localização anatômica tem propriedades mecânicas específicas que afetam a forma de cicatrização.

A cicatrização da ferida pode ser definida como um processo dependente da idade e o fibroblasto como arquiteto e determinante desta diferença.

Na dissertação de mestrado da autora, foi avaliada a cicatrização das feridas operatórias cutâneas após instalação de derivações ventrículo-peritoneais em 72 neonatos e lactentes até dois anos, prematuros e a termo, nutridos ou não ao nascimento. O estudo foi retrospectivo, através da análise de prontuários e mostrou que crianças operadas no primeiro mês de vida apresentaram maior incidência de deiscência de ferida e fistula liquórica cutânea no pós-operatório e a presença de desnutrição intraútero apresentou uma tendência na ocorrência desta complicação. As fístulas ocorreram em crianças até 6 meses de idade. A prematuridade não alterou a incidência de fístulas[12].

Diante das evidências da literatura, e os resultados acima descritos; entende-se que a idade cronológica influencia o comportamento da ferida operatória. O fibroblasto é a célula mais evidente no processo reparatório, com sua função migratória, proliferativa, secretora e transformadora.

A velocidade da mitose e crescimento celular é vital para a cicatrização de feridas. A migração celular é importante em uma série de processos fisiológicos e patológicos, incluindo reparo tissular, morfogênese, resposta imune, angiogênese, e progressão tumoral. No entanto, os complexos mecanismos dinâmicos que governam a motilidade celular ainda não são totalmente compreendidos. O ensaio de raspagem (*scratch*) é comumente utilizado para investigar a migração celular *in vitro* [34]. Biopsia de pele de couro cabeludo realizada em lactente operado aos 4 meses de vida e nascido com percentil igual a 10, demonstraram alteração da composição da pele nesta idade (Apêndice A).

Visando verificar estas duas funções do fibroblasto, foi proposto um trabalho com análise do crescimento celular e migração dos fibroblastos extraídos da pele do couro cabeludo, em neonatos, e lactentes até meses de vida, e na presença ou não de desnutrição intrauterina. Os resultados poderiam influenciar no melhor período para indicação da cirurgia e para remoção dos fios de sutura das feridas.

2 OBJETIVO

Foi objetivo do presente estudo avaliar a cinética da proliferação e migração de fibroblastos obtidos da pele do couro cabeludo de neonatos e lactentes operados de hidrocefalia, separados também pelo percentil de peso ao nascimento; ou seja; \leq a 10, e $>$ 10.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 Aprovação Ética

O trabalho foi conduzido de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética do hospital Metropolitano Odilon Behrens (Plataforma Brasil - CAAE: 23730713.6.00005129), em anexo, após a assinatura do consentimento informado de pais ou responsáveis de crianças submetidas à cirurgia de hidrocefalia no Hospital Municipal Odilon Behrens, em Belo Horizonte, MG (Anexo 1).

3.2 Casuística

Foram selecionadas doze crianças operadas de hidrocefalia, três para cada grupo, todas nascidas a termo; 37 semanas ou mais. O percentil 10 de peso foi considerado o parâmetro de nutrição intrauterina. Os nascidos com percentil igual ao menor que 10 de peso, são considerados desnutridos; e os nascidos com percentil maior que 10 de peso como nutridos. O peso e percentil foi utilizado como indicadores do estado nutricional, devido a facilidade de obtenção, praticamente nula margem de erro de medida e por se tratar de parâmetro reconhecidamente representativo como medida isolada para esta análise. O percentil de peso foi calculado através da curva de crescimento pós-natal[35].

Os pacientes foram numerados conforme a ordem de processamento das culturas, e distribuídos nos grupos ao qual pertenciam.

Estão assim constituídos os grupos:

- a) Grupo 1: Três crianças operadas no primeiro mês de vida e nascidas com percentil e peso maior que 10, apresentados como os pacientes de número 8, 9 e 12. As duas primeiras crianças portadoras de hidrocefalia associada a mielomeningocele e a terceira, hidrocefalia congênita.
- b) Grupo 2: Três crianças operadas no primeiro mês de vida e nascidas com percentil de peso menor ou igual a 10, apresentados como os pacientes de

número 3,5 e 6. As duas primeiras portadoras de hidrocefalia associada a mielomeningocele e a terceira com hidrocefalia congênita.

- c) Grupo 3: Três crianças operadas entre o primeiro e o sexto mês de vida e nascidas com percentil de peso maior que 10, apresentados como os pacientes 1,7 e 10. As três portadoras de hidrocefalia congênita.
- d) Grupo 4: Três crianças operadas entre o primeiro e o sexto mês de vida e nascidas com percentil de peso menor ou igual a 10, apresentados como os pacientes 2,4 e 11. As duas primeiras portadoras de hidrocefalia associada a mielomeningocele e a terceira com hidrocefalia congênita.

Todas as crianças foram operadas com o mesmo neurocirurgião, e com a técnica de derivação ventricular ao peritônio. Estavam todas acima de 2 Kilos, e na sua primeira cirurgia de hidrocefalia.

3.3 Isolamento e cultivo de fibroblastos da pele do couro cabeludo

Foram realizadas biópsias de pele do couro cabeludo das crianças, no período de janeiro de 2014 a junho de 2018. A pele no tamanho aproximado de 5 mm, foi fatiada em pequenos fragmentos com bisturi e acondicionados de forma estéril com Soro Fisiológico 0,9% e Gentamicina na diluição de 160 mg/L. O frasco com o material foi imediatamente levado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG para processamento.

Os fibroblastos isolados do couro cabeludo foram cultivados em meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium high-glucose*), suplementado com 5 mmol/L de bicarbonato de sódio (*Vetec*[®]), 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (*PSA - Sigma-Aldrich*[®]). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (*Millipore*[®]). A suplementação do meio de cultura foi realizada com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% V/V (*Cripion*).

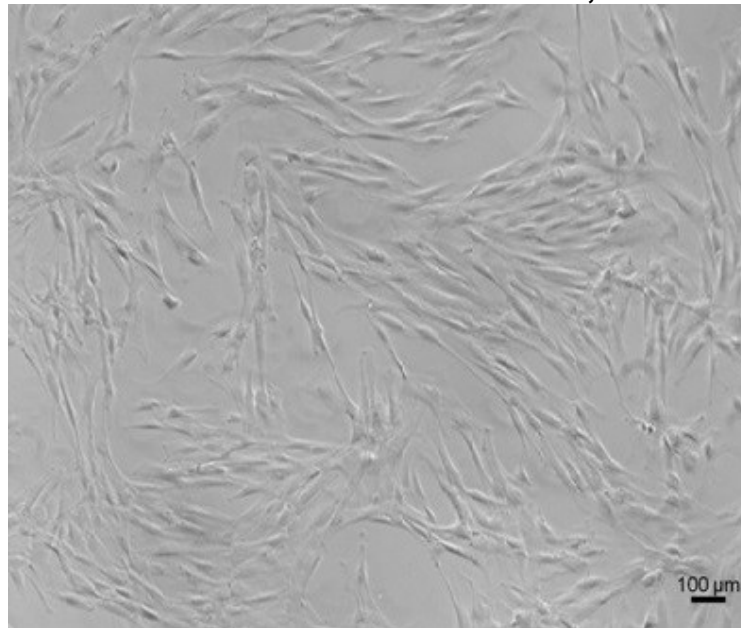
Em capela de fluxo laminar, os fragmentos de pele foram colocados em tubo cônico de polietileno de 15 mL (Falcon) estéril e, em seguida, centrifugado por 7 minutos a 234 xg em tampão salina fosfato 0,15 mol/L, pH 7,2 (PBS), no intuito de isolar no

sobrenadante as células gordurosas, sanguíneas e impurezas que dificultam a aderência das células nas placas de cultura. Após descarte do sobrenadante, foi acrescentado 2 mL de solução de colagenase tipo I, 0,10% *m/V* (*Thermo Fisher Scientific*), para digestão da matriz extracelular, por 90 minutos, em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo o tecido era agitado vigorosamente para facilitar a ação da colagenase. O tubo foi centrifugado novamente a 234 *xg* por 7 minutos a temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo a pele com a fração celular foi ressuspensão em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% *V/V* e transferido como explante para dois poços de placas de cultura celular que foram mantidas em estufa 37 °C, atmosfera úmida e 5% *V/V* CO₂. Após dois dias de repouso, o conteúdo das placas de cultura foi novamente transferido para tubos de polietileno (15 mL) e centrifugado a 234 *xg* por 7 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado ressuspensão em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% *V/V* e recolocado nas placas de cultura.

A cada dois dias o meio de cultura era removido, o poço da placa lavado com 1 mL de PBS para remoção de células sanguíneas e gordurosas residuais e fibroblastos não aderentes, e recolocado 1 mL de DMEM suplementado com SFB 10% *V/V*. As placas eram vistas ao microscópio até que fossem observados grupos de fibroblastos aderidos, o que ocorria em torno de 7 dias. Os fragmentos de pele eram então descartados e após alguns dias, com uma maior densidade de células, eram transferidas a garrafas de cultura celular.

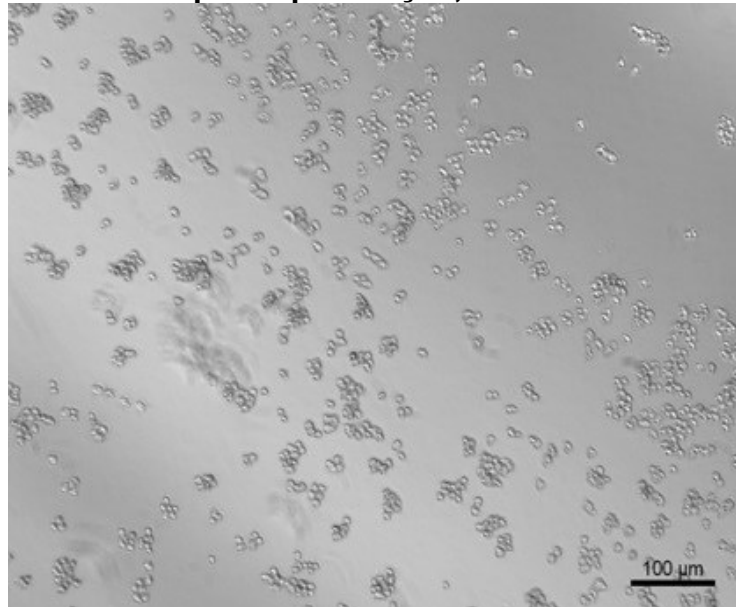
Quando as células atingiam 80% de confluência na garrafa (figura 1), o meio de cultura era retirado, as células lavadas com PBS e tratadas com tripsina 0,05% *m/V* EDTA (Sal Dihidratado Dissódico *Life Technologies*®), por 5 minutos (figura 2). Após a ação da tripsina, a garrafa recebia meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% *V/V* na proporção de 3 vezes o volume da tripsina para sua inativação, e a suspensão formada colocada em mais garrafas. Inicialmente foi utilizada a garrafa de cultura celular T-25 (*Sarstedt*®), a seguir a garrafa T-75 (*Sarstedt*®). O volume de PBS, tripsina e DMEM suplementado com SFB 10% *V/V* foi proporcional ao volume dos frascos de cultura em cada passagem. Este procedimento foi repetido até as células atingirem a quarta passagem, que foi utilizada em todos os ensaios.

Figura 1 – Fotomicrografia do aspecto morfológico ao microscópio óptico dos fibroblastos aderidos a uma confluência de 80%, com aumento de 4x



Fonte: Arquivo da autora.

Figura 2 – Fotomicrografia do aspecto morfológico ao microscópio óptico dos fibroblastos após tripsinização, com aumento de 4x



Fonte: Arquivo da autora.

3.3.1 Curva de crescimento celular

A curva de crescimento dos fibroblastos cultivados no meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% V/V foi realizada pela contagem do número de células nos dias 0,3,6 e 8. Foi possível calcular o tempo de duplicação celular e o comportamento da proliferação de cada grupo. Foi seguido protocolo em Apêndice B.

Inicialmente, 1×10^4 células, na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas a 37 °C, atmosfera úmida e 5% V/V CO₂.

Para plaquear a quantidade de 1×10^4 células, as células foram removidas das garrafas de cultura, após retirada do DMEM com SFB 10% V/V, lavadas por duas vezes com 7 ml de PBS e 1 mL de tripsina 0,05% m/V com EDTA a seguir. Após 5 minutos na estufa a 37 °C, 5% V/V CO₂, e verificação ao microscópio da presença da forma esférica do fibroblasto, a tripsina foi inativada com meio DMEM com SFB 10% V/V, na proporção de 3 vezes o volume utilizado da enzima. Posteriormente, foram colocadas em tubos de Falcon de 15 mL, centrifugadas a 2343636FR xg por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspensão com 1 mL de DMEM com SFB 10% V/V. Foram retirados 10 µL da solução com células, acrescentado 90 µL de tampão TUEK, e desta mistura foram retirados 10 µL por vez e colocado nas duas laterais da câmara de Neubauer, aplicado o fator de diluição da câmara e calculado o volume que contém 1×10^4 células. Este volume foi colocado em 4 placas de cultura, em três poços de cada, uma para cada dia de contagem. O tempo zero variou conforme a aderência das células e confluência, observadas ao microscópio ótico. Células mais lentas precisaram de até dez horas para serem contabilizadas. A partir do tempo zero a contagem seguiu 72 horas (dia 3), 72 horas (dia 6) e 48 horas (dia 8). Para a contagem foi colocado 150 µL de tripsina em cada um dos três poços, ação por 5 minutos, confirmação ao microscópio da forma esférica dos fibroblastos, neutralização com 350 µL de DMEM com SFB 10% V/V, transferência a três tubos de Pindorf e contagem na câmara de Neubauer. Cada lado da câmara de Neubauer recebeu 10 µL dos tubos de Pindorf. A média das três contagens foi utilizada para a construção dos gráficos.

3.3.2 Ensaio de viabilidade celular por meio da metabolização do MTT por fibroblastos

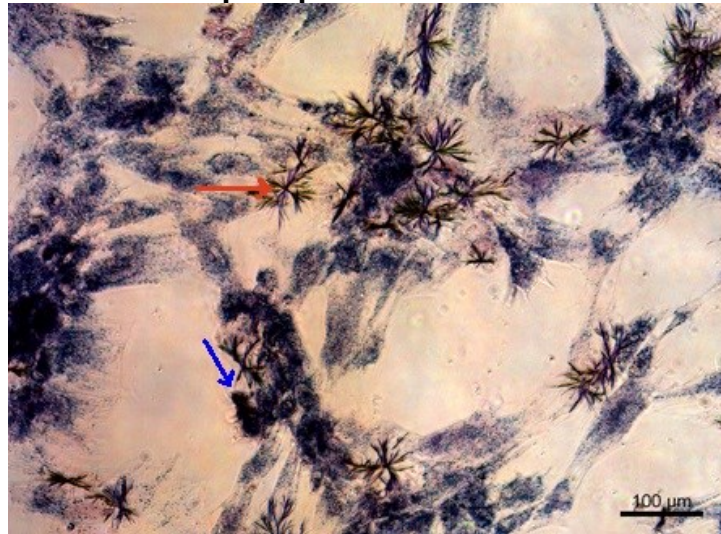
O ensaio de MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes em células viáveis, em converter o sal de MTT em cristais de formazan. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais produzidos. É um ensaio de sobrevivência das células [36].

Somente as células vivas em cada momento são capazes de formar os cristais, e então morrem após a reação.

As células cultivadas no meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% V/V, foram plaqueadas em 12 poços da placa de 24 poços (*Sarstedt*[®]) na densidade de 1×10^4 células/poço contendo 1 mL de meio de cultura. As células foram incubadas à 37 °C, atmosfera úmida e 5% V/V CO₂ e analisadas em diferentes tempos: 1, 3, 6 e 8 dias. O meio foi renovado a cada dois dias de cultivo.

Para cada período de análise, o meio de cultura suplementado foi removido em 3 poços, sendo adicionado 210 µL/poço do meio de cultura DMEM com SFB 10% V/V. Em seguida, acrescentados 170 µL/poço de solução de MTT (5 mg/mL) (*Life Technologies*[®]) e a placa foi incubada em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio de luz (MOTIC AE2000) para visualização dos cristais de formazan (figura 3) e estes foram solubilizados por meio da adição de 210 µL/poço de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 10%-HCl - ácido clorídrico 0,01 mol/L e 10% V/V de dodecil sulfato de sódio em água), para gerar a cor para leitura. Então foram incubados em estufa a 37 °C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Após esse período, 100 µL de cada um dos 3 poços foi transferido para uma placa de 96 poços de fundo reto (*Nunc*[®]), e um poço contendo apenas SDS e MTT, sem células para controle do dia. A densidade óptica foi calculada pela leitura da cor no espectrofotômetro no comprimento de onda a 595 nm, utilizando um leitor de ELISA, no final do oitavo dia, já que fica estática a formação de cristais a partir da morte celular.

Figura 3 – Fotomicrografia de fibroblastos com cristais de formazan vista ao microscópio óptico em aumento de 4x



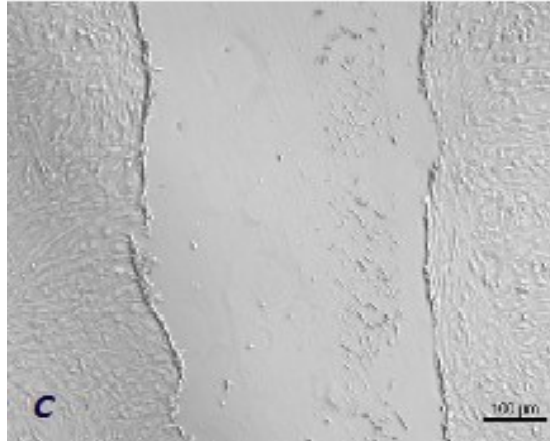
Fonte: Arquivo da autora.

3.3.3 Taxa de migração dos fibroblastos: Scratch

As células foram plaqueadas em 6 poços, na densidade de 5×10^5 e cultivadas até uma confluência de 80%, que foi alcançada em dois a sete dias. O meio DMEM suplementado com SF 10% V/V, foi substituído por DMEM sem suplementação por 24 horas. O objetivo foi reduzir a oferta metabólica, inibindo a mitose e com isso considerar o fechamento da ferida essencialmente uma função migratória[36].

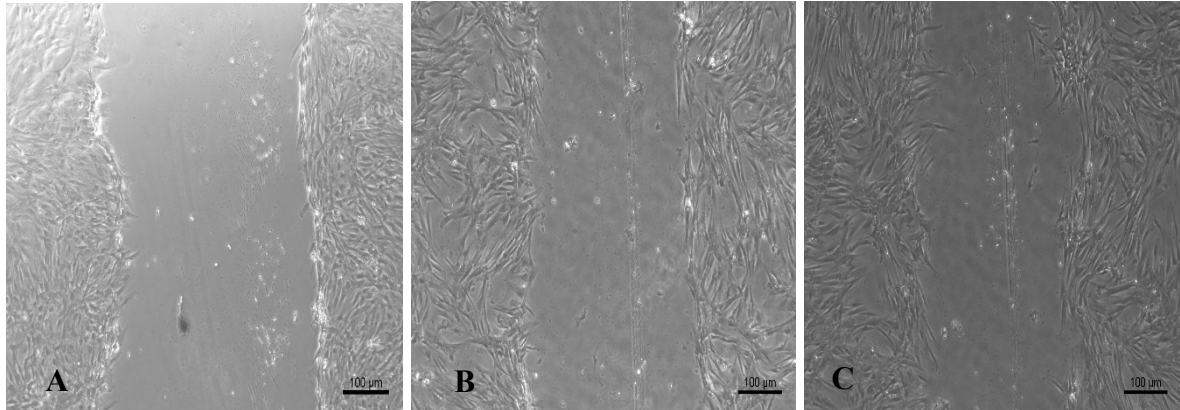
No outro dia foi retirado o meio DMEM, realizada a ferida (*scratch*) com ponteira de 1 mL e lavado com PBS para retirar os precipitados celulares. Foram colocados 2 mL de meio sem soro em cada poço. O local onde a ferida apresentava limites mais definidos foi marcado na tampa da placa para ser fotografado em cada tempo (figura 4). Foram fotografados o tempo zero, 6 horas, 10 horas e 24 horas (figura 5). As porcentagens de fechamento da ferida foram determinadas por fotos através do Programa *Image Pro Plus MDR*, onde foi feito o envelopamento das bordas da ferida e medida a área (figura 6). A taxa de migração foi calculada e representada em gráficos.

Figura 4 – Fotomicrografia das células do paciente 8 após realização do scratch



Fonte: Arquivo da autora.

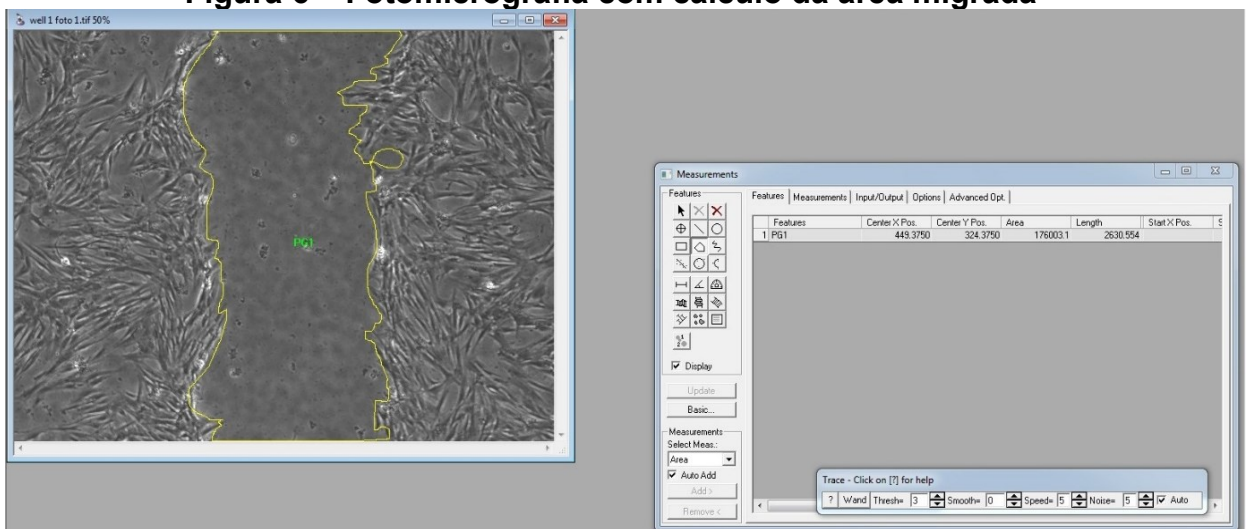
Figura 5 – Fotomicrografias das migrações dos fibroblastos do paciente 8 na área da ferida em 6 horas, 10 horas e 24 horas.



Legenda: Em (A) está a fotomicrografia das áreas da ferida após 6 horas. Em (B) as células após 10 horas e em (C) após 24 horas.

Fonte: Arquivo da autora.

Figura 6 – Fotomicrografia com cálculo da área migrada



Fonte: Arquivo da autora.

3.4 Análise estatística

Os resultados estatísticos foram obtidos por análise no programa *GraphPad Prism* 6.05. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para se avaliar os dados de crescimento celular. Este modelo é mais útil ao se avaliar populações, pois leva em conta uma dinâmica mais real, cujo crescimento exponencial é travado por algum motivo. No caso de células em cultura, a expansão permite apenas a formação de uma monocamada, e o consumo dos recursos ofertados às células, são limitados pelo meio de cultura. Deste modo, o crescimento exponencial sempre é observado em um primeiro momento, mas se o período de tempo observado for longo o suficiente ou o crescimento for rápido, a comunidade celular estudada vai se diferenciar em seu comportamento. Nas observações *in vitro* observa-se uma fase estacionária[37].

As análises de viabilização celular utilizando a metabolização do MTT e migração celular foram plotadas em histogramas e os dados analisados com *one-way ANOVA*, para ver a diferença entre as médias dos grupos. O pós-teste de *Tukey* foi utilizado para a correção na análise de múltiplas comparações, retornando um valor mais preciso da distribuição, o que se reflete em mais graus de liberdade. Todos os dados foram testados para se verificar uma distribuição Gaussiana através do teste de *Shapiro-Wilk*.

O teste-*F* com algoritmo de Critério de Informação de *Akaike* (AIC) foi utilizado para verificar a semelhança entre as regressões que foram analisadas em conjunto. Este teste determina quão bem cada modelo suporta os dados, isso se dá pela adequação do ajuste (soma dos quadrados) e o número de parâmetros no modelo. Os resultados são expressos como probabilidades de cada modelo estar correto, quanto mais perto de 100%, maior a chance daquele modelo ajustar os dados, porém, quanto menor, mais chances de outro modelo ser o correto. Não obstante, também é possível avaliar, pela soma dos quadrados, se um mesmo grupo de dados de uma curva são equiparáveis a um segundo grupo, isso para um mesmo tipo de ajuste. Os resultados também são apresentados na forma de porcentagens, sendo considerados corretos aqueles que apresentam maior probabilidade.

4 RESULTADO

4.1 Primeiro grupo: Neonatos com percentil de peso ao nascimento > 10

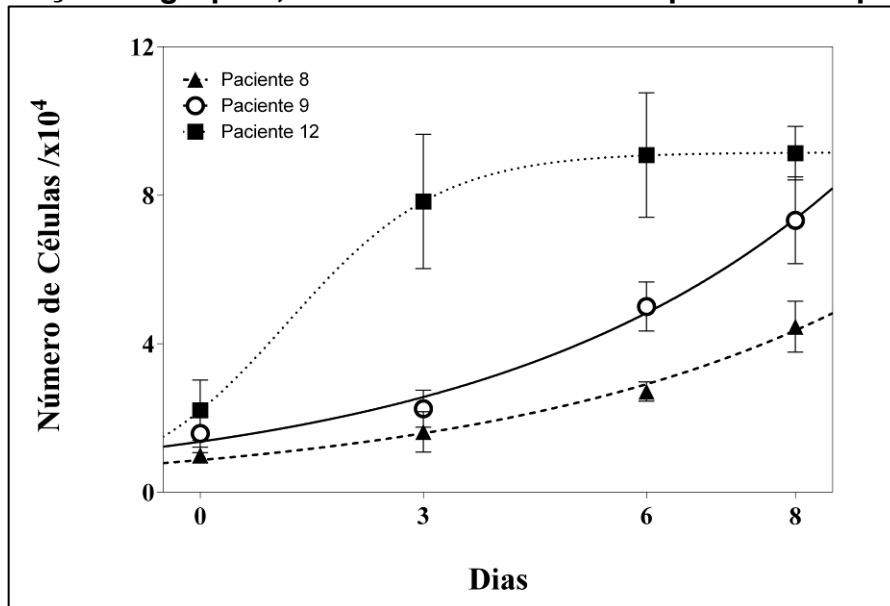
O primeiro grupo, correspondente aos pacientes 8, 9 e 12, é composto por neonatos com peso de nascimento acima do percentil 10 de peso. As duas primeiras crianças eram portadoras de hidrocefalia secundária a mielomeningocele e a terceira tinha o diagnóstico de hidrocefalia congênita.

A criança 8 foi operada no 12º dia de vida, a criança número 9 no 10º dia de vida, e a criança 12 no 25º dia de vida.

Os dados dos pacientes com hidrocefalia secundária a mielomeningocele apresentaram curva de crescimento semelhantes, porém se destoam quando comparados com o paciente com hidrocefalia congênita, que apresentou um crescimento celular mais rápido.

O paciente 12 apresentou um crescimento inicial rápido, mas logo alcançou uma fase estacionária.

Figura 7 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 1, neonatos nascidos com percentil de peso > 10



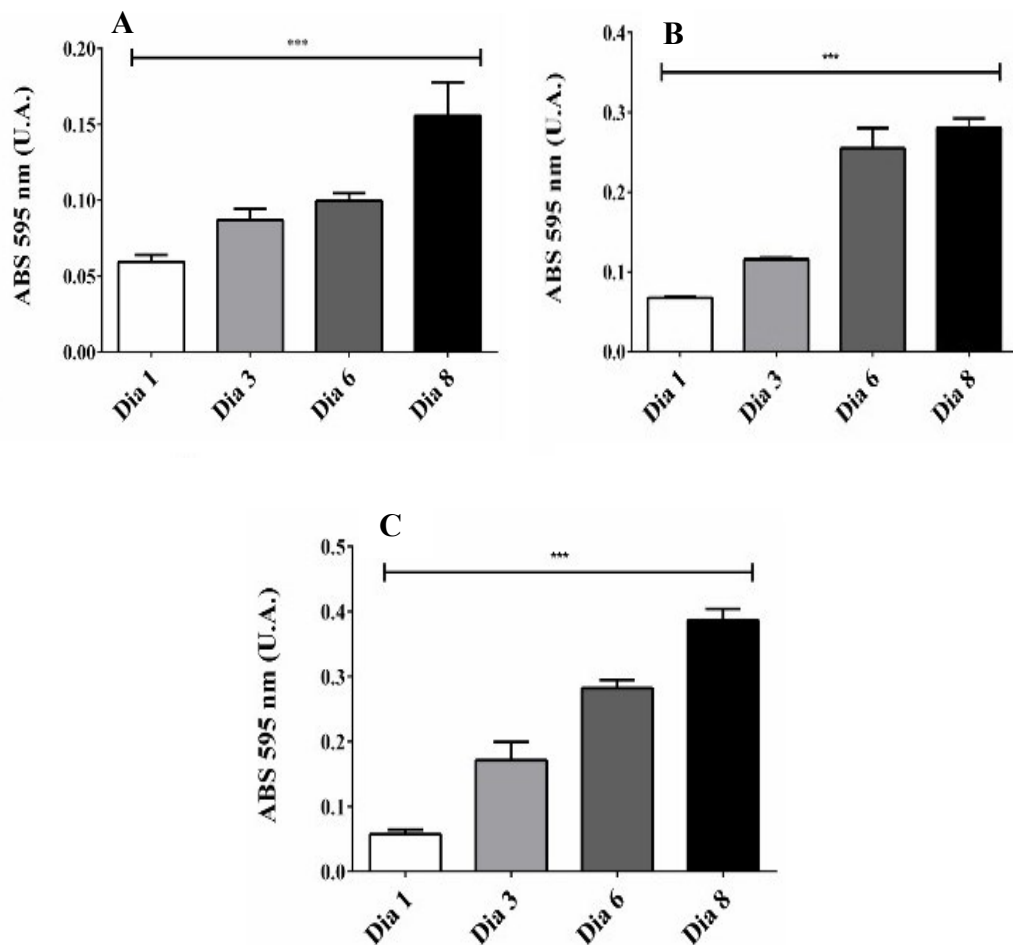
Legenda: Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Quando se observa a figura 7 com a curva de crescimento dos fibroblastos das três crianças do grupo 1, percebe-se que a curva de crescimento dos fibroblastos da criança 12, distoa no seu formato das curvas das crianças 8 e 9. Isto ocorre porque a aderência dos fibroblastos difere muito em cada início de contagem, ou seja, no dia Zero. Ao se passar para uma escala única, há a impressão de que a forma sigmoide é encontrada apenas na curva de crescimento dos fibroblastos da criança 12. A escala é proporcional ao número de células, e quando analisada a curva de cada crescimento individualmente (Apêndice C), percebemos que há o formato sigmoide nas três curvas deste grupo.

A metabolização do MTT pelos fibroblastos no grupo 1 mostrou um aumento da sobrevivência significativa a cada contagem. Em todos os grupos os fibroblastos permaneceram viáveis durante todo o período em que o ensaio de crescimento foi realizado. Neste grupo o crescimento mais lento dos fibroblastos dos pacientes 8 e 9 não foi devido a morte celular e sim a um retardo da proliferação. Os fibroblastos do paciente 12 apresentaram um padrão mais uniforme de viabilidade.

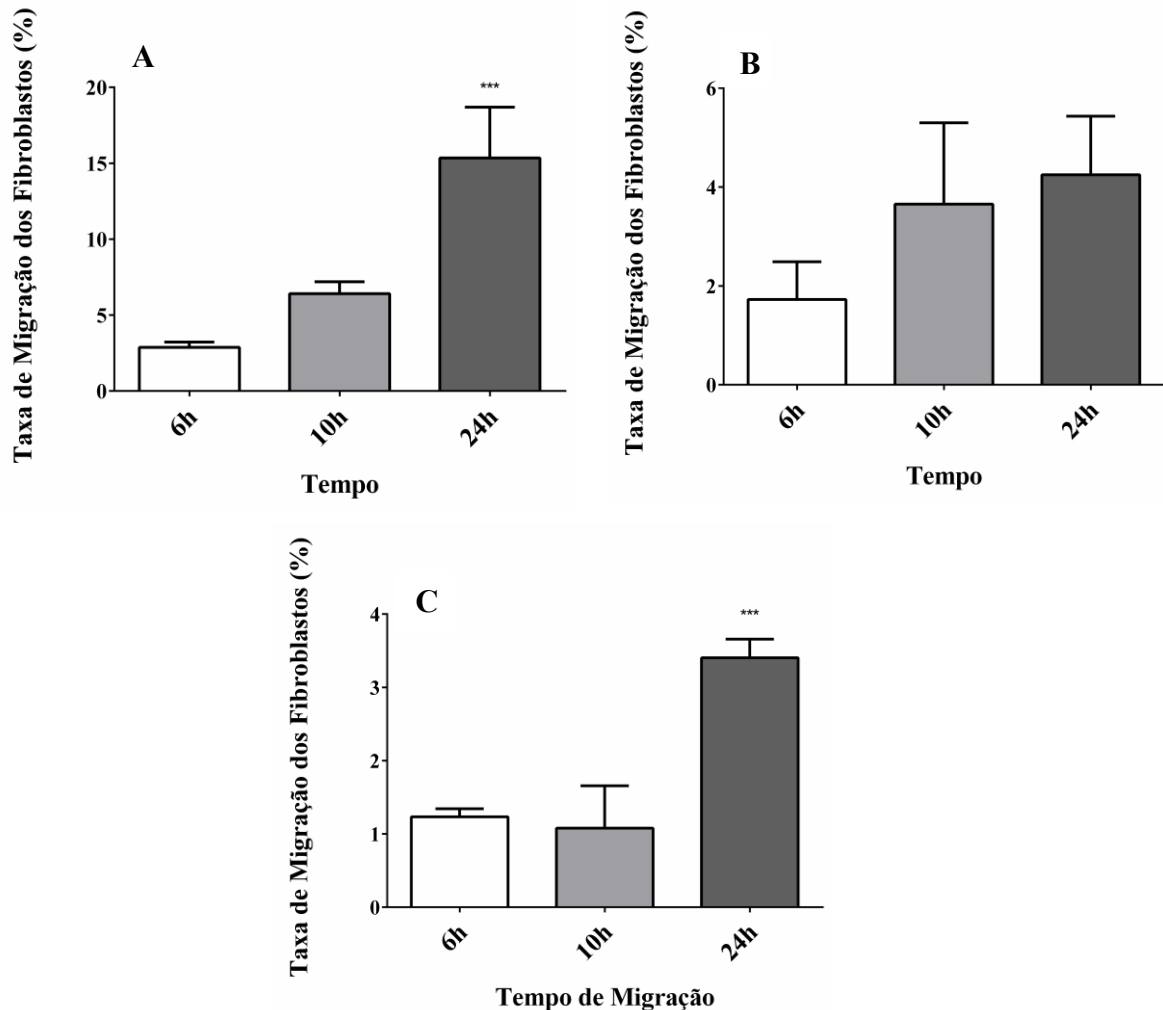
Figura 8 – Representação gráfica da metabolização dos fibroblastos do grupo 1, neonatos nascidos com percentil de peso > que 10



Legenda: Em (A) a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 8. Em (B) a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 9. Em (C), a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 12. Os dados de viabilidade celular com MTT foram analisados utilizando one-way ANOVA e pós teste de Tukey. O símbolo *** e a barra na representação da metabolização dos fibroblastos deste grupo indicam que todos os dias são significativamente diferentes em relação uns aos outros, para $p < 0,001$. Fonte: Elaborado pela autora.

A taxa final de migração celular em porcentagem obtida foi semelhante entre as crianças do estudo, porém somente no tempo 24 horas do *scratch* que os pacientes 8 e 12 apresentaram maior migração dos fibroblastos (figura 9).

Figura 9 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos de neonatos nascidos com percentil de peso > 10



Legenda: Em (A) a migração dos fibroblastos do paciente 8, em (B) a migração dos fibroblastos do paciente 9 e em (C) a migração dos fibroblastos do paciente 12. Os dados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo *** indica que o tempo é estatisticamente diferente em relação aos outros, $p < 0,001$. Os fibroblastos das crianças (A) e (B), apresentaram migração significativa apenas no tempo 24h.

Fonte: Elaborado pela autora.

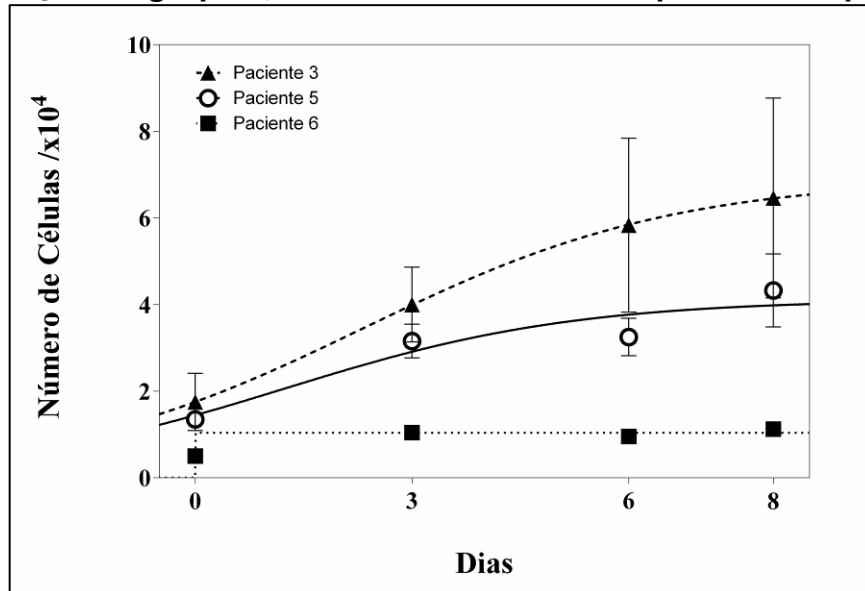
4.2 Segundo grupo: Neonatos nascidos com percentil de peso \leq a 10

O segundo grupo foi composto por neonatos com percentil de peso ao nascimento \leq a 10, ou seja, apresentam índices de desnutrição intrauterina, e correspondem aos pacientes 3, 5 e 6. As crianças 3 e 6 eram portadoras de hidrocefalia associada a mielomeningocele e a 5 com hidrocefalia congênita.

A criança 3 foi operada no 13º dia de vida, a criança 5 no 5º dias de vida, e a criança 6 no 21º dia de vida. A curva de crescimento dos fibroblastos deste grupo está

representado na figura 10. O paciente 6, portador de hidrocefalia associada a mielomeningocele, quase não apresentou crescimento no tempo do estudo.

Figura 10 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 2, neonatos nascidos com percentil de peso ≤ 10



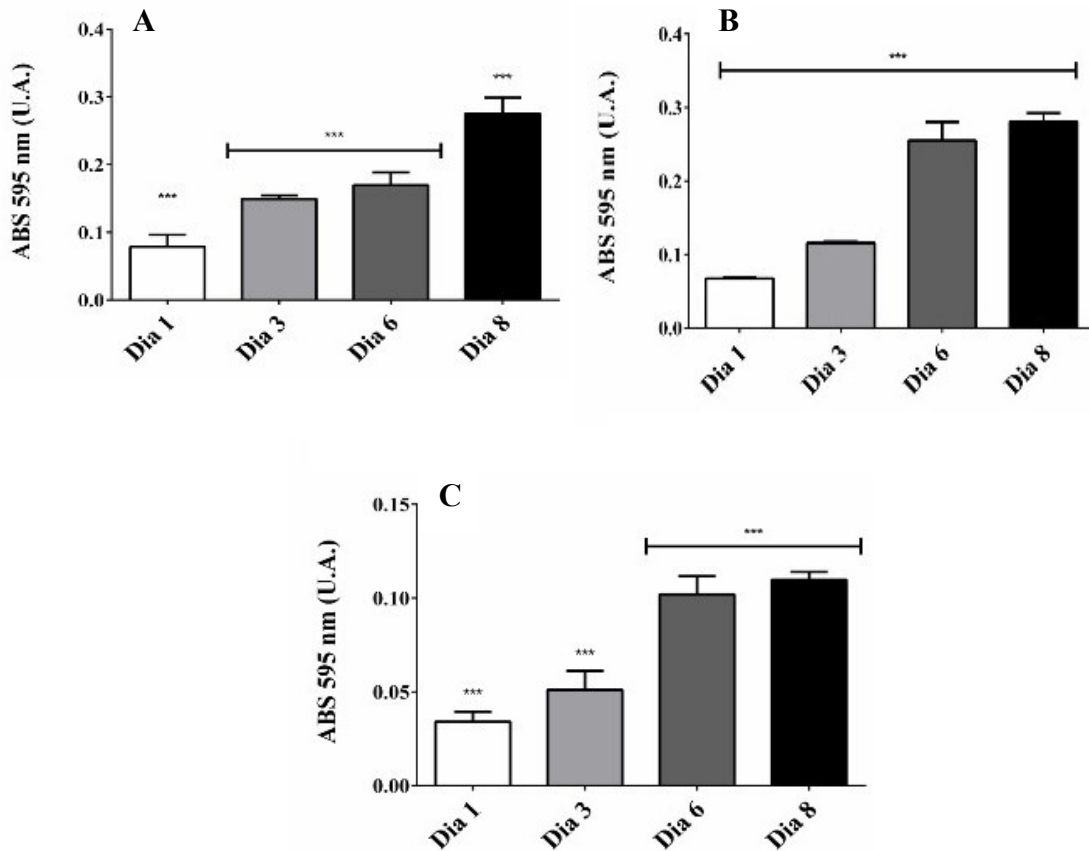
Legenda: Os resultados dos ensaios foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 10 os fibroblastos da criança 6 quase não apresentaram crescimento. A aderência das células no tempo zero e o crescimento apresentado, influencia a escala, e quando as três curvas são colocadas em uma escala única, não se percebe o formato da curva de crescimento da criança 6. O formato sigmoide é observado nas três curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo 2, quando estão individualizadas (Apêndice C).

A metabolização do MTT pelos fibroblastos no grupo 2 mostrou um aumento de sobrevivência a cada contagem. Em todos os grupos os fibroblastos permaneceram viáveis durante todo o período que o ensaio de crescimento foi realizado. O crescimento mais lento do paciente 6, não foi justificado por morte celular, pois a viabilidade se mostrou semelhante aos outros dois.

Figura 11 – Representação gráfica da metabolização do MTT por fibroblastos dos pacientes do grupo 2, neonatos nascidos com percentil de peso ≤ 10

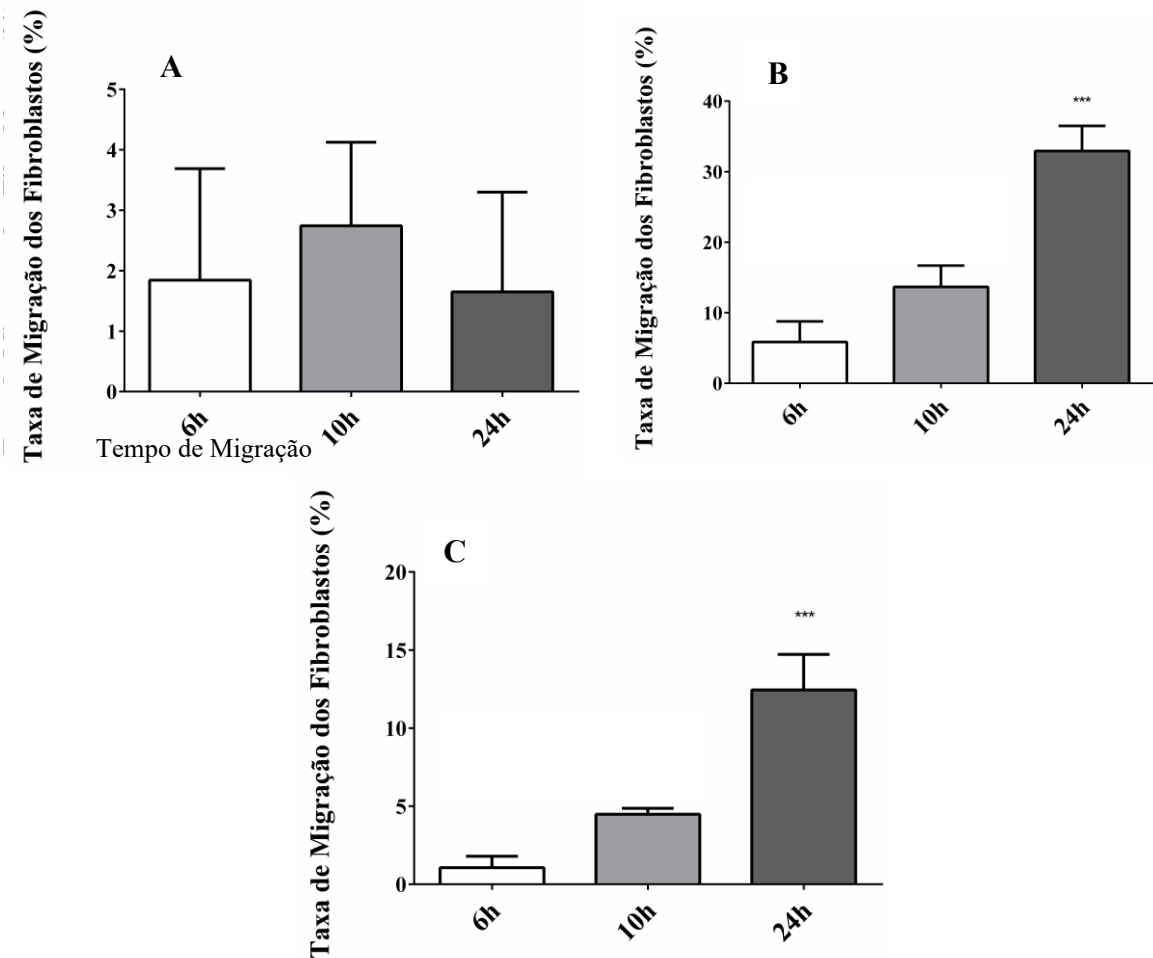


Legenda: Em (A) a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 3. Em (B) a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 5. Em (C) a metabolização do MTT pelos fibroblastos do paciente 6. Os dados de viabilidade celular com MTT foram analisados utilizando one-way ANOVA e pós teste de Tukey. Em (A), o símbolo *** indica que o dia 8 é significativamente diferente dos demais grupos e a barra englobando os dias 3 e 6, que estes são semelhantes entre si, mas estatisticamente diferentes dos outros dias, $p < 0,001$. Em (B) o símbolo *** e a barra indicam que todos os dias são significativamente diferente, $p < 0,001$. Em (C), o símbolo *** indica que os dias são significativamente diferentes em relação aos outros e a barra nos dias 6 e 8 indica que ambos são semelhantes entre si, mas estatisticamente diferentes dos outros, para $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora.

A migração dos fibroblastos das crianças 5 e 6 seguiu o mesmo padrão, com uma taxa de migração significativa apenas em 24h. Os fibroblastos do paciente 3 apresentou uma regressão na ferida no tempo 24 horas (figura 12).

Figura 12 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 2



Legenda: Em (A) a migração dos fibroblastos do paciente 3, em (B) a migração dos fibroblastos do paciente 5 e em (C) a migração dos fibroblastos do paciente 6. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo *** na representação gráfica da migração dos fibroblastos em (B) e (C), indica que a taxa de migração das 6h e 10h são estatisticamente iguais entre si mas significativamente diferentes em relação a 24h, para $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora.

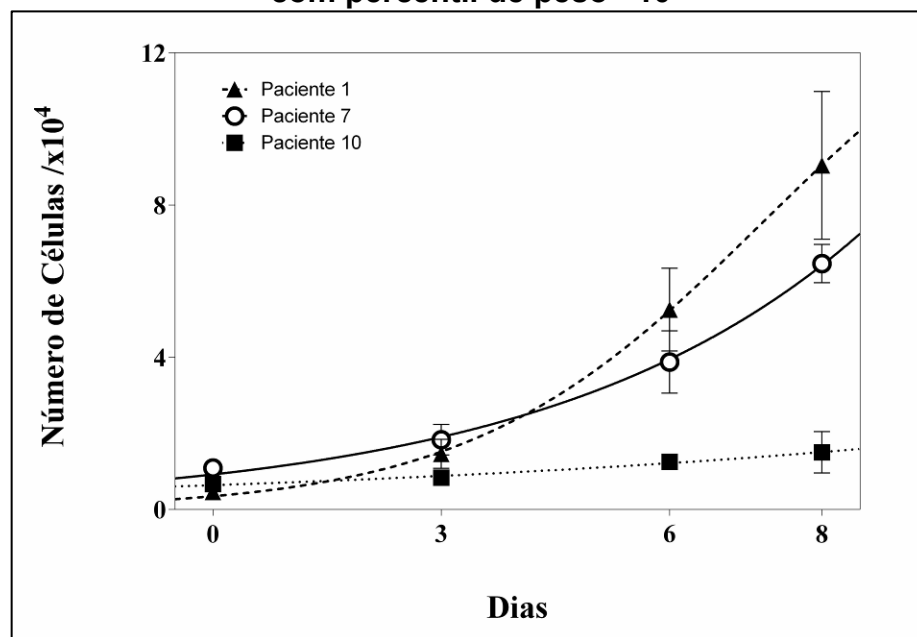
4.3 Terceiro grupo: Lactentes até 6 meses de vida, e nascidos com percentil de peso ao nascimento > que 10

O terceiro grupo foi composto por lactentes até 6 meses de vida e que nasceram com percentil de peso > que 10. Correspondem aos pacientes 1, 7 e 10. As três crianças eram portadoras de hidrocefalia congênita (Hidranencefalia, Dandy Walker e esquizencefalia, respectivamente).

A criança 1 foi operada aos 3 meses de vida, a criança número 7, com 6 meses de vida e a criança 10, com 2 meses de vida.

Os dados dos pacientes do terceiro grupo mostram uma taxa de crescimento celular semelhante entre os pacientes 1 e 7. O paciente 10 exibiu uma taxa muito lenta de crescimento celular (figura 13).

Figura 13 – Representação gráfica das curvas de crescimento dos fibroblastos das crianças do grupo3, lactentes operados até 6 meses de vida e nascidos com percentil de peso >10



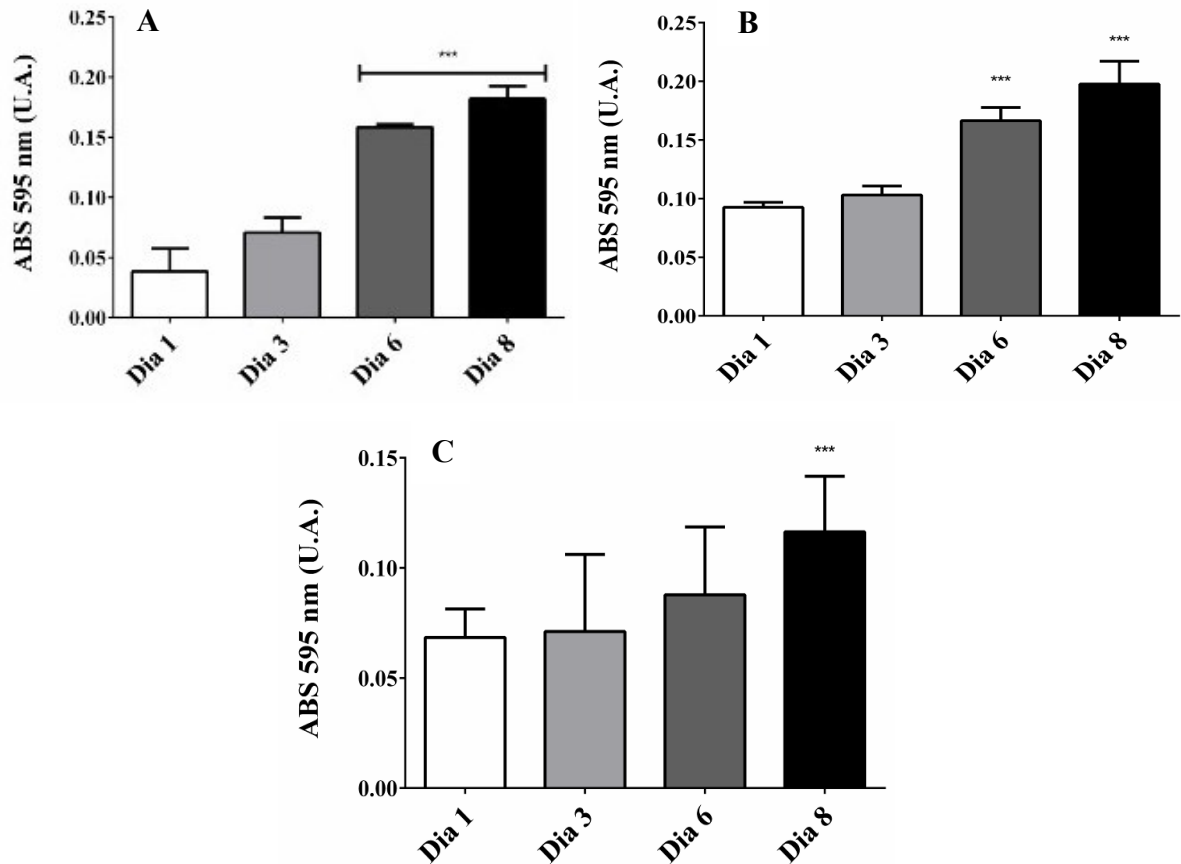
Legenda: Os resultados dos ensaios foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 13, os fibroblastos da criança 10 apresentaram um crescimento bem mais lento, dificultando a visualização do formato da sua curva de crescimento. O formato exponencial da curva de crescimento dos fibroblastos da criança 10, pode ser visto quando é individualizada (Apêndice C).

A metabolização do MTT pelos fibroblastos no grupo 3 mostrou um aumento de sobrevivência a cada contagem. Em todos os grupos as células permaneceram viáveis durante todo o período que o ensaio de crescimento foi realizado. O crescimento mais lento do paciente 10, não foi justificado por morte celular, pois a viabilidade final se mostrou progressiva e significativa em relação ao dia 1 e 3.

Figura 14 – Metabolização do MTT por fibroblastos das crianças do grupo 3, lactentes operados até 6 meses de vida e percentil de peso ao nascimento > 10

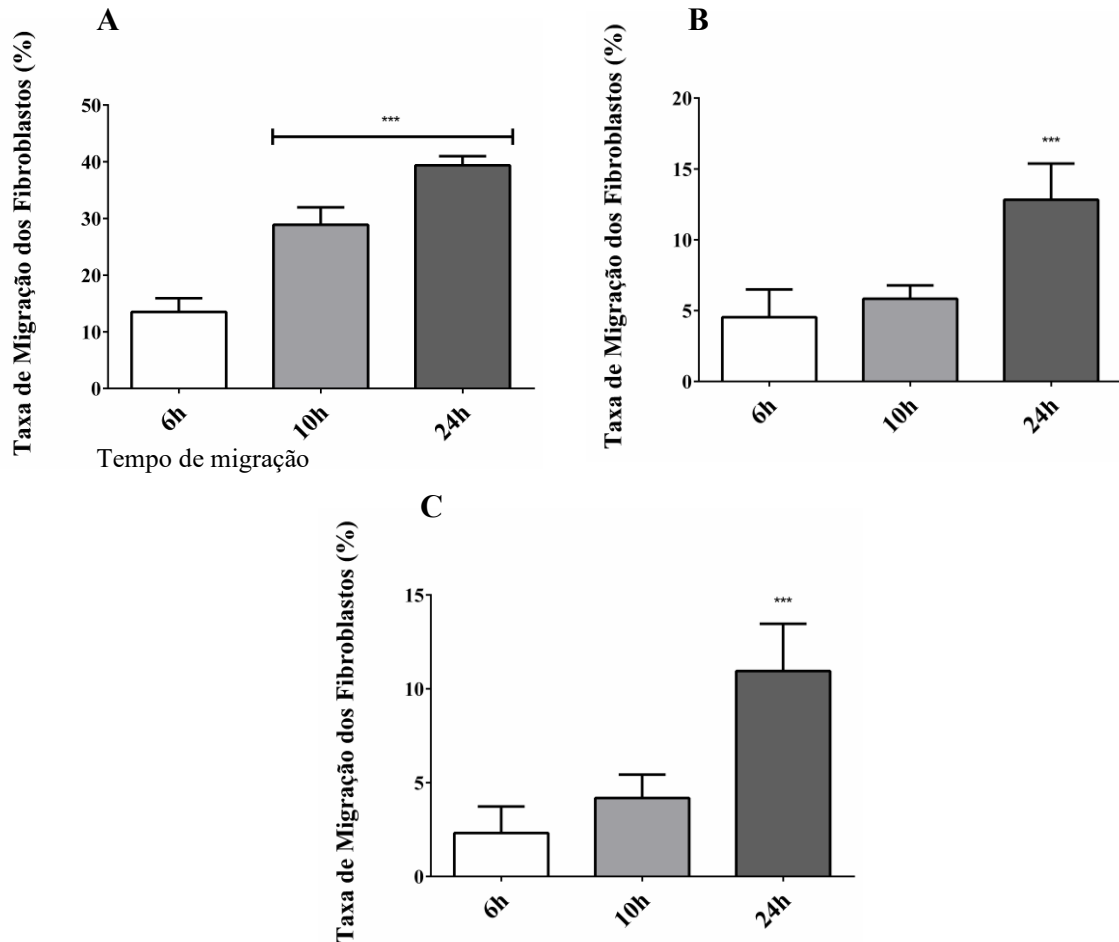


Legenda: Em (A) a metabolização do MTT por fibroblastos do paciente 1. Em (B) a metabolização do MTT por fibroblastos do paciente 7. Em (C) a metabolização do MTT por fibroblastos do paciente 10. Os dados de viabilidade celular com MTT foram analisados utilizando one-way ANOVA e pós teste de Tukey. Em (A) a barra indica que os dias 6 e 8 são estatisticamente iguais, e o símbolo *** que são significativamente diferentes dos dias 1 e 3, para $p < 0,001$. Em (B) o símbolo *** indica que ambos os dias 1 e 3 são significativamente diferentes dos dias 6 e 8, para $p < 0,001$. Em (C) o símbolo *** indica que o dia 8 é significativamente diferente dos demais dias, para $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora.

A análise da taxa de migração obtida dos fibroblastos das crianças do grupo 3 indica que os fibroblastos das crianças 7 e 10 migraram com mais regularidade, mas apresentaram uma taxa de migração semelhante em 24 horas aos fibroblastos da criança 1 (figura 15).

Figura 15 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 3, lactentes operados até 6 meses de vida e percentil de peso ao nascimento > 10



Legenda: Em (A) a migração do paciente 1, em (B) o paciente 7 e em (C) o paciente 10. Os dados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Em (A) O símbolo *** acima indica o tempo 6h é significativamente diferente de 10h e 24 h e a barra horizontal indica que 10h e 24 h são estatisticamente iguais entre si, $p < 0,001$. Em (B) e (C) o símbolo *** significa que 24h é significativamente diferente dos tempos 6h e 10h, $p < 0,001$.

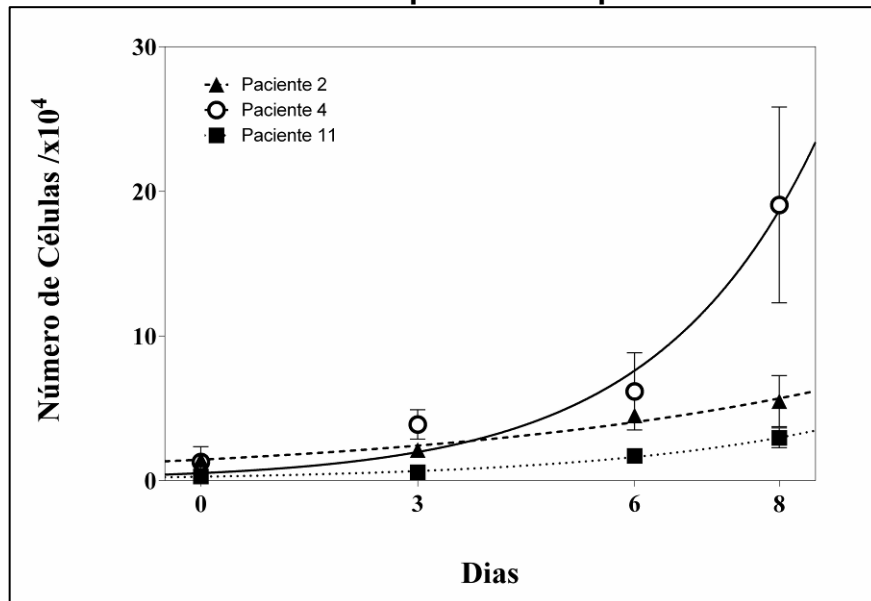
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Quarto grupo: Lactentes operados até 6 meses de vida, e nascidos com percentil de peso \leq a 10

O quarto grupo é de lactentes até 6 meses de vida, e que nasceram com peso no percentil \leq 10. Correspondem às crianças 2, 4 e 11. Os indivíduos 4 e 11 eram portadoras de hidrocefalia e mielomeningocele. A criança 2 era portadora de hidrocefalia congênita.

A criança 2 foi operada com 2 meses de vida, a criança 4 com 32 dias de vida, e a criança 11 com 3 meses de vida. Os gráficos comparativos do crescimento dos fibroblastos deste grupo, estão representados a seguir (figura 15).

Figura 16 – Representação gráfica das curvas de crescimentos dos fibroblastos dos pacientes do grupo 4, lactentes operados até 6 meses de vida e nascidos com percentil de peso ≤ 10



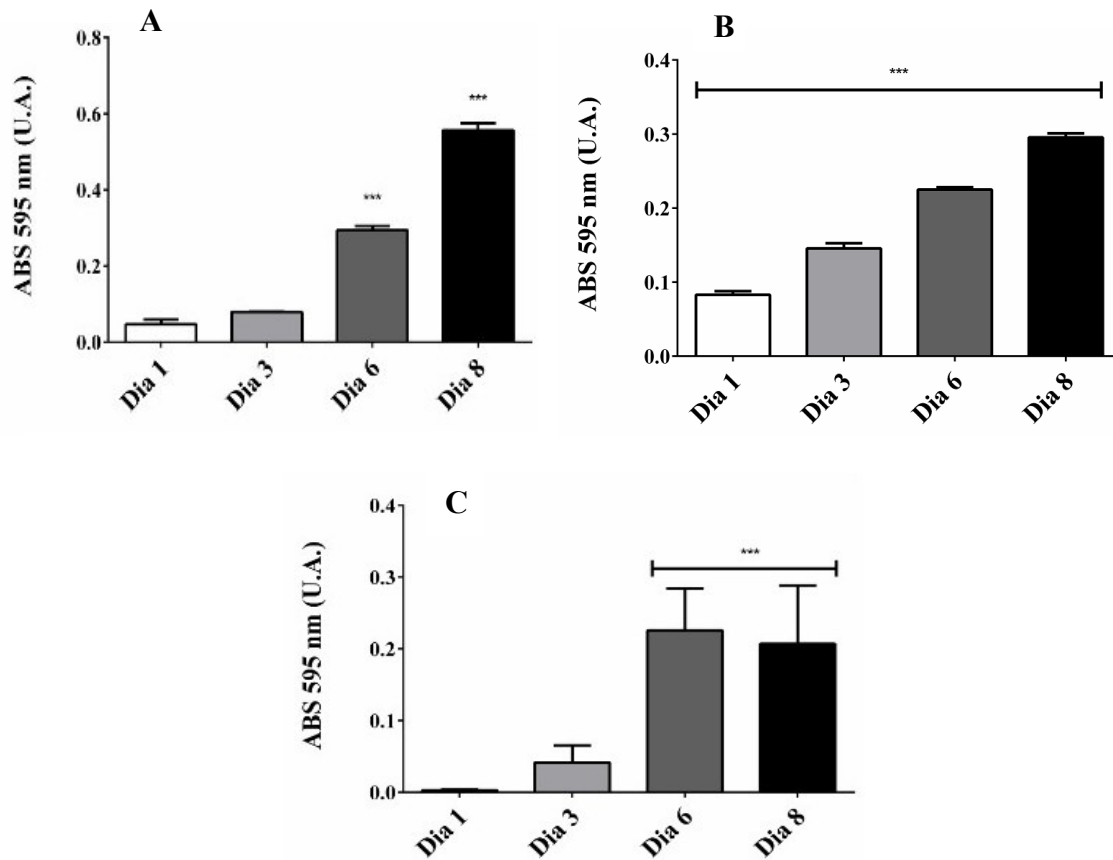
Legenda: Os resultados dos ensaios foram representados em gráficos analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na figura 16, os fibroblastos da criança 4, apresentaram uma velocidade de multiplicação muito maior que a dos outros dois grupos de fibroblastos, dificultando a interpretação do formato das curvas, quando se usa uma escala única para os três. Quando analisados individualmente, as três curvas apresentam um crescimento exponencial (Apêndice C).

A metabolização do MTT pelos fibroblastos no grupo 4 mostrou um aumento de sobrevivência a cada contagem nos fibroblastos das crianças 2 e 4. Os fibroblastos da criança 11 apresentou uma sobrevivência irregular, mas com viabilidade no dia 8 significativa em relação aos dias 1 e 3.

Figura 17 – Metabolização do MTT por fibroblastos dos pacientes do grupo 4, operados entre 1 e 6 meses de vida e com percentil de peso ao nascimento ≤ 10

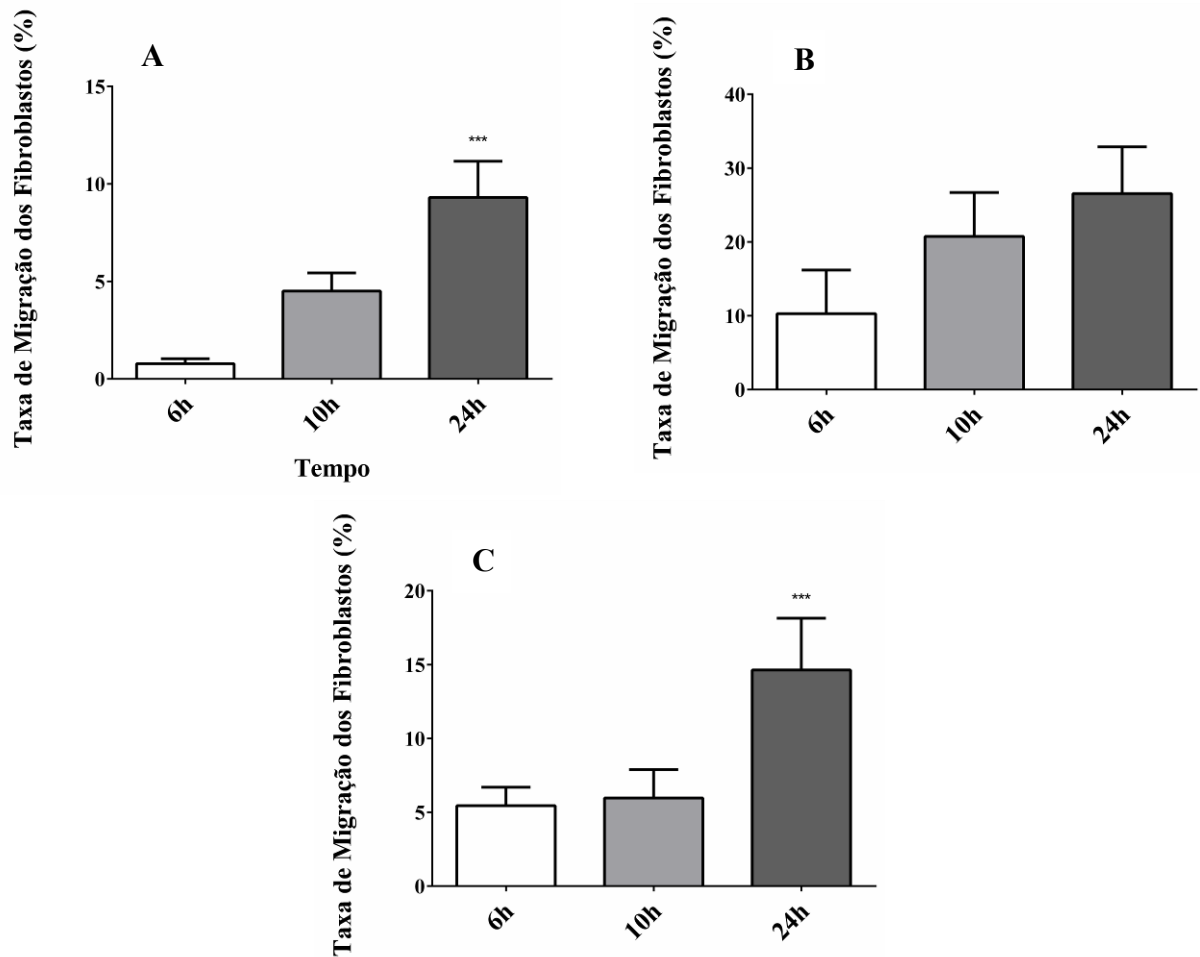


Legenda: Em (A) a metabolização do MTT por fibroblastos do paciente 2. Em (B) a metabolização do MTT dos fibroblastos do paciente 4. Em (C) a metabolização dos fibroblastos do paciente 11. Os dados de viabilidade celular com MTT foram analisados utilizando one-way ANOVA e pós teste de Tukey. Em (A), o símbolo *** acima indica que ambos os dias 6 e 8 são significativamente diferentes entre si e também dos dias 1 e 3, que são estatisticamente iguais entre si, para $p < 0,001$. Em (B), o símbolo *** acima e a barra indica que todos os dias são significativamente diferentes entre si, para $p < 0,001$. Em (C) a barra indica que os dias 6 e 8 são estatisticamente iguais entre si, e o símbolo *** que são significativamente diferentes dos dias 1 e 3, que são estatisticamente iguais.

Fonte: Elaborado pela autora.

A taxa de migração dos fibroblastos das crianças do grupo 4 se comportou de forma semelhante, e de forma mais regular no paciente 4. (figura 16).

Figura 18 – Representação gráfica da taxa de migração dos fibroblastos dos pacientes do grupo 4, operados entre 1 e 6 meses de vida e com percentil de peso ao nascimento ≤ 10



Legenda: Em (A) a migração dos fibroblastos do paciente 2. Em (B) a migração dos fibroblastos do paciente 4 e em (C) a migração dos fibroblastos do paciente 11. Analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo *** acima indica o tempo é significativamente diferente dos outros grupos, $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Comparação entre os grupos

Os dados obtidos de todos experimentos estão listados na tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros relativos ao crescimento, viabilidade e capacidade de migração dos fibroblastos dos quatro grupos analisados em conjunto

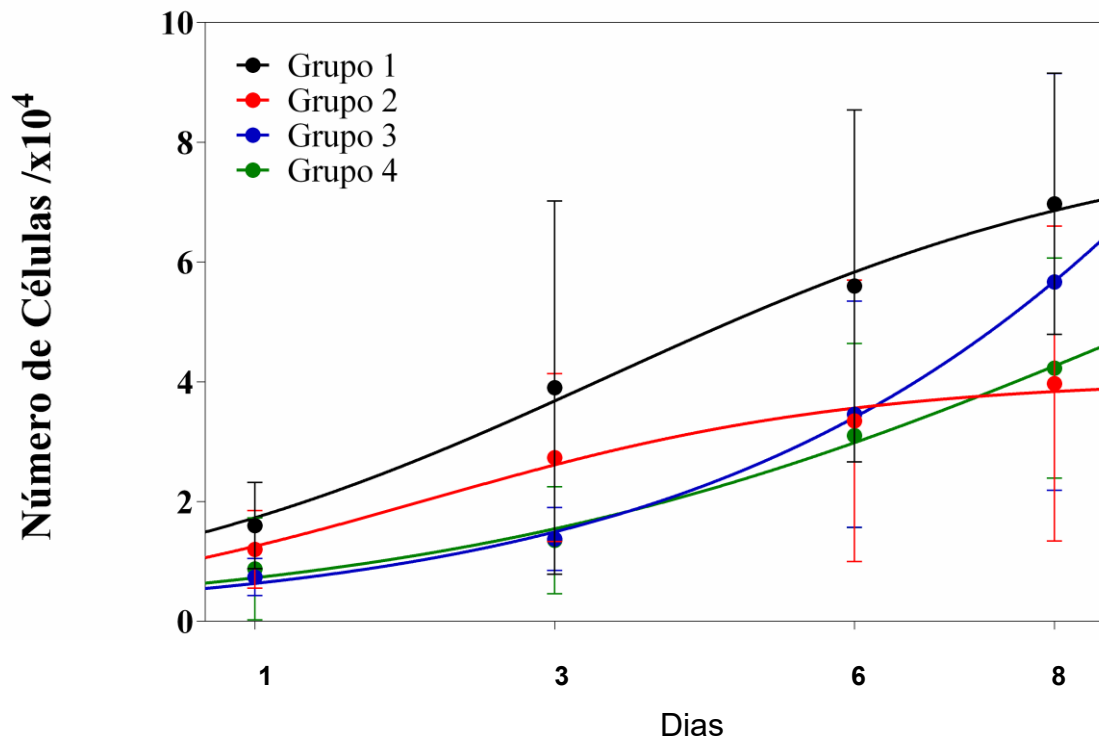
Grupo	Paciente	Duplicação (Dias)	Número de células ($\times 10^4$)*	Metabolização MTT (ABS)*	Taxa Migração em 24 h
1 <i>Neonatos nascidos com peso normal</i>	8	1,82 (1,24)	6,97 (2,18)	0,25 (0,12)	7,67 (6,54)
	9				
	12				
2 <i>Neonatos nascidos com peso abaixo do normal</i>	3	1,48 (1,25)	3,97 (2,63)	0,22 (0,10)	21,05 (14,18)
	5				
	6				
3 <i>Lactentes até 6 nascidos com peso normal</i>	1	2,34 (2,07)	5,67 (3,48)	0,17 (0,04)	15,68 (14,31)
	7				
	10				
4 <i>Lactentes até 6 meses nascidos com peso abaixo do normal</i>	2	2,44 (2,20)	4,23 (1,84)	0,35 (0,18)	16,83 (10,02)
	4				
	11				

Legenda: Os dados são mostrados com a média (Desvio padrão). *Os valores mostrados são os máximos obtidos após 8 dias de plaqueamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados mostraram algumas diferenças entre os grupos analisados, principalmente quando são colocados em avaliação a idade em que foram operadas as crianças (figura 19). O crescimento celular dos fibroblastos dos neonatos (grupos 1 e 2) é menor quando comparados aos lactentes operados até os 6 meses de vida (grupos 3 e 4) com o valor $F = 85,69\%$, ou seja, alta probabilidade de serem diferentes. Quando comparados os grupos 1 e o 2; ou seja; neonatos, mas com o segundo grupo de indivíduos com baixo peso ao nascer, há diferenças entre eles em relação a taxa de crescimento ($F = 97,79\%$). O mesmo não aconteceu entre os indivíduos dos grupos 3 e 4, que são semelhantes entre si.

Figura 19 – Representação gráfica de comparação entre os crescimentos dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos



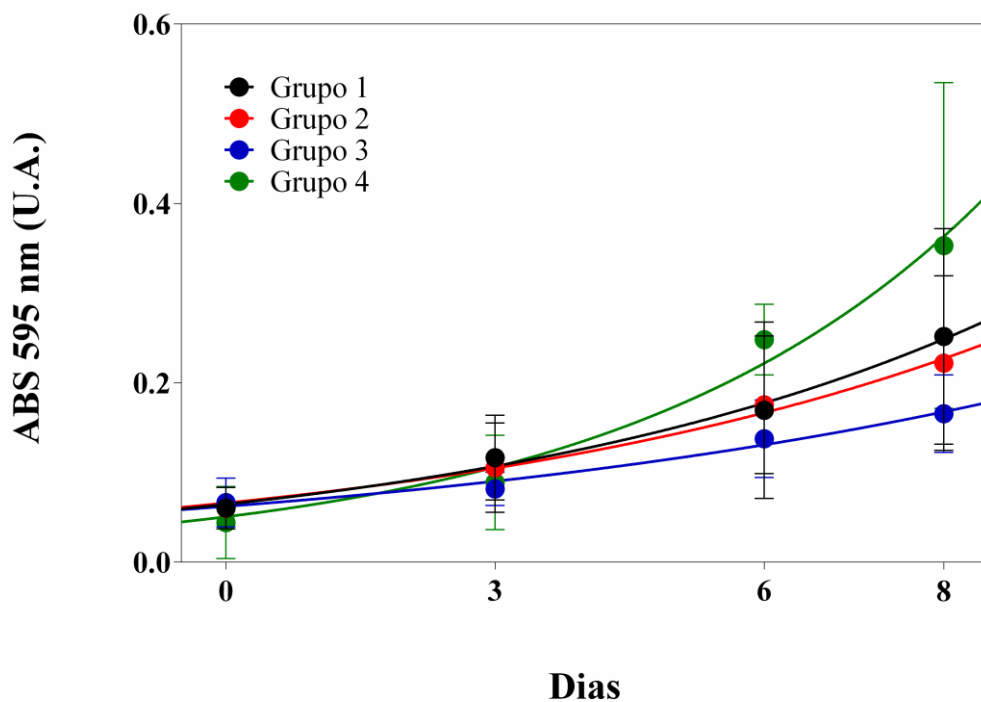
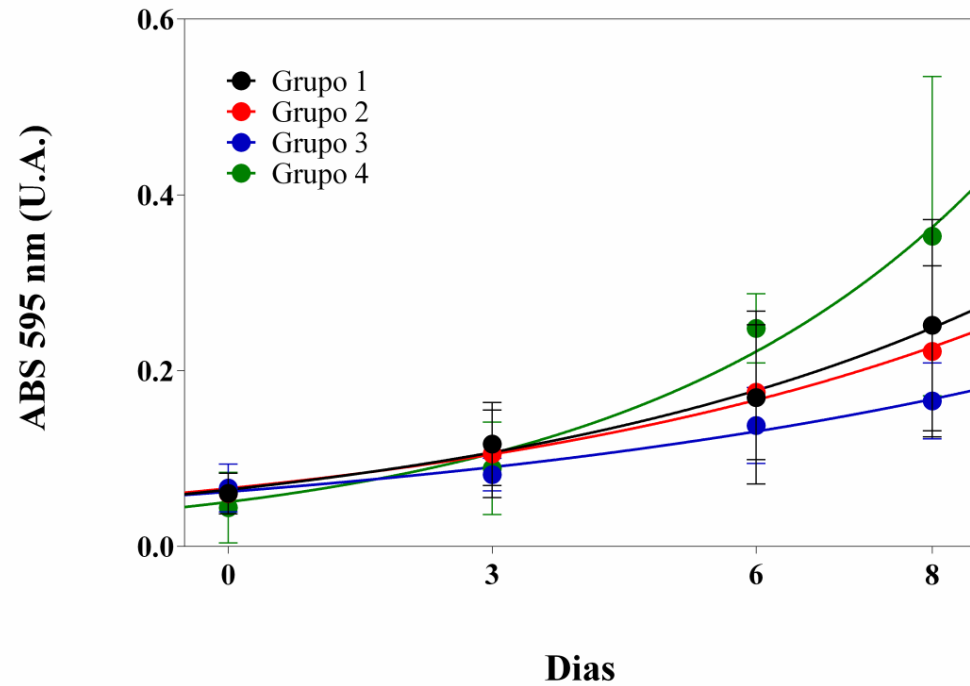
Legenda: Os resultados dos ensaios foram representados em gráficos analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O teste-F com algoritmo de Critério de Informação de Akaike (AIC) foi utilizado para avaliar a semelhança entre as regressões.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os dados da tabela 1 mostram que o tempo de duplicação médio entre os grupos foi parecido e estatisticamente iguais entre todos ($p > 0,001$). Entretanto, os fibroblastos de neonatos se comportam de maneira diferente àqueles retirados de crianças operadas após o primeiro mês. Os fibroblastos dos grupos 1 e 2 apresentam um perfil de crescimento sigmoide, ou seja, no período adotado para os experimentos, as células atingiram um número limite de confluência na garrafa de cultura, mostrado pelo perfil de platô no gráfico de regressão não-linear (figura 19).

Quando comparada a viabilidade destes fibroblastos entre os grupos analisados, não houve diferença significativa na capacidade de metabolização do MTT (figura 20). Deste modo, não há uma influência clara na viabilidade celular dos fibroblastos de neonatos e de lactentes até os 6 meses de vida, nem em presença de desnutrição intrauterina.

Figura 20 – Representação gráfica de comparação da viabilidade celular através da metabolização de MTT dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos

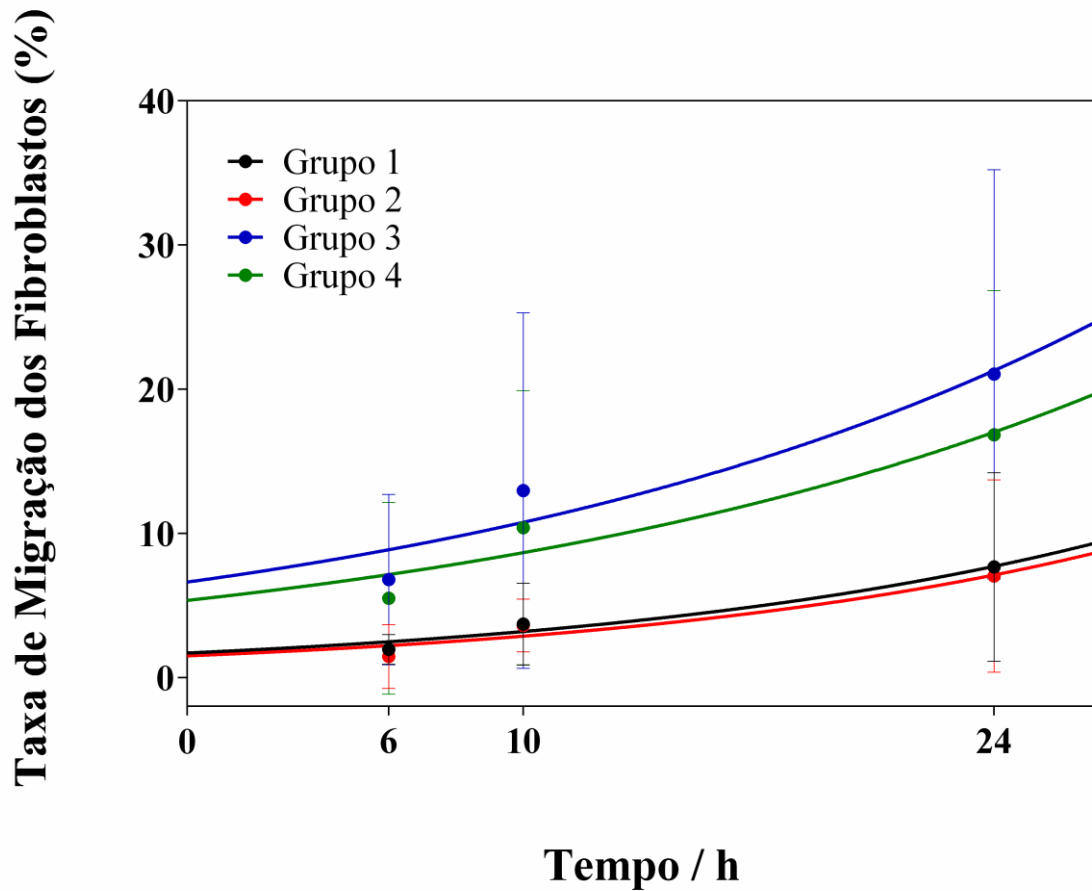


Legenda: Os dados viabilidade celular com MTT foram analisados utilizando one-way ANOVA e pós teste de Tukey.
Fonte: Elaborado pela autora.

Para os dados de migração celular após o *scratch*, as análises mostraram que os grupos 1 e 2 são estatisticamente iguais ($F = 73,81\%$), assim também os grupos 3 e

4 não possuem diferenças ($F = 85,61\%$). Entretanto, quando comparados em conjunto, o fator preponderante que os diferencia é, outra vez, a idade na qual os indivíduos são operados, sendo irrelevante a nutrição da fase intrauterina (figura 21). A análise conjunta dos dados mostrou que os neonatos têm uma taxa de migração significativamente menor do que os operados após o primeiro mês ($F = 97,80\%$).

Figura 21 – Representação gráfica comparando a migração dos fibroblastos das crianças de todos os quatro grupos



Legenda: Analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O teste-F com algoritmo de Critério de Informação de Akaike (AIC) foi utilizado na comparação de múltiplos resultados. Fonte: Elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

A cicatrização e também a evolução das feridas são alvos de questionamentos há muitos anos, denotando a importância desta etapa cirúrgica. O entendimento deste processo e seus desvios ainda permanece enigmático e cada vez mais são descritas vias metabólicas envolvidas. A prática cirúrgica nos desperta a procurar entender o processo cicatricial e então questionar paradigmas de interpretação relacionados a idade fetal, neonatal e adulta. Muitos artigos exaltam a melhor cicatrização no período neonatal, como resultado final. [13-18,20,26,29]. O tempo deste processo permanece pouco estudado e relevado a segundo plano. Em neurocirurgia pediátrica cresce a importância do tempo pela gravidade da consequência da falha e/ou demora da cobertura cicatricial. A menor espessura tissular, e outras características da pele imatura, aumentam a importância da rapidez e resistência do processo de cobertura cicatricial, que ocorre nos primeiros dias da ferida. A fístula liquórica em feridas de crianças operadas de hidrocefalia ocorre em média do 4º ao 9º dia de pós-operatório, variando de 1 a 43 dias[3,7,9,11], e coincide com a fase proliferativa da cicatrização, que se inicia a partir do 4º dia, e o fibroblasto é a principal célula.

A dissertação de mestrado da autora, por meio da análise retrospectiva de dados de prontuários, concluiu que crianças operadas de hidrocefalia no primeiro mês de vida evoluem significativamente com maior número de deiscência e fístula liquórica no pós-operatório, quando comparados com lactentes operados até 2 anos de vida. ($p < 0,05$), e estiverem presentes apenas em crianças menores de 6 meses. O fato de nascerem desnutridos, leva a uma tendência a evoluir com falha na cicatrização ($p = 0,06$)[12].

O processo de cicatrização engloba uma série de reações celulares e bioquímicas sobrepostas.

Cicatrização de feridas é uma condição típica em que células epiteliais, endoteliais e mesenquimais são primeiramente submetidas à ativação de sua motilidade, a fim de repovoar a região danificada e, em seguida, mostram uma forte resposta proliferativa. As células passam do fenótipo reversível e assimétrico (migração) a uma forma irreversível e simétrica (mitose).

O fibroblasto tem um triplo fenótipo, sendo ainda capaz de se diferenciar em outras células, e depende dos fatores de crescimento para sair do seu estado de quiescência. Participa ativamente das três fases da cicatrização: migra e prolifera na fase inflamatória, induz a granulação, contração tecidual e epitelização. É a célula predominante entre o terceiro e o quinto dia da cicatrização. É responsável pela síntese da matriz extracelular, regendo um complexo mecanismo de retroalimentação positiva, onde a migração para o sítio da ferida dos fibroblastos residentes e de outras células, se faz primordial. Em sequência passa a apresentar características funcionais semelhantes aos músculos lisos, participando da contração da ferida. O mecanismo responsável pela contração tecidual não é bem compreendido, mas parece estar relacionado com a presença do miofibroblasto, derivado do fibroblasto. O fibroblasto faz parte do tecido de granulação, e proporciona a epitelização por meio da migração de queratinócitos sobre a matriz extracelular e da mitose de células epidérmicas a partir da camada basal. O processo de remodelação da ferida se caracteriza por etapas sucessivas de síntese, degradação e orientação das fibras colágenas. A regência do fibroblasto em todo o processo cicatricial é indubitável.

Procuramos, neste trabalho, considerar o tempo como fator primordial, estudando a taxa de migração em 24h dos fibroblastos, a velocidade e taxa de proliferação até 8 dias, e a viabilidade celular durante o tempo em que foi avaliada a proliferação dos fibroblastos. A contração da ferida, que se inicia por volta do 5º dia, é essencial para a epitelização e fechamento da ferida e depende quase que exclusivamente da função proliferativa dos fibroblastos.

Os grupos aqui estudados estão separados pela idade, e também pelo estado nutricional ao nascimento.

Os fibroblastos dos grupos 1 e 2, sendo que o 1 são neonatos nascidos com percentil de peso > 10 e o 2 neonatos nascidos com percentil de peso ≤ 10 , apresentaram uma taxa de crescimento celular inicial acelerado em relação aos outros dois grupos, porém aparentemente esse crescimento não leva a um aumento considerável do número de células em 8 dias (

Figura 19), e os fibroblastos dos dois grupos assumem uma curva de crescimento sigmoide quando os dados são avaliados pela equação não linear de crescimento

logístico. O crescimento inicial do desnutrido, grupo 2, foi semelhante ao do outro grupo neonatal, podendo estar relacionado ao fato de *in vitro* haver uma maior disponibilidade de recursos nutricionais, e a avidéz desta célula por recursos nutricionais a faz alcançar a confluência máxima em rápida velocidade, mas perdeu esta capacidade rapidamente, multiplicou mais lentamente, e não alcançou o crescimento do grupo 1. Os fibroblastos da criança número 6 do grupo 2, dos neonatos com percentil de peso ≤ 10 , foi operada com 21 dias de vida, já com peso adequado para a idade, e seus fibroblastos apresentaram o perfil de crescimento mais lento entre os três. A recuperação nutricional em ratos recém-nascidos desnutridos intraútero, não preveniu a ocorrência de alterações ao se avaliar a eficácia da cicatrização, conforme o trabalho de Coelho-Lemos e col. [38]. Muitas deficiências nutricionais têm impacto na cicatrização de feridas impedindo a proliferação celular, síntese de colágeno e epitelização[39].

Os fibroblastos das crianças dos dos grupos 3 e 4 mostraram um comportamento de crescimento celular semelhante, exponencial, quando avaliados em grupo ou individualmente. Os fibroblastos de uma criança do grupo 3 apresentou um crescimento mais lento que os outros dois, e no grupo 4, os fibroblastos de uma das crianças apresentou um elevado número de células ao final de oito dias, e provavelmente se tratam de crescimento com valores atípicos (outlier).

Na figura 17, podemos observar que o crescimento celular dos neonatos (grupos 1 e 2) foi significativamente menor comparados aos lactentes operados até 6 meses de vida (grupos 3 e 4), em 8 dias. Quando comparados os grupos 1 e 2, ou seja, ambos operados antes do 1º mês de vida, mas com o segundo grupo de indivíduos com baixo peso ao nascer, há menor proliferação celular final no segundo grupo. O mesmo não aconteceu entre os indivíduos dos grupos 3 e 4, que são semelhantes entre si. Podemos notar a influência da idade em que os fibroblastos foram extraídos e da desnutrição na curva de crescimento.

O comportamento inicial de todos os fibroblastos foi semelhante, ao se considerar que o tempo de duplicação médio entre os grupos foi estatisticamente igual entre todos ($p < 0,001$). Entretanto, o perfil de crescimento dos grupos 1 e 2 é sigmoide, ou seja, no período adotado para os experimentos, as células atingiram um número limite de

confluência na garrafa de cultura, representado pelo platô no gráfico de regressão não-linear (figura 19). Já os operados após o primeiro mês apresentaram um crescimento exponencial.

Interpreta-se, assim, que a idade quando os indivíduos são operados pode influenciar a cicatrização e a regeneração tecidual, pois o perfil encontrado afeta não só o crescimento celular como também a formação de uma monocamada em placas de cultura *in vitro*.

Os resultados sugerem uma diferença no comportamento dos fibroblastos no primeiro mês de vida, agravada ao se considerar o ambiente nutricional intraútero.

Um tipo de crescimento celular mais rápido é encontrado em tumores, porém alguns outros fatores podem afetar a taxa de crescimento dos fibroblastos, como SPAG-6 encontrado em camundongos com hidrocefalia, além de descontrole na formação de espécies reativas de oxigênio, podendo justificar o crescimento inicial rápido de todos os grupos e alteração na migração celular [40-45]. Genes podem influenciar na cicatrização.

Em relação a migração celular os fibroblastos neonatais são mais lentos nas primeiras 24 horas, que os fibroblastos dos lactentes até 6 meses, sem influência do estado nutricional.

Outra vez, o fator preponderante que os diferencia é, a idade na qual os indivíduos são operados, sendo irrelevante a nutrição da fase intrauterina (figura 21). Park e col demonstraram que os fibroblastos do período neonatal migram mais lentamente que os fetais, quando em ensaios com matriz extracelular de diferentes composições, mas ambos são mais lentos que os controles. Isto nos faz supor que o fibroblasto tem uma influência importante da matriz extracelular, que ele mesmo secreta [42].

O fato dos fibroblastos do período neonatal se comportarem de forma semelhante em relação a migração, mas não quanto à proliferação, pode ser explicado pela menor demanda metabólica exigida para a migração de uma célula, em relação à sua multiplicação.

Rosana Mateu e col, não encontraram diferença na proliferação celular através do ensaio de MTT de fibroblastos em neonatos e outras crianças, mas houve diferença na migração, considerando estes períodos. Os fibroblastos adultos migraram significativamente mais rápido que os neonatais [28].

Quando comparada a sobrevivência dos fibroblastos em todos os grupos, não houve diferença significativa na capacidade de metabolização do MTT (Figura 20). Deste modo, não há uma influência clara na viabilidade celular dos fibroblastos de neonatos ou lactentes, em relação aos resultados, nem quando envolvida a nutrição intrauterina. As células de todos os grupos permaneceram proporcionalmente viáveis durante todo o período em que o ensaio de crescimento foi realizado. A metabolização do MTT se torna um controle. As células permanecem vivas durante o experimento em todos os grupos.

A curva dos quatro grupos quanto à absorvância, comportou-se de forma semelhante, em crescente, com formação de mais cristais de formazan a cada intervalo medido, inferindo mais células vivas a cada dia e se multiplicando em termos de proporção e não em quantidade. Confirma que o crescimento mais lento de alguns grupos não foi devido a morte celular e sim a retardo na proliferação.

A proliferação inicial mais rápida dos fibroblastos dos grupos 1 e 2 pode explicar uma epitelização inicial da ferida mais rápida em neonatos. O resultado final com menor fibrose e maior recomposição estrutural da pele em neonatos, considerado pela literatura, pode ser prejudicial considerando a ferida de couro cabeludo em crianças com hidrocefalia, e os aspectos já levantados de espessura de pele, presença de liquor abaixo da ferida, tipo de hidrocefalia prevalente. A formação do substrato da matriz extracelular que vai favorecer a adesão, migração e proliferação celular, e que influencia a forma e função das células e a deposição de colágeno depende dos fibroblastos e pode ser mais lenta em neonatos, levando em conta o comportamento da curva de crescimento aqui encontrada. O forma sigmoide da curva de crescimento dos neonatos faz pensar em uma imaturidade do metabolismo destes fibroblastos, com menor reserva metabólica para persistir com a mitose, que tem um gasto energético maior que a migração. Assim, a força tensil e contração da ferida estariam lentas, e

ainda com a presença de liquor na ferida, favorecendo a deiscência de ferida nos neonatos operados de hidrocefalia. Com a coloração HE, os cortes de tecido submetidos a presença de liquor por determinado tempo, revelaram neoformação vascular mais intensa de vasos com pequeno diâmetro, aumento do tecido mesenquimal reacional e do tecido de granulação, degeneração das fibras musculares estriadas, calcificações distróficas, necrose gordurosa e necrose de coagulação (necrose isquêmica), em relação aos controles, em estudo publicado [46].

Feridas realizadas em cabras no período fetal, no dia de nascimento, com 3 dias de vida e adultas verificaram que as feridas neonatais ficaram mais largas inicialmente, epitelizaram e cicatrizaram mais rapidamente, com menos colágeno e fibrose que em cabras adultas[28].

A reorganização perfeita do tecido conectivo na região da cicatriz é considerada há muitos anos como parâmetro de cicatrização eficaz [4]. Considerando que tecidos de diferentes áreas se comportam individualmente no processo cicatricial, no caso do couro cabeludo em crianças com hidrocefalia, a fibrose e a desorganização da deposição das fibras de colágeno seria um fator protetivo para a deiscência e fistula liquórica.

A força tensional da cicatriz é determinada pela velocidade, qualidade e quantidade total da deposição de colágeno.

6 CONCLUSÃO

O fibroblasto extraído no período neonatal tem uma capacidade inicial rápida de duplicação, mas cresce de forma sigmoide, enquanto o fibroblasto do lactente segue uma curva exponencial. O fibroblasto da criança desnutrida intraútero cresce mais lentamente no primeiro mês de vida, quando comparado ao nutrido ao nascimento. A capacidade de migração dos fibroblastos foi mais lenta no primeiro mês nos dois grupos neonatais em comparação aos lactentes. Não houve diferença na viabilidade celular entre os grupos.

Os fibroblastos de neonatos têm uma capacidade inicial de duplicação semelhante ao dos lactentes, mas perdem esta capacidade mais rapidamente. Também, a desnutrição influenciou a taxa de crescimento no primeiro mês de vida. O fibroblasto de neonatos é mais lento nas primeiras 24 horas, considerando a migração. Esses resultados sugerem um maior tempo no processo cicatricial de neonatos, nos levando a evitar a cirurgia no primeiro mês de vida e postergar por um tempo maior que o habitual a retirada dos fios de sutura.

7 PERSPECTIVAS

Os estudos da cicatrização em neonatos podem ser continuados por várias formas. Coelho-Lemos, em estudo para verificar a influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal em ratos lactentes, idealizou o índice de maturação do colágeno (IMaC), que foi definido como a razão entre as percentagens de colágeno tipo I e tipo III. Este índice tem sido amplamente utilizado por ser de fácil reprodutibilidade e facilitar a interpretação dos resultados, onde valores acima de um (1) representam predominância de colágeno tipo I e os abaixo de 1 representam predomínio de colágeno tipo III[35].

A cicatrização pode ser avaliada pela imunohistoquímica, que é um método diagnóstico que tem como objetivo detectar um antígeno tecidual ou celular, mediante a utilização de anticorpo específico dirigido contra este componente celular. Na cicatrização são utilizados a determinação da angiogênese e dos miofibroblastos.

A quantificação de vasos sanguíneos foi realizada por meio da técnica de imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo antifator VIII, também conhecido como fator de von Willebrand. O fator VIII é altamente específico para marcar tecido vascular, e foi utilizado como marcador de vascularização em vários estudos.

A quantificação de miofibroblastos é realizada por meio de imunohistoquímica, utilizando-se o anticorpo anti- α -actina muscular lisa (actina α -sm). Estudos comprovam a importância dos miofibroblastos no processo cicatricial e demonstraram que existe relação direta entre o nível de actina α -sm e a capacidade contrátil dos miofibroblastos.

Estudos experimentais realizados recentemente demonstraram correlação direta entre a força máxima de tração (considerado padrão-ouro) e a quantificação de vasos e miofibroblastos na avaliação da cicatrização dos tecidos.

A biologia molecular proporcionou a quantificação dos fatores de crescimento, através de complexas reações utilizando material genético encontrado no tecido de granulação das feridas. Em tese de doutorado, Pereira estudou os fatores de

crescimento em feridas cutâneas e concluiu que sua dosagem correlaciona-se diretamente com a morfometria do colágeno.

REFERÊNCIAS

1. Cinalli G, Maixner WJ, Sainte-Rose C. *Pediatric. Hydrocephalus*. Italy: Springer; 2004.
2. Juca CEB, Neto AL, Oliveira RS, Machado HR. Tratamento de hidrocefalia com derivação ventriculoperitoneal: análise de 150 casos consecutivos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. *Acta Cir Bras*. 2002;17(supl. 3):59-63.
3. Jeelani NU, Kulkarni AV, Desilva P, Thompson DN, Hayward RD. Postoperative cerebrospinal fluid wound leakage as a predictor of shunt infection: a prospective analysis of 205 cases. *Clinical article. J Neurosurg Pediatr*. 2009;4(2):166-9.
4. R Rotim K, Miklic P, Paladino J, Melada A, Marcikic M, Scap M. Reducing the incidence of infection in pediatric cerebrospinal fluid shunt operations. *Childs Nerv Syst*. 1997;13(11-12):584-7.
5. Taylor AG, Peter JC. Advantages of delayed VP shunting in post-haemorrhagic hydrocephalus seen in low-birth-weight infants. *Childs Nerv Syst*. 2001;17(6):328-33.
6. Davis SE, Levy ML, McComb JG, Masri-Lavine L. Does age or other factors influence the incidence of ventriculoperitoneal shunt infections? *Pediatr Neurosurg*. 1999;30(5):253-7.
7. Frim DM, Scott RM, Madsen JR. Surgical management of neonatal hydrocephalus. *Neurosurg Clin N Am*. 1998;9(1):105-10.
8. Rohde V, Weinzierl M, Mayfrank L, Gilsbach JM. Postshunt insertion CSF leaks in infants treated by an adjustable valve opening pressure reduction. *Childs Nerv Syst*. 2002;18(12):702-4.
9. Korinth MC, Gilsbach JM. What is the ideal initial valve pressure setting in neonates with ventriculoperitoneal shunts? *Pediatr Neurosurg*. 2002;36(4):169-74.
10. Kulkarni AV, Drake JM, Lamberti-Pasculli M. Cerebrospinal fluid shunt infection: a prospective study of risk factors. *J Neurosurg*. 2001;94(2):195-201.
11. Sekhar LN, Moossy J, Guthkelch AN. Malfunctioning ventriculoperitoneal shunts. Clinical and pathological features. *J Neurosurg*. 1982;56(3):411-6.
12. Pinho AP, Almeida FC, Maluf FB, Araujo ID. Clinical Factors Associated with Cutaneous Cerebrospinal Fluid Leakage in Infants Who Underwent a Ventriculoperitoneal Shunt Surgery. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia*. 2015;34(1):7-12.
13. Thomas DR. Age-related changes in wound healing. *Drugs Aging*. 2001;18:607-20.

14. Sanchez J, Antonicelli F, Tuton D, Mazouz Dorval S, François C. Particularités de la cicatrisation de l'enfant. *Ann Chir Plast Esthétique*. 2016;61:341-7.
15. van Ramshorst GH, Salu NE, Bax NM, Hop WC, van Heurn E, Aronson DC, et al. Risk factors for abdominal wound dehiscence in children: a case-control study. *World J Surg*. 2009;33(7):1509-13.
16. Viljanto J, Raekallio J. Wound healing in children as assessed by the CELLSTIC method. *J Pediatr Surg*. 1976;11(1):43-8.
17. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):1e-S-32e-S.
18. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(2):94-101.
19. Whitby DJ, Ferguson MW. The extracellular matrix of lip wounds in fetal, neonatal and adult mice. *Development*. 1991;112(2):651-68.
20. Cass DL, Bullard KM, Sylvester KG, Yang EY, Longaker MT, Adzick NS. Wound size and gestational age modulate scar formation in fetal wound repair. *J Pediatr Surg*. 1997;32(3):411-5.
21. Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, Beckstead JH, Villa RL, Scheuenstuhl H, et al. Comparison of fetal, newborn, and adult wound healing by histologic, enzyme-histochemical, and hydroxyproline determinations. *J Pediatr Surg*. 1985;20(4):315-9.
22. Efimov EA. A comparative study of the healing of full layer wounds in newborn and mature rats. *Biull Eksp Biol Med*. 1968;65(6):75-7.
23. Yannas IV, Tzeranis DS, So PTC. Regeneration of injured skin and peripheral nerves requires control of wound contraction, not scar formation. *Wound Repair Regen*. 2017;25(2):177-191.
24. Rolfe KJ, Cambrey AD, Richardson J, Irvine LM, Grobbelaar AO, Linge C. Dermal fibroblasts derived from fetal and postnatal humans exhibit distinct responses to insulin like growth factors. *BMC Dev Biol*. 2007;7:124.
25. Krejčí E, Kodet O, Szabo P, Borský J, Smetana K Jr, Grim M, Dvořánková B. In vitro differences of neonatal and later postnatal keratinocytes and dermal fibroblasts. *Physiol Res*. 2015;64(4):561-9.
26. Horiuchi Y, Ryan TJ. A comparison of newborn versus old skin fibroblasts, their potential for tissue repair. *Br J Plast Surg*. 1993;46(2):132-5.
27. Mateu R, Živicová V, Krejčí ED, Grim M, Strnad H, Vlček Č, et al. Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. *Int J Mol Med*. 2016;38(4):1063-74.

28. Wagner W, Wehrmann M. Differential cytokine activity and morphology during wound healing in the neonatal and adult rat skin. *J Cell Mol Med.* 2007 Nov-Dec;11(6):1342-51.
29. Bermudez DM, Canning DA, Liechty KW. Age and pro-inflammatory cytokine production: wound-healing implications for scar-formation and the timing of genital surgery in boys. *J Pediatr Urol.* 2011;7(3):324-31.
30. Trombetta-eSilva J, Eadie EP, Zhang Y, Norris RA, Borg TK, Bradshaw AD. The effects of age and the expression of SPARC on extracellular matrix production by cardiac fibroblasts in 3-D cultures. *PLoS One.* 2013;8(11):e79715.
31. Norris RA, Borg TK, Butcher JT, Baudino TA, Banerjee I, Markwald RR. Neonatal and adult cardiovascular pathophysiological remodeling and repair: developmental role of periostin. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1123:30-40.
32. Sancho MA, Juliá V, Albert A, Díaz F, Morales L. Effect of the environment on fetal skin wound healing. *J Pediatr Surg.* 1997;32(5):663-6.
33. Lane AT, Scott GA, Day KH. Development of human fetal skin transplanted to the nude mouse. *J Invest Dermatol.* 1989;93(6):787-91.
34. Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol.* 2020;2109:225-9.
35. Marques R, Marcondes E, Berquó ES, Prandi R, Yunes J. Crescimento e desenvolvimento pubertário em crianças e adolescentes brasileiros. São Paulo: Brasileira de Ciências; 1982.
36. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
37. Vandermeer J. How Populations Grow: The Exponential and Logistic Equations. *Nat Educ Knowl.* 2011;3(10):15.
38. Coelho-Lemos IC, Campos AC, de Almeida M, Schüler SL, Gurmini J, Malafaia O, et al. In utero malnutrition influences wound healing of newborn rats as measured by tensile strength and collagen deposition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004;28(4):241-4.
39. Kavalukas SL, Barbul A. Nutrition and wound healing: an update. *Plast Reconstr Surg.* 2011;127 Suppl 1:38S-43S.
40. Kang SW, Lee S, Lee EK. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth. *Arch Pharm Res.* 2015;38(3):338-45.
41. Li W, Mukherjee A, Wu J, Zhang L, Teves ME, Li H, et al. Sperm Associated Antigen 6 (SPAG6) Regulates Fibroblast Cell Growth, Morphology, Migration and Ciliogenesis. *Sci Rep.* 2015;5:16506.
42. Martincorena I, Campbell PJ. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science.* 2015;349(6255):1483-9.

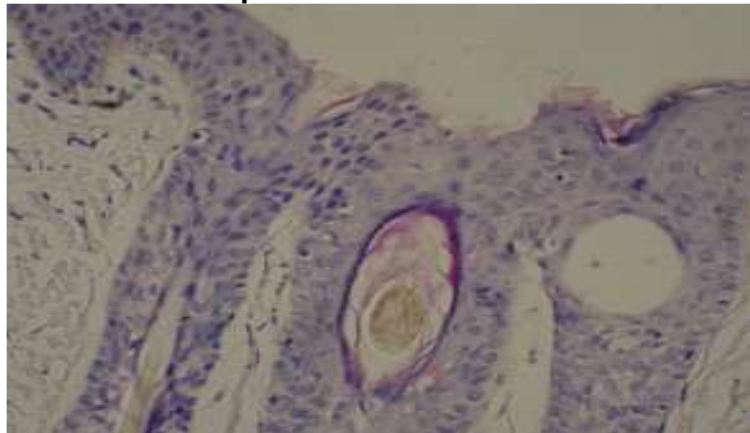
43. De Donatis A, Ranaldi F, Cirri P. Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Commun Signal*. 2010;8:20.
44. Park JC, Park BJ, Suh H, Park BY, Rah DK. Comparative study on motility of the cultured fetal and neonatal dermal fibroblasts in extracellular matrix. *Yonsei Med J*. 2001;42(6):587-94.
45. Denker SP, Barber DL. Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the Na-H exchanger NHE1. *J Cell Biol*. 2002;159(6):1087-96.
46. Babuccu O, Kalayci M, Peksoy I, Kargi E, Cagavi F, Numanoğlu G. Effect of cerebrospinal fluid leakage on wound healing in flap surgery: histological evaluation. *Pediatr Neurosurg*. 2004;40(3):101-6.
47. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8.
48. Pereira CCA. Influência da dieta enteral suplementada com arginina e antioxidantes sobre a cicatrização cutânea experimental [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Biopsia de couro cabeludo de uma criança operada de hidrocefalia aos 4 meses de idade e com percentil de peso ao nascimento de 10, caracterizando desnutrição intra-útero

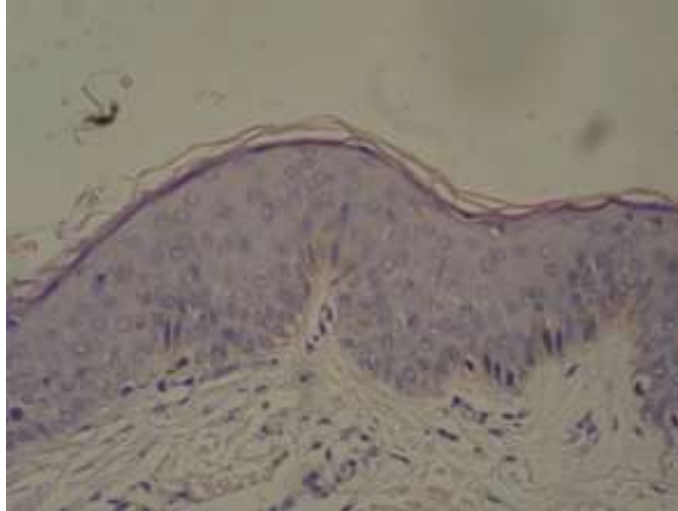
A biopsia demonstrou pele pilosa e pigmentada (figura 1), com epiderme normoceratótica, sem acantose, com degeneração hidrópica e demora na queratinização (núcleos arredondados subjacentes à camada córnea – figura 2-4). Derme isenta de infiltrados inflamatórios, de necrose e/ou de hemorragia e mostrando tecido conjuntivo frouxo, hiperidratado (fibras colágenas finas e individualizadas, separadas por espaços claros – figura 5). Núcleos dos fibroblastos na maioria condensados, sugerindo pouca atividade de síntese de colágeno.

Figura 1 – Pele pilosa e pigmentada. Folículos pilosos com disposição profunda na derme



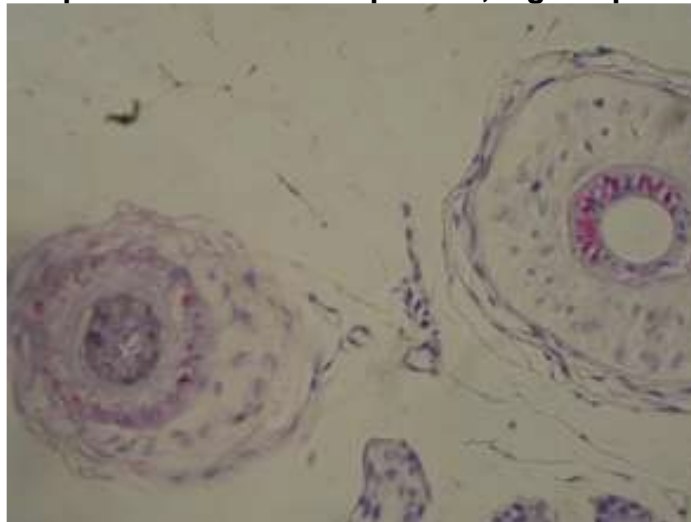
Fonte: Arquivo da autora.

Figura 2 – Epiderme fina normoceratótica. Presença de núcleos ainda arredondados subjacente à camada córnea



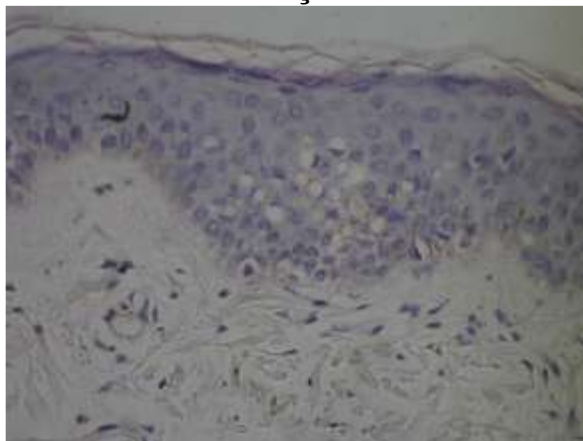
Fonte: Arquivo da autora.

Figura 3 – Pelo espesso nos folículos pilosos, alguns profundos na derme



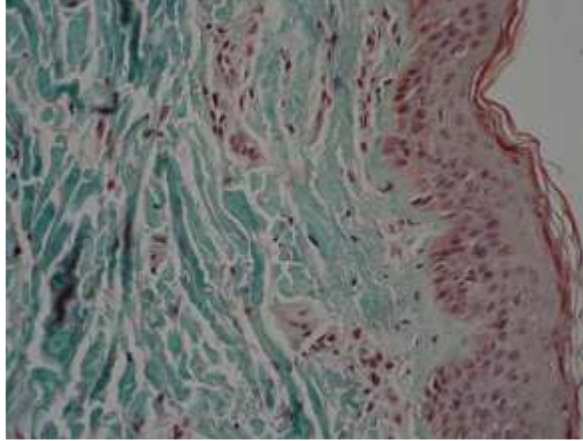
Fonte: Arquivo da autora.

Figura 4 – Degeneração hidrópica na camada espinhosa da epiderme, com distribuição focal



Fonte: Arquivo da autora.

Figura 5 – Derme com tecido conjuntivo frouxo, hiperidratado (fibras colágenas finas e individuais separados por espaços claros). Núcleos de fibroblastos na maioria condensados, sugerindo pouca atividade de síntese do colágeno



Fonte: Arquivo da autora.

APÊNDICE B – Protocolo de contagem celular

Protocolo seguido pelo Instituto de Tecnologia de Massachusetts

Cell Number Determination (Days 1, 3, 6 and 8)

NOTE: This procedure is conducted at Day 1 - 4 hrs, Day 3, Day 6, and Day 8.

NOTE: Six samples are prepared for Day 1 - 4 hrs since students often have a difficult time collecting reliable data at this time point. A minimum of three reliable counts is necessary.

1. Remove cells from incubator.
2. Check cells under microscope. Estimate the cell density.
3. Using a sterile glass Pasteur pipet, aspirate the liquid media covering the cells in the wells you wish to determine the cell number.
4. Add 1 mL of PBS. Swish around. Aspirate liquid.

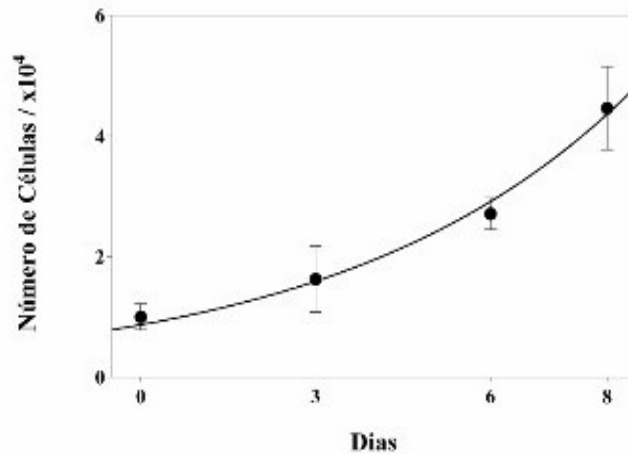
NOTE: In this and subsequent steps, when adding a liquid to a well, squirt the liquid on side wall of well rather than in center of well.

5. Add 250 μ L of trypsin to each well. Lightly swish trypsin.
6. Place plate in incubator for 5 min.
7. While waiting for cells in incubator, prepare Coulter Counter vials with 9 mL Isoton.
8. Remove plates from incubator. Tap on side of plate several times. Be careful to not spill the wells with 1 mL liquid. Check cells under microscope to confirm that cells are detached from the surface. Failure of cells to detach is a common mishap in this protocol.
9. Add 750 μ L DMEM with 10% serum to each well.
10. Do the following for each well, one at a time:
 - a) With micropipette set at 900 μ L, gently suck the liquid up and down three times.
 - b) Aliquot 900 μ L of cell mixture to a Coulter Counter vial with Isoton.
 - c) Add 900 μ L Isoton/cell mixture back into the well.
 - d) Repeat steps a) and b).
 - e) Repeat steps c), a), and b).
 - f) Move remainder of liquid in well to Coulter Counter vial. Failure to retrieve all the cells from the vial is a common mistake in this protocol.
11. Repeat for each well of the Cell Number Count test.

12. After removing cells, do a visual check with the microscope to make sure that few cells remain on the well surface.
13. Return plates to incubator.
14. Determine the cell number/concentration using the Coulter Counter.
15. Dispose of biohazardous wastes appropriately.

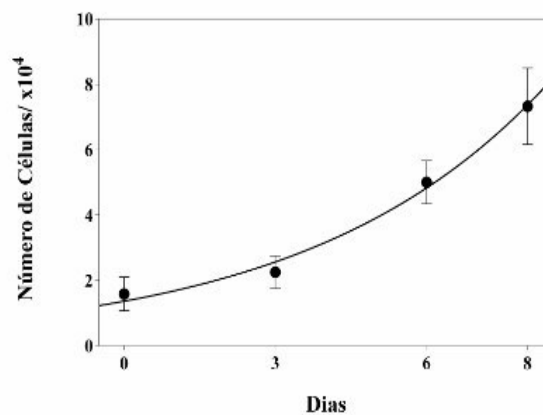
APÊNDICE C – Dados dos grupos

No primeiro grupo, das crianças operadas no primeiro mês de vida, com peso de nascimento acima do percentil 10, os fibroblastos da criança 8 tiveram tempo de duplicação de 3,436 dias, da criança 9 foi de 3,285 dias e do paciente 12 foi de 0,7104 dias.



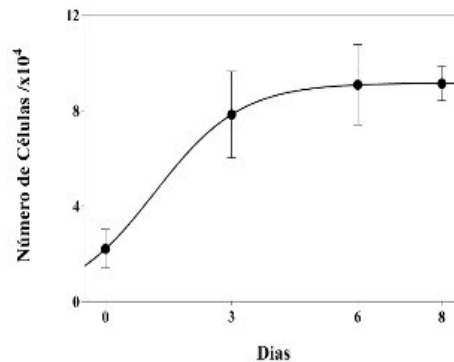
Fonte: Elaborado pela autora.

Representação gráfica da curva de crescimento celular da criança 8, neonato nascido com percentil de peso acima de 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção do gráfico.



Fonte: Elaborado pela autora.

Representação gráfica da curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 9, neonato e nascido com percentil de peso acima de 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

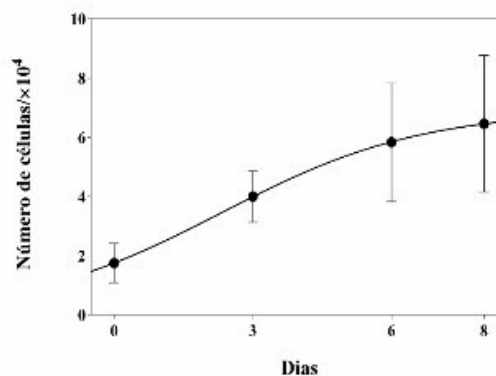


Fonte: Elaborado pela autora.

Representação gráfica da curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 12, neonato nascido com percentil de peso acima de 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

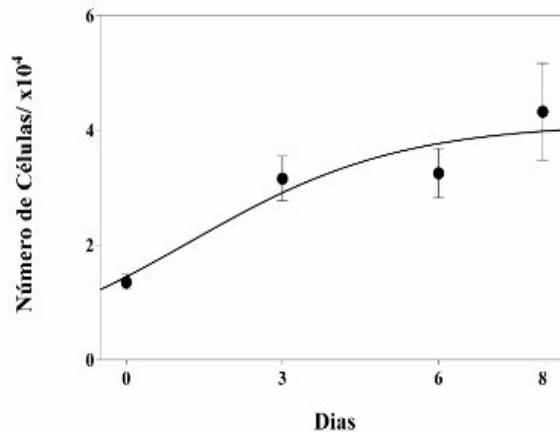
Grupo 2

No segundo grupo, das crianças operadas no primeiro mês de vida, mas com percentil de peso ao nascimento abaixo de 10, os fibroblastos da criança 3 duplicaram em 1,497 dias, a da 5 em 1,391 dias e da criança 6 com 0,841 dias.



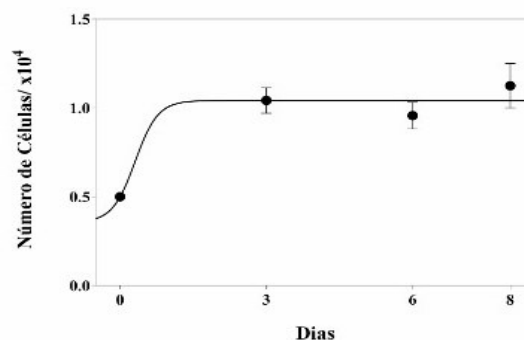
Fonte: Elaborado pela autora.

Representação gráfica da curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 3, neonato nascido com percentil de peso 10 ou abaixo. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 5, neonato nascido percentil de peso 10 ou abaixo. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.



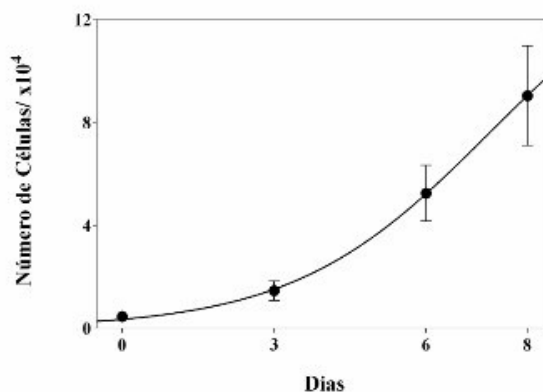
Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento dos fibroblastos da criança 3, neonato nascido percentil de peso 10 ou abaixo. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way

ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

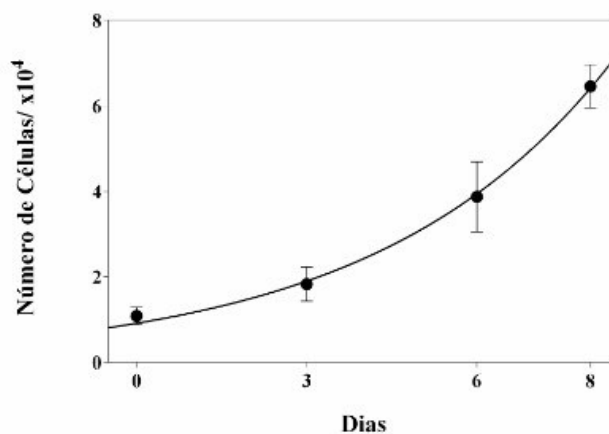
Grupo 3

No terceiro grupo, das crianças operadas entre 1 e 6 meses de vida, com percentil de peso acima de 10 ao nascimento, os fibroblastos da criança 1 se duplicaram em 1,339 dias, da criança 7 com 2,855 dias e da 10 com 6,459 dias.



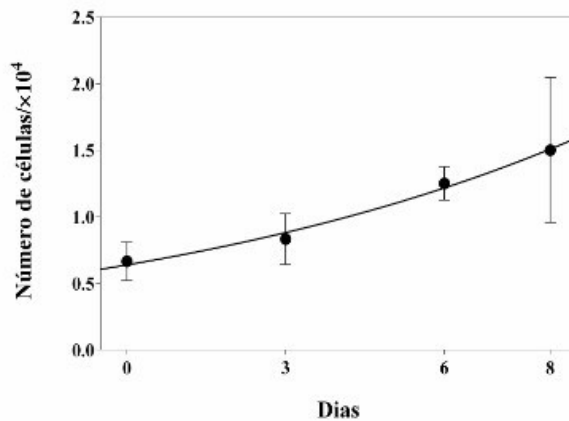
Fonte: Elaborado pela autora.

Representação gráfica da curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 1, lactente operado até 6 meses, e percentil de peso ao nascimento > que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 7, operado entre a primeiro e o sexto mês de vida, e peso ao nascimento maior que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

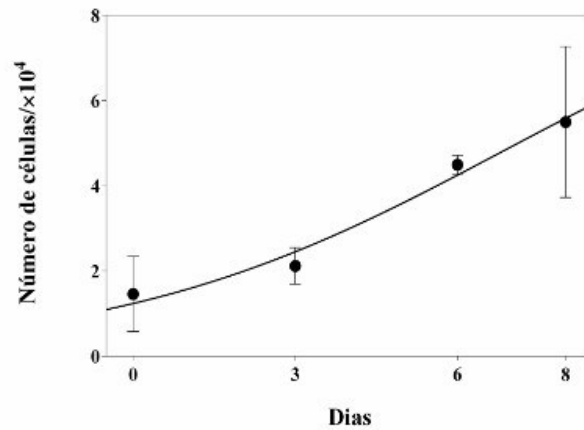


Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento de fibroblastos do paciente 10, operado entre a primeiro e o sexto mês de vida, e peso ao nascimento maior que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

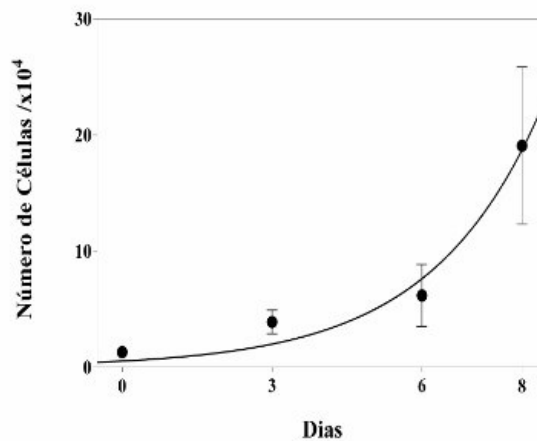
Grupo 4

No quarto grupo, das crianças operadas entre 1 e 6 meses de vida, e com percentil de peso ao nascimento abaixo de 10, os fibroblastos da criança 2 se duplicaram em 2,472 dias, da criança 4 em 1,543 dias e da criança 11 em 1,934 dias.



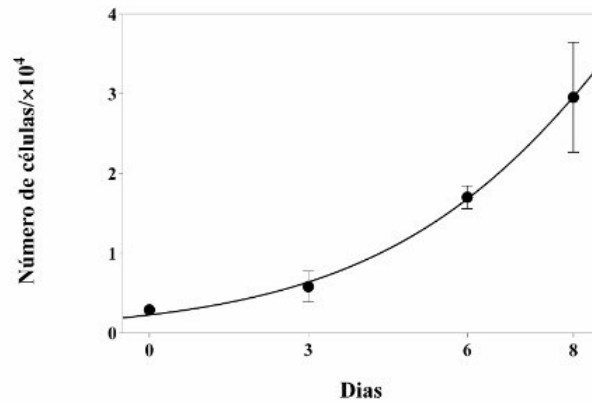
Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento dos fibroblastos do paciente 2, lactente até 6 meses de vida, e peso ao nascimento maior que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento de fibroblastos do paciente 4, operado entre a primeiro e o sexto mês de vida, e peso ao nascimento maior que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Curva de crescimento de fibroblastos do paciente 11, operado entre a primeiro e o sexto mês de vida, e peso ao nascimento igual ou menor que 10. Os resultados foram analisados com o teste estatístico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. A equação não linear de crescimento logístico foi utilizada para a construção dos gráficos.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP

HOSPITAL MUNICIPAL ODILON
BEHRENS-MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E IMUNOENZIMÁTICA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CIRÚRGICAS DE LACTENTES ABAIXO DE SEIS MESES SUBMETIDOS A DERIVAÇÃO VENTRÍCULO PERITONEAL.

Pesquisador: Andrea Silva de Pinho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23730713.6.0000.5129

Instituição Proponente: Hospital Municipal Odilon Behrens-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 548.627

Data da Relatoria: 14/11/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo de fragmento de pele retirado de lactentes abaixo de seis meses durante cirurgia de derivação ventrículo peritoneal. Propõe-se análise imunohistoquímica e imunoenzimática dos fatores de cicatrização logo após dar início à ferida, comparando o número e função destes em grupo controle, desnutridos intra útero e crianças operadas até um mês de vida.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do trabalho é avaliar quais fatores de cicatrização estariam envolvidos e relacionados à desnutrição intrauterina e deficientes no primeiro mês de vida.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Como se trata de análise de pequeno fragmento de pele em criança que já seria operada de qualquer forma, não há riscos adicionais.

Benefícios: O conhecimento do comportamento dos fatores de cicatrização nos grupos recrutados nos ajudará a entender o processo de cicatrização e verificar as possíveis diferenças entre crianças desnutridas intrauterina e operadas no primeiro mês de vida, contribuindo para um melhor planejamento cirúrgico ou acrescentar mais um motivo de se fazer um bom pré-natal, do ponto de

Endereço: Rua Formiga 50 Sala 108

Bairro: São Cristóvão

CEP: 31.110-430

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3277-6120

E-mail: cephob@gmail.com

HOSPITAL MUNICIPAL ODILON
BEHRENS-MG



Continuação do Parecer: 548.627

vista nutricional. Podemos também concluir que não há diferenças entre os fatores que serão estudados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo relevante, sem riscos adicionais à população pesquisada, que pode auxiliar na compreensão dos mecanismos cicatriciais relacionados à desnutrição intrauterina

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados.

Recomendações:

Sem recomendações adicionais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado seguindo relator

BELO HORIZONTE, 07 de Março de 2014

Lúcia Amorim

Assinador por:
Lúcia de Fátima Pais de Amorim
(Coordenador)

Endereço: Rua Formiga 50 Sala 108
Bairro: São Cristovão CEP: 31.110-430
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3277-6120 E-mail: cephob@gmail.com

