

Proliferação *in vitro* de fibroblastos oriundos de feridas de diabéticos

In vitro proliferation of fibroblast obtained from diabetic wounds

Elisabeth Mie Hosaka¹, César Isaac², André Oliveira Paggiaro³, Silvana Cereijido Altran⁴, Renata Conceição de Oliveira⁵, Marcus Castro Ferreira⁶

RESUMO

Introdução: A presença de úlceras em membros inferiores é uma das graves complicações do diabetes melito. Cerca de 15% dos diabéticos estão propensos a desenvolver úlcera de membros inferiores, o que pode levar a amputações desses membros. Úlceras nos diabéticos são de difícil cura, em decorrência de anormalidades celulares e moleculares existentes no tecido de granulação dessas feridas. Tais fibroblastos podem apresentar dificuldades de proliferação *in vitro*, explicando os achados clínicos de cronicidade ferida. Neste estudo pretendemos comparar a proliferação celular *in vitro* de fibroblastos derivados de úlceras diabéticas com fibroblastos não-diabéticos oriundos de pele normal. **Método:** Fibroblastos foram isolados a partir de amostras de tecido de granulação de cinco indivíduos portadores de úlceras diabéticas e comparados a fibroblastos obtidos amostras de pele íntegra de cinco indivíduos não-diabéticos. As células foram cultivadas em monocamadas durante 27 dias e sua capacidade proliferativa foi analisada em intervalos de 3-4 dias. **Resultados:** Foi observado que fibroblastos originados de úlceras diabéticas apresentaram proliferação reduzida após 27 dias de cultura celular, quando comparado aos fibroblastos oriundos de pele normal (controle), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,113$). **Conclusão:** Apesar de não haver diferenças matemáticas entre as proliferações de fibroblastos de ambas as origens, diferenças fisiológicas e morfológicas foram observadas no comportamento das células estudadas.

DESCRITORES: Pé diabético. Diabetes mellitus. Proliferação de células. Fibroblastos.

ABSTRACT

Introduction: Lower extremity ulceration is one of the serious diabetic complications. About 15% of diabetic patients are supposed to develop lower limb ulceration what may lead to amputations. Ulcers associated with diabetes are recalcitrant to healing due to cellular and molecular abnormalities, present in this pathology. It has been described behavioral changes in fibroblasts which are responsible for the granulation tissue formation. Under experimental conditions those fibroblasts can present difficulties to proliferate, explaining the clinical findings of wound chronicity. Our purpose in this study was to investigate the fibroblasts from diabetic patients in cell cultures, comparing with non-diabetic skin fibroblasts. **Methods:** Cells were taken and isolated from five diabetic ulcers granulation tissue and compared to those taken from five non-scarred non-diabetic skin samples. Cells were grown in monolayers during 27 days and their proliferative capacity was analyzed at 3 to 4 days intervals. **Results:** Fibroblasts from diabetic ulcers presented reduced proliferation after 27 days of cell culture when compared to fibroblasts from normal skin (control), but this difference was not statistically significant ($p=0,113$). **Conclusion:** Despite no mathematical differences were observed between the proliferations of fibroblast from both origins, physiologic and morphologic differences were seen in the cell behavior.

KEYWORDS: Diabetic foot. Diabetes mellitus. Cell proliferation. Fibroblasts.

1. Enfermeira, mestrado em Enfermagem, doutorado em Ciências (Cirurgia Plástica) pela Universidade de São Paulo, professora assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
2. Cirurgião Plástico, doutorado em Ciências (Cirurgia Plástica) pela Universidade de São Paulo, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas (LIM 04) da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brasil.
3. Médico Assistente da Unidade de Queimaduras da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, São Paulo, SP, Brasil.
4. Bióloga, Mestre, pesquisadora do Laboratório de Cultura Celular da Disciplina de Cirurgia Plástica do HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil.
5. Bióloga, Mestranda do HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil.
6. Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Diretor Técnico de Divisão da Cirurgia Plástica do HCFMUSP, São Paulo, SP, Brasil.

Correspondência: César Isaac

Laboratório de Investigação Médica (LIM 4) – Faculdade de Medicina USP
Avenida Doutor Arnaldo, 455 – sala 1360 – São Paulo, SP, Brasil – CEP 01246-903

E-mail: cesaris@uol.com.br

Artigo recebido: 11/7/2011 • Artigo aceito: 1/10/2011

O diabetes melito (DM) tem assumido proporções epidêmicas mundiais. Mais de 170 milhões de pessoas são afetadas no mundo todo. Especialistas em saúde estimam que existam 366 milhões de indivíduos diabéticos em 2030. Esta projeção é atribuída ao crescente envelhecimento da população; ao próprio crescimento populacional; ao processo de urbanização; à crescente prevalência da obesidade humana e ao sedentarismo¹.

No Brasil, o último estudo publicado foi realizado entre 1986 e 1988, em nove capitais e estimou a prevalência média de diabetes na população adulta em 7,6%². Enquanto a média na população mundial em 2000 foi estimada em 2,8%¹.

O DM é uma condição primariamente definida por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou de sua ação^{3,4}.

Dentre as diversas complicações da doença, a úlcera de membros inferiores (fenômeno clinicamente tão característico que recebeu a denominação de "pé diabético") representa o principal problema de saúde, social e econômico em todo o mundo^{5,6}. Frequentemente está associada a dor, limitação física, terapias prolongadas e onerosas. Aproximadamente 15% dos diabéticos estão sujeitos ao desenvolvimento de úlceras, que precede 84% de todas as amputações não-traumáticas de membro inferior^{7,8}. Estima-se que a cada 30 segundos um membro inferior seja amputado em alguma parte do mundo como consequência desta afecção⁹.

Essas ulcerações são frequentes em portadores de neuropatia periférica e/ou doença vascular periférica¹⁰. Atrofia dérmica (que pode predispor à formação de feridas) ou retardo no processo de cicatrização são comuns nesses pacientes. Além de isquemia local, presença de infecção e hipertensão arterial são alguns dos fatores que contribuem para o surgimento de tais lesões. Fatores de risco intrínsecos podem não ter relação causal com o diabetes, porém contribuem para a formação das úlceras¹¹.

Tais úlceras são recalcitrantes à cura devido a anormalidades celulares e moleculares⁵. Com base em observações clínicas, essas úlceras apresentam tecido de granulação pobre¹², processo de epitelização atrasada, processo inflamatório persistente e sinais de infecção por microrganismos¹³.

Em condições experimentais, fibroblastos podem apresentar dificuldades para se multiplicar, explicando achados clínicos de cronicidade da úlcera¹⁴. Essa diminuição da proliferação e a senescência celular têm sido observadas em feridas crônicas¹⁵, porém ainda há grande controvérsia, na literatura, entre estudos *in vitro* da capacidade proliferativa de fibroblastos oriundos de feridas crônicas¹⁶.

Para melhor compreender o comportamento de feridas, em particular as úlceras diabéticas, a Divisão de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo formou um grupo especial multidisciplinar¹⁷ para submeter essas úlceras a tratamentos com novas tecnologias, como o método de pressão negativa que aumenta a produção de células no leito da ferida¹⁸, assim como estudar a influência da neuropatia na formação e perpetuação dessas¹⁹. Como consequência natural da investigação clínica, levamos as biopsias do leito de feridas diabéticas para o laboratório (LIM), onde já realizávamos cultura de células da pele, os queratinócitos²⁰ e fibroblastos a partir de pele normal e cicatriz²¹.

Neste primeiro estudo, desenvolvemos as bases para a cultura de fibroblastos de úlceras diabéticas e comparamos a proliferação celular destes fibroblastos com fibroblastos derivados de indivíduos não-diabéticos sem úlcera.

MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob o número 0380/08. Todos os pacientes foram informados sobre a finalidade e as consequências do estudo, e então foi solicitada autorização para participação do estudo e preenchimento do termo de consentimento informado.

Biopsias do tecido de granulação de úlceras em membros inferiores foram realizadas em cinco pacientes adultos do Ambulatório de Cirurgia Plástica HCFMUSP, portadores de diabetes mellitus tipo 2, que apresentavam feridas por mais de três meses, sem sinais aparentes de infecção. Amostras de pele normal foram obtidas de cinco mulheres não-diabéticas submetidas a cirurgias estéticas para redução de mama e que doaram o excesso de pele para fins de pesquisa.

Usando a técnica de explante proposta por Carrel, as culturas de fibroblastos primários foram obtidas a partir de amostras de pele humana normal (NHF) e de tecido de granulação das feridas crônicas (DMHF). Os explantes foram cultivados em frascos de cultura de 25 cm² de superfície (TPP 90.025), em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - GIBCO I 1.965,092), contendo 2 mM de glutamina (GIBCO 25.030,081), 100 U/mL penicilina, 100 mg de estreptomicina/mL e 25 mg/mL de anfotericina B (antibiótico antimicótico - GIBCO I 5.249,062) em 10% de soro fetal bovino (FCS - GIBCO I 6.000,044) (nomeado como D₁₀) à 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂ umidificado.

A proliferação celular foi avaliada durante 27 dias a partir do dia do explante, com subpassagens em intervalos de 3-4 dias. Em cada passagem, o número de células foi contado em câmara hemocitométrica de Neubauer. Foi considerado como resultado a média aritmética dos valores obtidos ± erro padrão.

Os resultados foram estatisticamente analisados usando o teste ANOVA para amostras paramétricas. Foi adotado como válido p-valor de 0,05.

RESULTADOS

No grupo úlcera diabética, de um total de 37 biopsias realizadas, apenas cinco amostras apresentaram replicação de fibroblastos suficiente para realizar o ensaio de proliferação.

Foram observadas diferenças morfológicas entre os dois grupos de células no microscópio óptico. Fibroblastos de tecido de granulação de feridas são maiores e menos fusiformes que fibroblastos da pele normal (Figura 1).

Com o tempo, ambos os grupos apresentaram aumento significativo no número de células ($p = 0,008$). Os fibroblastos derivados de feridas de membros inferiores dos pacientes diabéticos não apresentaram redução estatisticamente significativa no número de células quando comparados aos fibroblastos de pele normal (controle) ($p = 0,113$). Há aumento do número de células de forma semelhante em ambos os grupos ($p = 0,485$), mas após 21 dias esse aumento se torna mais significativo no grupo HFN, embora a análise estatística entre as curvas não revele diferenças significativas, como demonstrado na Figura 2.

Apesar da ausência de diferenças significativas no número de fibroblastos entre os grupos, houve tendência de aumento na proliferação celular após 21 dias no grupo NHF. Esse aumento não foi significativamente diferente do grupo DMHF devido à variabilidade no comportamento individual, como demonstrado na Figura 3.

Na Figura 3A, dois indivíduos (pacientes 3 e 4, ou seja, 40% da amostra) apresentaram desempenho de proliferação muito diferente do restante do grupo. Por essa razão, houve grande variação entre as amostras, afetando a comparação com o grupo controle. Na Figura 3B, podemos observar maior homogeneidade entre as performances da proliferação de células individualmente.

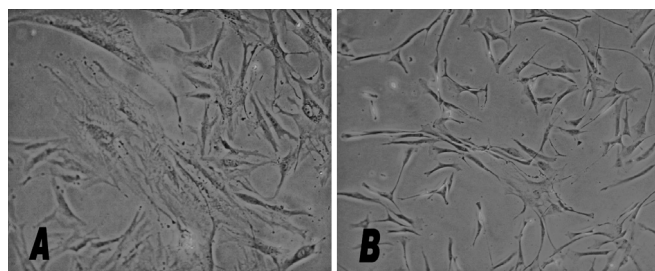


Figura 1 – A: Fibroblastos de úlcera de membros inferiores de indivíduos diabéticos cultivados em frascos de cultura de células (MO 100x). B: Fibroblastos da pele normal do indivíduo sem úlcera cultivados em frascos de cultura de células (MO 100x).

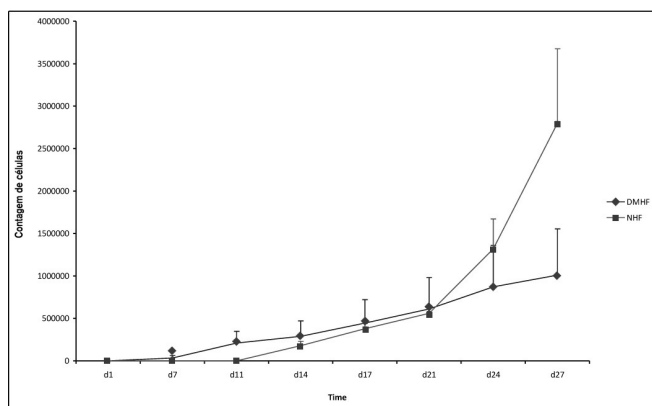


Figura 2 – Proliferação de fibroblastos de úlcera de membros inferiores de diabéticos (DMHF - $n = 5$) e fibroblastos controle de indivíduos normais sem úlcera (NHF - $n = 5$), resultado média + erro padrão da média.

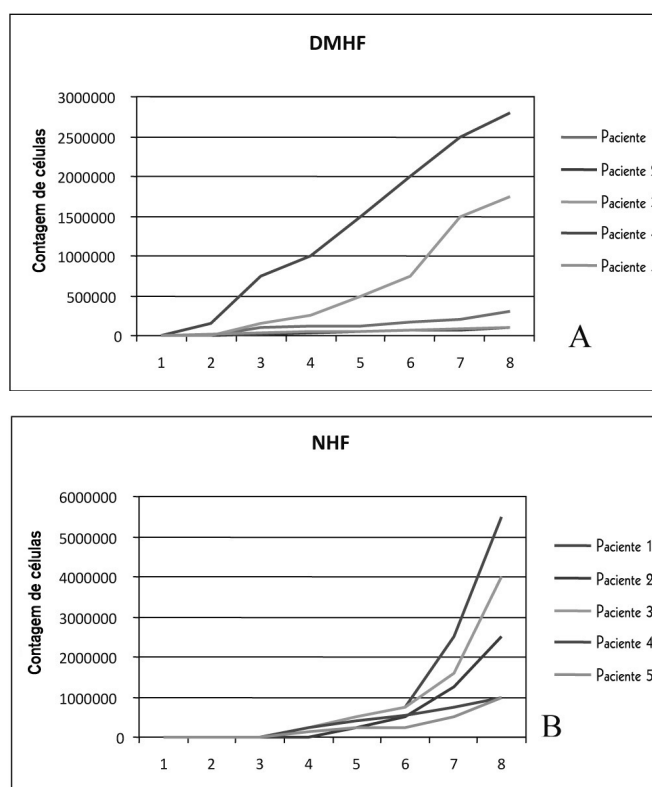


Figura 3 – A: Curva individual de proliferação de fibroblastos de úlcera diabética. Cada linha representa a curva de um paciente. B: Curva individual de proliferação de fibroblastos de pele normal. Cada linha representa a curva de um indivíduo saudável.

DISCUSSÃO

DM, há muito considerada uma doença de menor importância para a saúde no mundo, está agora a tomar o seu lugar como uma das principais ameaças para a saúde humana no século XXI⁶. O DM é conhecido por levar, prematuramente, a mudanças de

maior intensidade que normalmente são observadas nas doenças degenerativas associadas ao processo de envelhecimento humano²². Formação de úlcera dos membros inferiores e processo de cicatrização tardio são comuns nesses pacientes¹⁰.

Defeitos de cicatrização de feridas em pacientes diabéticos podem ser explicados, em grande parte, pela presença de células disfuncionais⁵. Na microscopia óptica, fibroblastos de feridas diabéticas apresentam anormalidades morfológicas, tais como alargamento das células e a presença de vacuolização citoplasmática (fenótipo hipertrófico). Essas alterações são semelhantes à senescência celular com irregularidades de membranas citoplasmáticas. Essas características sugerem que o ambiente da ferida seria responsável por modificações celulares¹². Em nossos experimentos, os fibroblastos de tecido de granulação de úlceras diabéticas observados, na microscopia óptica, eram maiores e menos fusiformes quando comparado aos fibroblastos da pele normal (Figura 1).

Contrariando os resultados apresentados por Loots et al.¹⁴ e outros autores^{23,24}, que demonstraram diferenças estatísticas na proliferação celular comparando fibroblastos derivados de úlcera diabética e de pele normal, nossos resultados não demonstraram diferença significativa na análise estatística da média. Muitos fatos podem explicar estes nossos achados.

Acreditamos que a técnica de explante proposta por Carrel (nossa escolha para a obtenção de células) é menos "agressiva" para as células que a obtenção por digestão enzimática, devido ao efeito menos deletério de enzimas, como a tripsina, sobre essas células. O contato entre as células da ferida diabética e a tripsina também pode causar alguns danos a essas células frágeis²⁵, o que pode significar que a digestão enzimática pode também interferir na proliferação celular.

A digestão enzimática do fragmento de pele inicia o ensaio de proliferação de um número definido de células, enquanto a técnica de explante conta, num primeiro momento, somente com as células que se soltam do fragmento de pele. Ressalta-se que o cultivo de fibroblastos de úlceras diabéticas é difícil e frequente contato enzimático poderia selecionar fibroblastos "não reais" do diabético, pois estes já passaram por uma "seleção" promovida pela digestão enzimática.

Em geral, estudos *in vitro* são analisados com três a cinco amostras diferentes de células por grupo, representatividade e reprodutibilidade dos resultados exigiria amostras maiores, o que não é fácil de conseguir, por isso a dificuldade de estabelecer métodos *in vitro* que retratem idealmente o comportamento *in vivo* de fibroblastos.

Outro evento observado em neste estudo foi o grande número de culturas com falta ou escassez de células, às vezes, um atraso na proliferação de fibroblastos derivados de feridas também foi notado, o que resultou na inviabilidade da realização

dos experimentos envolvendo essas células. Por estas razões, contamos com apenas cinco indivíduos do grupo de feridas diabéticas.

A manutenção da contagem de proliferação celular por mais tempo do que o período investigado, provavelmente, apresentaria diferença estatística entre proliferações celulares de ambos os grupos, uma vez que tendência de progressão exponencial foi verificada no grupo controle, enquanto que nos fibroblastos do grupo feridas diabéticas a progressão observada foi muito discreta (Figura 2 - DMHF = 1×10^6 e NHF = 2.8×10^6). No entanto, foi adotado os 27 dias para interromper este ensaio para excluir interferências como múltiplas passagens nas cultura de células, modificações ou alta mortalidade por apoptose ou, ainda, senescência celular (dados não comprovados). Várias anormalidades no comportamento de células têm sido correlacionadas com a redução no número de células e cicatrização prejudicada nos diabéticos, entre eles há o envelhecimento celular induzido pelo próprio fenômeno do diabetes (envelhecimento intrínseco)¹⁴.

Uma das principais preocupações em culturas de células retiradas de áreas colonizadas por bactérias, tais como feridas crônicas, é o risco de infecção. Embora protocolos de anti-sepsia rigorosa sejam utilizados para obtenção de amostras de tecido vivo e na descontaminação de fragmentos de tecido, contaminação da cultura pode acontecer²⁶, principalmente em feridas diabéticas²⁷, como observado neste estudo.

Portanto, é possível que o desbridamento cirúrgico possa corrigir algumas das anomalias presentes em feridas diabéticas²⁸. Tem sido demonstrado que a limpeza cirúrgica, transformar uma ferida crônica em aguda que iria melhorar o processo de cicatrização, quando comparada a feridas não desbridadas. Essa explicação não se baseia apenas na remoção de tecidos necróticos, mas também na exposição de células presentes no interior da ferida, que são biologicamente capazes de responder aos estímulos de cura. Acredita-se que, no ambiente da ferida, existem células com diferentes intensidades de respostas à cicatrização, o que torna difícil compreender o papel do envelhecimento e da proliferação de fibroblastos alterados²⁹. Então, enfrentamos um dilema, ou limpar vigorosamente o leito da ferida, para evitar altos níveis de contaminação bacteriana, arriscando-se a alterar as características dos fibroblastos obtidos, ou preservar, tanto quanto possível, o leito dessa ferida, correndo o risco de perder nossas culturas devido à infecção bacteriana. É por isso que das 36 biopsias procedidas obtivemos apenas cinco amostras de fibroblastos de úlcera diabética.

Mesmo que a capacidade de replicação das células entre em declínio, alguns raros clones de fibroblastos com potencial de replicação preservado continuam a existir nas culturas celulares. Portanto, a proliferação *in vitro* pode refletir apenas a propagação expansiva das maiores clone sobreviventes¹⁶.

Assim, tendo em vista os resultados controversos obtidos neste estudo, é necessária a realização de estudos adicionais como *life span*, para melhor compreensão do comportamento proliferativo desses fibroblastos, o que indiretamente avalia sua capacidade de cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos.

REFERÊNCIAS

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sgree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047-53.
2. Malerbi D, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 years. *Diabetes Care*. 1992;15(1):1509-16.
3. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO consultation. Geneva:WHO;2006.
4. Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, Azevedo MJ. Diabetes mellitus: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(1):16-26.
5. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care*. 2005;28(2):461-8.
6. Rathur HM, Boulton AJM. The neuropathic diabetic foot. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(1):14-25.
7. Reiber GE, Vileikyte L, Boyko EJ, del Aguila M, Smith DG, Lavery LA, et al. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*. 1999;22(1):157-62.
8. Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. In: Harris MJ, Stern MP, eds. *Diabetes in America*. Bethesda:US Government Printing Office;1995. p.409-28.
9. International Diabetes Federation. Time to act: diabetes and foot care. Brussels:International Diabetes Federation;2005.
10. Varani J, Perone P, Merfert MG, Moon SE, Larkin D, Stevens MJ. All-trans retinoic acid improves structure and function of diabetic rat skin in organ culture. *Diabetes*. 2002;51(12):3510-6.
11. Frykberg RG. Epidemiology of diabetic foot: ulceration and amputation. *Adv Skin Wound Care*. 1999;12(3):139-41.
12. Sibbald RG, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24(Suppl 1):S25-S30.
13. Acosta JB, del Barco DG, Vera DC, Savigne W, Lopez-Saura P, Nieto GG, et al. The pro-inflammatory environment in recalcitrant diabetic foot wounds *Int Wound J*. 2008;5(4):530-9.
14. Loots MA, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on the lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res*. 1999;291(2-3):93-9.
15. Wall IB, Moseley R, Baird DM, Kipling D, Giles P, Laffafian I, et al. Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol*. 2008;128(10):2526-40.
16. Maier AB, Westendorp RG. Relation between replicative senescence of human fibroblasts and life history characteristics. *Ageing Res Rev*. 2009;8(3):237-43.
17. Ferreira MC, Tuma Jr P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. *Clinics*. 2006;61(6):571-8.
18. Ferreira MC, Carvalho VF, Kamamoto F, Tuma Jr P, Paggiaro AO. Negative pressure therapy (vacuum) for wound bed preparation among diabetic patients: case series. *São Paulo Med J*. 2009;127(3):166-70.
19. Carvalho VF, Ferreira MC, Vieira SA, Ueda T. Cutaneous sensibility threshold in the feet of diabetic patients with pressure specified sensory device: an assessment of the neuropathy. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(1):29-34.
20. Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artif Organs*. 2003;27(8):701-5.
21. Isaac C, Mathor MB, Bariani G, Paggiaro AO, Herson MR, Goldenstein-Schainberg C, et al. Pentoxifylline modifies three-dimensional collagen lattice model contraction and expression of collagen types I and III by human fibroblasts derived from post-burn hypertrophic scars and from normal skin. *Burns*. 2009;35(5):701-6.
22. Vracko R, Benditt EP. Restricted replicative life-span of diabetic fibroblasts in vitro: its relation to microangiopathy. *Fed Proc*. 1975;34(1):68-70.
23. Hehenberger K, Heilborn J, Brismar K, Hansson K. Inhibited proliferation in fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and in normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of L-lactate. *Wound Repair Regen*. 1998;6(2):135-41.
24. Hehenberger K, Hansson A, Heilborn JD, Abdel-Halim SM, Ostensson CG, Brismar K. Impaired proliferation and increased L-lactate production of dermal fibroblasts in the GK-rat, a spontaneous model of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Wound Repair Regen*. 1999;7(1):65-71.
25. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*. 2010;17:36.
26. Klingbeil MFG. Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos [Dissertação de mestrado]. São Paulo:Universidade de São Paulo, Instituto Pesquisas Energéticas e Nucleares;2006.
27. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*. 2004;145(6):2997-3003.
28. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736-43.
29. Brem H, Stojadinovic O, Diegelmann RF, Entero H, Lee B, Pastar I, et al. Molecular markers in patients with chronic wounds to guide surgical debridement. *Mol Med*. 2007;13(1-2):30-9.

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Cicatrização, Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.