

VERONICA CHOMISKI BICALHO CUSTÓDIO

**FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITO
(KGF) NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO
EM QUERATINÓCITOS DE PACIENTES COM
QUEIMADURA**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências**

SÃO PAULO

2015

VERONICA CHOMISKI BICALHO CUSTÓDIO

**FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITO
(KGF) NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO
EM QUERATINÓCITOS DE PACIENTES COM
QUEIMADURA**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO GRAGNANI FILHO
COORIENTADORES: PROF. SILVANA A. ALVES CORREA
PROF. SAMUEL M. RIBEIRO DE NORONHA

SÃO PAULO

2015

Custódio, Verônica Chomiski Bicalho

Fator de crescimento de queratinócito (KGF) na expressão gênica da cicatrização em queratinócitos de pacientes com queimadura./ Verônica Chomiski Bicalho Custódio. -- São Paulo, 2015.
xiv, 93f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Keratinocyte growth factor (KGF) on wound healing gene expression in keratinocytes from burned patients.

1. Queimadura; 2. Expressão gênica; 3. Cicatrização; 4. Fator de crescimento de queratinócito (KGF); 5. Queratinócitos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Ao **FABRÍCIO**, meu marido, com quem compartilho minha vida e alma, angústias e alegrias, sonhos e projetos, derrotas e vitórias, enfim, ao meu grande amor.

A toda minha **FAMÍLIA**, que é a essência do meu ser. Em especial, aos meus pais **ROBERTO** (*in memoriam*) e **ELIANE**, que sempre foram muito atuantes na educação das filhas, sem medir esforços para apoiar nossos sonhos.

Aos meus **AMIGOS**, que fazem dos nossos encontros momentos especiais, energizantes e ímpares. Ao vivo ou *on line*, tem sempre uma palavra de alegria, de carinho, incentivo e conforto nos momentos difíceis.

A todas as pessoas que passaram por minha vida, e àquelas que ainda estão, que são fontes de minha inspiração para nunca deixar de estudar.

AGRADECIMENTOS

À **PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASA KO FERREIRA**,
PROFESSORA TITULAR da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), pela oportunidade acadêmica, estímulo à minha formação científica, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO**,
PROFESSOR ADJUNTO LIVRE-DOCENTE da Disciplina de Cirurgia Plástica e COORDENADOR do Programa de Pós-Graduação de Cirurgia Translacional da UNIFESP/EPM, pela sua atenção, estímulo constante e orientação em todos os estudos realizados neste Programa.

Ao **PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO**,
PROFESSOR ADJUNTO da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, orientador do presente estudo, por ter me acolhido nesta jornada e por toda a sua atenção e seu tempo dedicado nesta orientação. É um exemplo de orientador, pesquisador e professor, muito coerente, ético e dedicado em seu trabalho.

À **PROFESSORA SILVANA APARECIDA ALVES CORREA** e
ao **PROFESSOR SAMUEL MARCOS CORREA DE NORONHA**,
COORIENTADORES desse estudo, participantes do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica e do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP-EPM, por transmitir seus conhecimentos com muita clareza e pelo apoio nessa nossa jornada.

À toda equipe multiprofissional da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, pela dedicação e respeito aos pacientes vítimas de queimadura.

Aos **PACIENTES**, que participaram desse estudo, por viabilizarem a evolução do conhecimento na área e aperfeiçoamento no tratamento, colaborando para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica, com quem aprendi muito e lutamos juntos para a evolução do grupo. Em especial à **JÉSSICA BONUCCI** e ao **RAFAEL PETECOF**, que me apoiaram na evolução desse estudo e pelo espírito de equipe.

Aos colegas do Curso de Aperfeiçoamento em Pesquisa Cirúrgica e do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP-EPM, pela rica convivência e troca constante de experiências, pela amizade e companheirismo, pelo incentivo e críticas que fizeram cada um de nós evoluirmos pessoal e profissionalmente. Em especial, à **ADRIANA CORBOLAN, CAROLINA ORTEGA, DANIELLE GITTI, ISABELLA AGUIAR, LILIAN ARRUDA, MARIA ELIZA SAMY, MARIANA NEGRÃO** e **VANESSA SUZUKI**.

À **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE** e **SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, pela gentileza no atendimento, eficiência e pelo carinho que sempre dispensaram a mim.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.

(Aristóteles, séc IV a.C.)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
A GRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA.....	xii
RESUMO.....	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	07
3. LITERATURA.....	09
4. MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÃO.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	62
NORMAS ADOTADAS.....	74
<i>ABSTRACT</i>	75
APÊNDICES.....	76
ANEXOS.....	91
FONTES CONSULTADAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interação dinâmica entre fatores de crescimento, citocinas e diferentes tipos celulares na de cicatrização	16
Figura 2: Quantificação de RNA total por meio de Nanovue® (Agilent Tech. Inc., Palo Alto, EUA)	27
Figura 3. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 1 entre GC+ versus GC-.....	35
Figura 4. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 1 entre GC+ versus GC-.....	36
Figura 5. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 2 entre GQ- versus GC-.....	37
Figura 6. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 2 entre GQ- versus GC-.....	38
Figura 7. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.....	39
Figura 8. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.....	40
Figura 9. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ+ versus GQ-.....	40
Figura 10. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ+ versus GQ-.....	42
Figura 11. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.....	43
Figura 12. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.....	44
Figura 13. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ- versus GC+.....	46

Figura 14. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ- versus GC+.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Human Wound Healing PCR Array</i> (Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores da cicatrização.....	29
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados (média de idade e gênero) dos pacientes incluídos no estudo e que compõe o Banco de RNA e de fragmentos de queimados para expressão gênica.....	33
Tabela 2. Número de genes diferencialmente expressos da expressão gênica relativa dos grupos Queimadura e Controle, na presença ou ausência de KGF, sendo que em cada comparação o segundo grupo é sempre o grupo de referência.....	33
Tabela 3. G Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes das comparações efetuadas que possuem GQ como grupo experimental.....	34
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 1 entre o GC+ <i>versus</i> GC-.....	36
Tabela 5. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 2 entre o GQ- <i>versus</i> GC-.....	38
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 3 entre o GQ+ <i>versus</i> GC-.....	40
Tabela 7. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 4 entre o GQ+ <i>versus</i> GQ-.....	42
Tabela 8. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 5 entre o GQ+ <i>versus</i> GC+.....	45
Tabela 9. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 6 entre o GC+ <i>versus</i> GC+.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	actina-beta.
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico.
CD14	grupo de diferenciação-14 (do inglês <i>cluster of differentiation-14</i>).
CINC	citocina quimiotrativa de neutrófilos (do inglês <i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant</i>).
CINC-1	citocina quimiotrativa de neutrófilos-1 (do inglês <i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1</i>).
CINC-2	citocina quimiotrativa de neutrófilos-2 (do inglês <i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2</i>).
CINC-3	citocina quimiotrativa de neutrófilos-3 (do inglês <i>cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3</i>).
CO ₂	gás carbônico.
CX3C	quimiocina CX3C.
CXC	quimiocina cxc.
CC	quimiocina cc.
XC	quimiocina xc.
CXCL12	quimiocina cxc ligante 12.
DCP	Disciplina de Cirurgia Plástica.
DMEM	meio eagle modificado por dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i>).
DNA	ácido desoxirribonucleico.
EGFR-1	receptor de fator de crescimento epidermal-1 (do inglês <i>epidermal growth factor receptor 1</i>).
<i>et al.</i>	e colaboradores.
ETR101	proteína de resposta imediata 101 (do inglês <i>immediate early protein</i>), sinônimo: ier101.
FBS	soro fetal bovino.
FC	fator de crescimento.
FGF	fator de crescimento de fibroblasto.
FGF-1	fator de crescimento de fibroblasto-1 (ou aFGF– FGF ácido).
FGF-2	fator de crescimento de fibroblasto-2 (ou bFGF– FGF básico).
FGF-5	fator de crescimento de fibroblasto-5.
FGF-7	fator de crescimento de fibroblasto-7 (ou KGF).
FGFR2	receptor de fator de crescimento de fibroblasto-2.
FGFR2-IIIb	receptor de fator de crescimento de fibroblasto 2-IIIb.
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase.
GC	grupo controle.
GC-	grupo controle sem KGF.
GC+	grupo controle com KGF.
GQ	grupo queimadura.
GQ-	grupo queimadura sem KGF.

GQ+	grupo queimadura com KGF.
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio.
HPRT1	hipoxantina fosforibosiltransferase 1.
HSP	Hospital São Paulo.
HU	Hopital Universitário.
IL	interleucina.
IL-1	interleucina-1.
IL-10	interleucina-10.
IL-13	interleucina-13.
IL-13RA1	subunidade alfa 1 do receptor de interleucina-13 (do inglês <i>interleukin-13 receptor subunit alpha-1</i>).
IL-1beta	interleucina-1 beta.
IL-5RA	subunidade alfa do receptor de interleucina-5 (do inglês <i>interleukin 5 receptor, alpha</i>).
IL-6	interleucina-6.
KGF	fator de crescimento de queratinócito (ou FGF7).
LCT	Laboratorio de Cirurgia Translacional.
MCP-1	proteína quimiotática de monócito-1.
MiRNA	micro RNA.
MMP-1	metaloproteinase tipo-1.
PCR	reação em cadeia de polimerase.
PBS	tampão fosfato salino (do inglês <i>buffer phosphate-saline</i>).
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas.
PDGFBB	polipeptídeo b derivado de fator de crescimento de plaquetas.
qPCR <i>Array</i>	reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa.
RNA	ácido ribonucleico.
ROS	espécies reativas de oxigênio.
SCQ	superfície corporal queimada.
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido.
TGFB1	fator de crescimento transformante beta-1.
TNF	fator de necrose tumoral.
TNF-alfa	fator de necrose tumoral-alfa.
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo.
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo.
UTQ	Unidade de Tratamento de Queimaduras.
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular.

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

-	menos.
%	por cento.
<	menor.
>	maior.
°C	graus Celsius.

µg	micrograma.
µg/mL	micrograma por mililitro.
µm	micrômetro.
Cm	centímetro.
cm ²	centímetro quadrado.
Cp	ponto de cruzamento (do inglês <i>crossing point</i>).
Cq	quantificação do ciclo (do inglês <i>quantification cycle</i>).
C _T	limiar do ciclo (do inglês <i>cycle threshold</i>).
L	litro.
M	molar.
mg/mL	miligrama por mililitro.
mL	mililitro.
mV	milivolt.
pH	potencial de hidrogênio.
mol/L	mol por litro.
mos/kg	miliosmolalidade por quilo.
n g/mL	nanograma por mililitro.
valor-p	nível descritivo do teste.
u/mL	unidade por mililitro.
rpm	rotações por minuto.
Δcq	variação da quantificação do ciclo.
TOP	Ponto de partida (do inglês <i>take-off point</i>).

RESUMO

Introdução: Queimadura extensa e profunda é um trauma complexo que necessita de cuidados intensivos no tratamento agudo. Intervenções terapêuticas para atenuar a resposta inflamatória aguda e acelerar a cicatrização podem contribuir na redução da morbimortalidade e nos custos do tratamento. Estudos demonstram a importância do fator de crescimento de queratinócito (KGF) na cicatrização de feridas. **Objetivo:** Avaliar a ação do KGF na expressão de 84 genes marcadores da cicatrização em cultura primária de queratinócitos humanos oriundos de pacientes com queimadura. **Métodos:** Após a obtenção de fragmentos de pele de quatro pacientes com queimadura (grupo queimadura) e de quatro pacientes hígidos (grupo controle), foi realizada a cultura de queratinócitos humanos primários e distribuídas em quatro grupos: GQ+ (n = 4 – queratinócitos de queimadura tratadas com KGF), GQ- (n = 4 – queratinócitos de queimadura sem tratamento), GC+ (n = 4 – queratinócitos do grupo controle tratadas com KGF) e GC- (n = 4 – queratinócitos do grupo controle sem tratamento). A análise da expressão gênica foi feita por qPCR Array, realizando seis comparações: 1) GC+ versus GC-; 2) GQ- versus GC-; 3) GQ+ versus GC-; 4) GQ+ versus GQ-, 5) GQ+ versus GC+ e 6) GQ- versus GC+. **Resultados:** A comparação 1 apresentou um gene hiporregulado e um hiperregulado. As comparações 2 e 3 apresentaram os mesmos cinco genes hiporregulados. A comparação 4 não apresentou genes diferencialmente expressos. A comparação 5 apresentou 26 genes hiporregulados e 7 hiperregulados. E a comparação 6 apresentou 25 genes hiporregulados e 11 genes hiperregulados. **Conclusão:** A suplementação de KGF à cultura de queratinócitos de pacientes com queimadura não determinou a expressão gênica diferencial dos genes marcadores da cicatrização.

Palavras-chave: 1. Queimadura; 2. Expressão gênica; 3. Cicatrização; 4. Fator de crescimento de queratinócito (KGF); 5. Queratinócitos.

1. INTRODUÇÃO

Queimadura extensa e profunda é um trauma complexo de elevada morbimortalidade, com graves consequências imediatas e tardias, que necessita de cuidados intensivos no quadro agudo, na ressuscitação em termos de hemodinâmica, no tratamento da dor, nas trocas diárias de curativos, na prevenção e tratamento da sepse, nas cirurgias e nas enxertias (GAUGLITZ *et al.*, 2008; REAL *et al.*, 2014). Ainda, se fazem necessários cuidados especiais com esses pacientes devido às sequelas psicossociais (HERNDON *et al.*, 1989; VALE, 2005; WOLF, TOMPKINS, HERDON, 2014).

Anualmente, mais de 6 milhões de pessoas sofrem danos por queimaduras no mundo e cerca de 300.000 vítimas vem a óbito (PENN, GROBBELAAR, ROLFE, 2012; MITSUNAGA *et al.*, 2012). Nos EUA, a estimativa anual ultrapassa 1 milhão de vítimas, sendo que 50 mil casos necessitam de atendimentos em hospitais especializados e 5.000 vítimas vem a óbito, tornando-se a quarta maior causa de morte por ferimentos não intencionais. (SHERIDAN, 2003; GRECO *et al.*, 2010, EDELMAN, 2007; ABA, 2014).

No Brasil, não há estatística oficial (IURK *et al.*, 2010). Entretanto, os casos de queimaduras representam um agravo significativo à Saúde Pública. Dados do Ministério da Saúde de 2012 apontam que, em 2011, houveram 1.437 internações em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) de Queimados, com 17,95% de óbitos e, em 2010, foram registradas 1.283 internações e a taxa de óbito foi de 18,16% (PORTAL DA SAUDE, 2012).

A lesão por queimadura é um evento traumático que pode ser de origem térmica, elétrica, química, por radiação, sendo as queimaduras térmicas as mais comuns. A morbidade e a mortalidade das queimaduras estão relacionadas com a extensão da superfície corporal atingida e a profundidade das queimaduras na pele, estado hipermetabólico, além da idade e presença de lesão inalatória (HERNDON *et al.*, 1989; SONG *et al.*, 2012). A infecção é a principal causa de mortalidade de pacientes com grave queimadura (GRAGNANI *et al.*, 2014a).

Em relação à extensão, as lesões por queimaduras são classificadas em pequenas, quando atingem até 10% da superfície corporal queimada (SCQ); médias, entre 10 e 25% SCQ e grandes, nos casos acima de 25% SCQ. Em relação à

profundidade, são classificadas como lesões de primeiro grau, comprometendo apenas a epiderme sem formação de bolhas; de segundo grau, quando acomete toda a epiderme, derme papilar e, às vezes, até a derme reticular e, por fim, de terceiro grau, quando atinge a tela subcutânea, podendo estender-se aos músculos e ossos (NGUYEN *et al.*, 1996; VALE, 2005; EVERS, BHAVSAR, MAILANDER, 2010; DEGIM *et al.*, 2011).

Além da pele, a queimadura afeta vários órgãos e promove respostas locais e sistêmicas no organismo (EVERS, BHAVSAR, MAILANDER, 2010). Há diminuição da perfusão tecidual, hipotensão prolongada, edema, infecção, alteração hipermetabólica sistêmica com catabolismo e extensa destruição de proteínas, podendo levar à perda irreversível do tecido (HETTIARATCHY & DZIEWULSKI, 2004; ABDULLAHI & JESCHKE, 2014; DIAZ *et al.*, 2015).

As alterações anatômicas, fisiológicas, endócrinas e imunológicas contribuem para a falência de múltiplos órgãos, levando ao aumento na taxa de morbimortalidade (BILATE, 2007; GAUGLITZ *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2012). A alta incidência de infecção em paciente com queimadura é uma grande preocupação em sua evolução clínica, pois está diretamente relacionada com a morbimortalidade (NORONHA *et al.*, 2014a).

A resposta inflamatória é a primeira etapa de um processo de regeneração ou reparo tecidual após qualquer tipo de injúria (GOSAIN & GAMELLI, 2005). As citocinas são mediadores primários presentes na resposta inflamatória que promovem a comunicação autócrina, parácrina e endócrina entre vários tipos de células. E a lesão térmica aumenta o nível sérico de citocinas (GAUGLITZ *et al.*, 2008, GRAGNANI *et al.*, 2013, GRAGNANI *et al.*, 2014b).

Peptídeos antimicrobianos da resposta imune inata de células epiteliais ajudam a proteger o organismo através da ativação de células inflamatórias ou da inativação de agentes patogênicos, melhorando a resistência contra a infecção microbiana (NORONHA *et al.*, 2014b). Entretanto, o prolongamento da resposta inflamatória dificulta a cicatrização por elevar demasiadamente o nível de citocinas no local e promover degradação de colágeno, apoptose celular, comprometimento vascular e produção de radicais livres do oxigênio (SHUPP *et al.*, 2010).

Nas primeiras 24 a 48 horas após a lesão, pode ocorrer aprofundamento progressivo da área lesada (GIBRAN & HEIMBACH, 2000; GRECO *et al.*, 2010). Nos dias seguintes à lesão, alterações extensas na expressão gênica geram distúrbios que podem comprometer a capacidade da cicatrização (ARTURSON, 1980; GRECO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012).

Métodos para melhorar a cicatrização de feridas e reparo dos tecidos, intervenções terapêuticas que atenuem a resposta inflamatória aguda e diminuam a expressão das citocinas após lesão por queimadura, podem oferecer oportunidades de reduzir a taxa de mortalidade e melhorar a qualidade de vida de pacientes, além de contribuir na redução de custos em cuidados com a saúde (HERNDON & TOMPKINS, 2004; GOSAIN & GAMELLI, 2005; BAXTER *et al.*, 2012). Uma melhor compreensão do valor terapêutico dos fatores de crescimento (FC) pode ser essencial para aprimorar a terapia em queimados (WEARING & SHERRATT, 2000; GREAVES *et al.*, 2013).

Os FC pertencem a uma classe de citocinas que atuam no reparo e cicatrização tecidual, modulando a proliferação, migração e aumento da atividade metabólica das células (FITZPATRICK & ROSTAN, 2003; DAMANTE, 2007). Dados sugerem que os FC produzidos no local da ferida possam influenciar as células vizinhas por sinalização autócrina e parácrina (SCHULTZ *et al.*, 1991). Evidências experimentais e clínicas demonstram vantagens terapêuticas para o processo de cicatrização da ferida na presença desses agentes (CHING *et al.*, 2011).

O fator de crescimento de queratinócito (KGF), também conhecido por fator de crescimento de fibroblasto-7 (FGF-7), parece ter um papel único como um mediador na interação mesenquimal-epitelial. O KGF origina-se a partir de células mesenquimais, e atua exclusivamente em células epiteliais (ORR-URTREGER *et al.*, 1993; WERNER *et al.*, 1992). Vários estudos demonstraram a importância do KGF na cicatrização de feridas.

Segundo WERNER *et al.* (1992), há aumento expressivo de mRNA que codifica KGF (ou FGF-7) em camundongos após uma lesão cutânea, diferente do encontrado para FGF-1, FGF-2 e FGF-5, concluindo que os queratinócitos basais são estimulados por KGF derivado da via dérmica durante a cicatrização de feridas, com um papel exclusivo na reparação de feridas. Outro estudo do mesmo autor (WERNER *et al.*,

1994), em lesão cutânea em camundongos, demonstra que a inibição da sinalização do receptor de KGF reduziu a taxa de proliferação de queratinócitos epidérmicos nas bordas da ferida, resultando em um retardo significativo na reepitelização.

STAIANO-COICO *et al.* (1993) identificaram melhora na cicatrização de feridas em orelha de coelhos com KGF exógeno. PIERCE *et al.* (1994) constataram que KGF exógeno acelerou a cicatrização de feridas em orelha de porcos. Outro estudo mostrou que a injeção de KGF acelerou o fechamento de ferida e reduziu a inflamação em ratos diabéticos (MARTI *et al.*, 2004).

Com base no ponto de vista da biologia moderna, a injúria leva a alteração na resposta inflamatória e pode ser acompanhada por uma alteração na expressão gênica (WU *et al.*, 2004). Tanto a análise quantitativa quanto a comparação dos perfis de expressão gênica fornecem uma estimativa mais precisa do tempo de ativação, padrões de expressão e características de uma resposta induzida por queimadura (YANG *et al.*, 2012).

A expressão gênica de citocinas e de receptores inflamatórios pelos fibroblastos está associada à condição de estresse do ambiente em que as células estão submetidas, o que acontece na maioria das células (KESSLER-BECKER, KRIEG, ECKES, 2004). A morfogênese da pele é comandada por conjuntos de microRNAs (miRNAs) expressos diferencialmente (YI *et al.*, 2006). Os miRNA representam uma nova classe de RNAs endógenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos, e atuam como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo (RICARTE FILHO & KIMURA, 2006).

Técnicas avançadas utilizando miRNA possibilitam uma investigação da expressão de milhares de genes de diferentes tecidos de um organismo, sob diferentes condições ambientais e estágios de desenvolvimento (ROSA, ROCHA, FURLAN, 2007). Deste modo, é possível investigar, indiretamente, quais genes são responsáveis pelo fenótipo das doenças através da quantificação de RNAs transcritos (PADDOCK *et al.*, 2003).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR *Array*) é um método que possibilita a amplificação *in vitro* do DNA. Foi desenvolvido por Kary Mullis em 1984 (MULLIS, 1990) a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR)

convencional. É amplamente utilizado para detectar e quantificar com precisão quantidades muito pequenas de sequências de ácidos nucleicos específicos, determinando valores na fase exponencial da reação (BUSTIN *et al.*, 2009; PAGE & STROMBERG, 2011; SANDERS *et al.*, 2014).

Sabendo-se que uma queimadura cutânea deflagra uma resposta inflamatória intensa alterando a expressão gênica, e que o qPCR *Array* é um método eficaz para avaliar quais os genes dos queratinócitos são alterados durante a fase aguda da inflamação, entende-se a importância em elucidar os mecanismos que regulam essa expressão gênica e conhecer os processos que influenciam na regeneração da cobertura perdida na queimadura.

Para a próxima década, segundo WOLF, TOMPKINS e HERNDON (2014), continuarão sendo apoiadas novas pesquisas no tratamento da queimadura que utilizem métodos já estabelecidos a fim de controlar a inflamação, regular o hipermetabolismo, acelerar a cicatrização das lesões por queimadura, como a identificação de biomarcadores, bem como pesquisas sobre reabilitação dos pacientes e aspectos psicológicos (WOLF, TOMPKINS, HERNDON, 2014).

Portanto, foi elaborada a hipótese de analisar a expressão gênica relativa de queratinócitos de pacientes com grande queimadura comparado a um grupo controle de referência. A finalidade foi construir um perfil de genes diferencialmente expressos na presença e ausência de KGF, na tentativa de identificar biomarcadores da queimadura, comparando e analisando posteriormente os grupos entre si.

2. OBJETIVO

2.OBJETIVO

O objetivo do estudo foi avaliar a ação do KGF na expressão de 84 genes marcadores da cicatrização em cultura primária de queratinócitos humanos oriundos de pacientes com queimadura.

3. LITERATURA

QUEIMADURA

NGUYEN *et al.* (1996) revisaram estudos e ensaios clínicos que incluem reposição volêmica, sepse, função imunológica, hipermetabolismo, desbridamento precoce, restauração da ferida, formação de cicatriz e lesão por inalação de gases. Queimaduras resultam em alterações fisiológicas que podem ser minimizadas com o uso de reposição volêmica para manter a perfusão tecidual e promover uma recuperação rápida. Ao combinar a reposição volêmica com suporte nutricional e uso adequado de antibióticos, notaram um decréscimo da resposta hipermetabólica e da incidência de sepse, fatores esses que levam à instabilidade hemodinâmica e falência dos órgãos.

HAN *et al.* (2004) realizaram um estudo observacional sobre alterações dinâmicas de alguns mediadores inflamatórios em queimaduras graves. Dezessete (17) pacientes adultos com grande queimadura foram incluídos. Assim que chegavam à unidade de emergência, os pacientes eram anestesiados e as cirurgias eram agendadas. Como o agendamento acontecia com 3 dias de antecedência, amostras de sangue foram coletadas quatro vezes no intervalo de 72 e 24 horas antes da cirurgia e 24 e 72 horas no pós-operatório. Os pesquisadores identificaram redução de endotoxinas no pós-operatório, aumento do fator de necrose tumoral-alfa (TNF α) e, conseqüentemente, de interleucina-10 (IL-10), que é uma resposta anti-inflamatória do organismo e em relação às moléculas de adesão, a redução de E-selectin, uma importante molécula de adesão que está associada à inflamação sistêmica. Concluíram que quanto antes for realizado o desbridamento, menor a suscetibilidade a complicações.

GAUGLITZ *et al.* (2008) descreveram que o estado hipermetabólico gerado por uma queimadura grave é guiado por uma intensa resposta inflamatória. No experimento, 8 ratos foram submetidos a uma queimadura grave de espessura total que comprometia 60% da superfície corporal. Em seguida, colheram soro nos seguintes momentos: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96 e 168 h após a lesão. Foram avaliadas as seguintes citocinas presentes na resposta inflamatória: interleucina-1beta (IL1beta), IL-6, IL-10, fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1), as seis com uns em humanos, mais três citocinas induzidas por quimioatração de neutrófilos específicas de ratos CINC-1, CINC-2 e CINC-3, sendo CINC semelhante a IL-8 em humanos. A queimadura provocou aumento significativo

nos níveis séricos de IL-1beta, IL-6, IL-10, MCP-1, CINC-1, CINC-2 e CINC-3 quando comparados com o grupo controle (n = 4 ratos). Os níveis séricos de TNF-alfa e VEGF não tiveram diferenças significativas quando comparadas com os controles. Diante dos dados obtidos, concluíram ser possível desenvolver novos estudos no tratamento anti-inflamatório.

SONG *et al.* (2012) realizaram biópsias em pele e músculo de oito voluntários pediátricos com grave queimadura e compararam com pacientes pediátricos hígidos a fim de determinar a expressão de eEF2, uma proteína responsável pela síntese proteica, e a inativação da eEF2 quinase (eEF2K), sendo que a inativação de eEF2K por fosforilação promove inativação de eEF2 e, por consequência, a síntese proteica. Coletaram os tecidos dos pacientes com queimadura em três momentos distintos, sendo o primeiro logo após o trauma, entre 0-10 dias pós-trauma, o segundo em um tempo médio, entre 11-49 dias pós-trauma, e o terceiro tardiamente, entre 50-365 dias pós-trauma. Avaliaram o gasto energético de repouso, ou taxa metabólica basal, a composição corporal e taxa de síntese de proteína muscular. Identificaram hipermetabolismo persistente nos pacientes com queimadura devido ao aumento da taxa metabólica basal e perda de massa muscular magra sem alteração da síntese proteica, indicando uma mudança para catabolismo pós-queimadura. Concluíram que a queimadura induz a ativação prolongada de eEF2K e eEF2 e que alterações nestes mediadores podem contribuir para o intenso hipermetabolismo observado em pacientes com grave queimadura.

JESCHKE *et al.* (2014) avaliaram se um painel de biomarcadores poderiam ser utilizados para determinar a sobrevivência de 230 pacientes pediátricos com grave queimadura, sendo que 79 das 230 crianças vieram a óbito. Foram analisadas características demográficas, resultados clínicos e perfis sorológicos da resposta inflamatória aguda, como citocinas, hormônios e proteínas, em 11 momentos durante 180 dias pós-queimadura. Encontraram diferenças profundas nos biomarcadores da inflamação e do metabolismo em cada avaliação entre os pacientes sobreviventes e não sobreviventes. Os não sobreviventes tinham níveis séricos significativamente mais elevados de IL-6, IL-8, fator estimulante de colônias granulocitárias (GCSF ou CSF3), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína C-reativa, glicose, insulina, azoto de ureia no sangue, creatinina e bilirrubina. Além disso, os pacientes não

sobreviventes apresentaram maior hipermetabolismo, que foi associado ao aumento da disfunção dos órgãos e à sepse quando comparado com os sobreviventes. Concluíram que os pacientes não sobreviventes apresentam diferentes trajetórias na resposta inflamatória, no metabolismo e nas respostas de fase aguda, o que possibilita novos modelos preditivos para melhorar e personalizar a evolução da queimadura.

FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITO (KGF)

RUBIN *et al.* (1989) isolou o KGF pela primeira vez e, mais tarde, o KGF foi identificado como um membro da família do FGF, designado FGF-7 por FINCH *et al.* (1989). Sua ação parácrina foi descrita por ORR-URTREGER *et al.* (1993), pois sabia-se que o KGF era produzido no mesenquima, pelos fibroblastos, mas que atuava apenas em receptores epiteliais, em queratinócitos.

WERNER *et al.* (1994) revelaram uma sinalização direta do receptor de KGF na morfogênese da epiderme e dos folículos capilares e, indiretamente, no controle da formação de tecido conjuntivo na derme, o que indica uma interação no complexo epiderme-derme durante morfogênese da pele. Os resultados demonstraram que o KGF é essencial para a reepitelização da ferida e que o bloqueio da função de KGF está associado a anormalidades na cicatrização de feridas.

CHEDID *et al.* (1994) investigaram a influência de vários fatores de crescimento na expressão de RNA de KGF em fibroblastos embrionários. Incubaram fibroblastos humanos (M426) com diferentes citocinas, várias vezes, em um período de 24 horas. A IL-1 mostrou-se forte indutor na transcrição de KGF, aumentando 6 vezes após 6 horas do estímulo e normalizando o nível após 24 horas. PDGFBB, IL-6 e TGF-alfa também se mostraram indutores da expressão de KGF. Já TNF-alfa e bFGF não apresentaram variação na expressão de KGF. A IL-1 mostrou-se como principal citocina indutora da expressão gênica de KGF em fibroblastos humanos, estando presente nos processos inflamatórios e de cicatrização de feridas. A transcrição de KGF foi dose e tempo dependente de IL-1, e na presença de anticorpos específicos para IL-1 a transcrição de KGF foi bloqueada.

WEARING & SHERRATT (2000) registraram que o efeito da suplementação de KGF no remodelamento do tecido sobre a mitose das células na epiderme é subótima para a velocidade de reepitelização. A principal conclusão é que o grande aumento da regulação de KGF, observado experimentalmente no leito da ferida, aumenta o alcance de sinalização do fator de crescimento, porém reduz a taxa de regeneração epidérmica.

KELLER *et al.* (2004) descreveram o mecanismo de ação do KGF. O KGF é produzido por fibroblastos e ativa o receptor FGFR2-IIIb em queratinócitos, que leva à migração, proliferação e sobrevivência dos queratinócitos. O KGF, juntamente com o FGF-10, induz a expressão do Nrf-2, um fator de transcrição em queratinócitos com ação antioxidante que neutraliza espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são amplamente produzidas por macrófagos e neutrófilos na pele ferida, como uma defesa contra bactérias invasoras. Portanto, a eficiência da neutralização das ROS pelo Nrf-2 torna-se necessária para a proteção de células durante a cicatrização de feridas.

KOPP *et al.* (2004) avaliaram a ação do KGF em queimadura de segundo grau em porcos analisando três diferentes grupos, sendo um grupo controle, um grupo com enxerto de cultura de queratinócitos de linhagem HaCat e um último grupo com enxerto de cultura de queratinócitos de linhagem HaCat contendo KGF, este último atuando como um sistema de liberação de KGF. O resultado mostra que no grupo controle, um epitélio fino foi formado após 10 dias. No segundo grupo sem KGF houve completa epitelização após 7 dias e no grupo tratado com KGF a epitelização aconteceu em 5 dias, comprovando a ação do KGF no processo de epitelização.

WERNER, KRIEG, SMOLA (2007) relataram dupla sinalização parácrina na relação derme-epiderme, na qual os queratinócitos da epiderme estimulam os fibroblastos dérmicos a produzirem fatores de crescimento e citocinas, como IL-1, IL-6 e PDGF, e estes, por sua vez, estimulam a proliferação de queratinócitos. O TNF-alfa é expresso por queratinócitos e promove efeito autócrino.

KORIA & ANDREADIS (2007) isolaram queratinócitos humanos primários de prepúcio pré-natal e cultivaram em fibroblastos humanos em 24 placas. As monocamadas de queratinócitos foram lesadas e o KGF foi adicionado em diferentes concentrações (0, 10, 20, 50, e 100 ng/mL). Após 72 horas do ferimento, o KGF promoveu fechamento de 80% desse modelo de ferida, enquanto que na monocamada

controle (não-tratada) apresentou apenas 40% de fechamento. A taxa de cicatrização mostrou-se diretamente proporcional à concentração de KGF.

NIU *et al.* (2007) demonstraram pela primeira vez que o KGF é indutor de NF-kappaB, este que por sua vez é essencial na regulação da expressão gênica de KGF. O KGF atua de modo parácrino, é específico do epitélio e tem origem mesenquimal. Desempenha um papel essencial no crescimento das células do epitélio, agindo através do receptor de KGF (FGFR2-IIIb), que é expresso predominantemente por células epiteliais, e não por fibroblastos, o que sugere que poderia funcionar como um mediador parácrino de interações mesenquimais-epiteliais. Até então, pouco se sabia sobre a via de sinalização que regula a resposta de células epiteliais.

SOBRAL *et al.* (2007) avaliaram o efeito do KGF em diversas concentrações, produzido pela própria célula modificada geneticamente ou por suplementação em meio de cultura de queratinócitos na presença de *Pseudomona aeruginosa* em modelo experimental *in vitro* de queimadura composto de substrato dérmico e queratinócitos cultivados. A *Pseudomona aeruginosa* é uma bactéria comumente presente em infecções de pacientes que sofreram queimadura, o que desencadeia a síntese de peptídeos específicos e reação imunológica. Concluíram que a presença de KGF na cultura de queratinócitos inibiu o crescimento bacteriano, sendo dose-dependente, embora o KGF sozinho não tenha apresentado ação antimicrobiana, e notaram a já conhecida atividade mitogênica do KGF, sugerindo que o queratinócito aumenta a produção de defensina que é a responsável por essa defesa.

GEMATATI *et al.* (2009) compararam a expressão de genes supostamente envolvidos na cicatrização de feridas, como PDGF e KGF. Analisaram dois grupos, lesão cicatrizada *versus* lesão não-cicatrizada, e analisaram a expressão desses dois genes. Ao final, verificou que não houve qualquer diminuição significativa na expressão do PDGF e do KGF em lesões que não haviam cicatrizado.

GRAGNANI *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do estresse oxidativo e da suplementação do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) em queratinócitos humanos cultivados. O estresse oxidativo foi produzido através da adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao meio de cultura. Os queratinócitos humanos cultivados foram divididos em quatro grupos: grupo controle (GC), grupo KGF (GKGF), grupo H₂O₂

(GH₂O₂), grupo H₂O₂ e KGF (GH₂O₂-KGF). A suplementação do KGF ao meio de cultura de queratinócitos determinou menor viabilidade celular se comparado ao grupo controle. Porém, na presença de H₂O₂, o KGF determinou a proteção aos queratinócitos humanos primários cultivados expostos ao estresse oxidativo.

GRAGNANI *et al.* (2013) analisaram a expressão gênica de KGF, TNF-alfa e IL-1beta, em cultura de fibroblastos e queratinócitos de pacientes com grandes e pequenas queimaduras comparados com o grupo controle. Utilizando qPCR *Array*, concluíram que há um padrão quantitativo na expressão do gene KGF e IL-1, mais expresso de acordo com o tamanho da queimadura. Notaram também que o TNF-alfa não foi expresso, sugerindo que durante o processo de inflamação aguda outras células devem expressar esse gene.

GREAVES *et al.*, (2013) ilustraram a interação dinâmica entre fatores de crescimento, citocinas e diferentes tipos celulares durante o processo de cicatrização (Figura 1), que envolve angiogênese, contração da ferida e reepitelização. Os autores ilustraram o FGF-7, ou KGF, sendo produzido pelos fibroblastos e sua íntima relação com queratinócitos, além da interação da Interleucina-1 (IL-1) e fator transformante beta-1 (TGFb-1) no processo de cicatrização. E todo esse evento depende indiretamente da ação de outras citocinas e fatores de crescimento atuando em outros tipos celulares (GREAVES *et al.*, 2013).

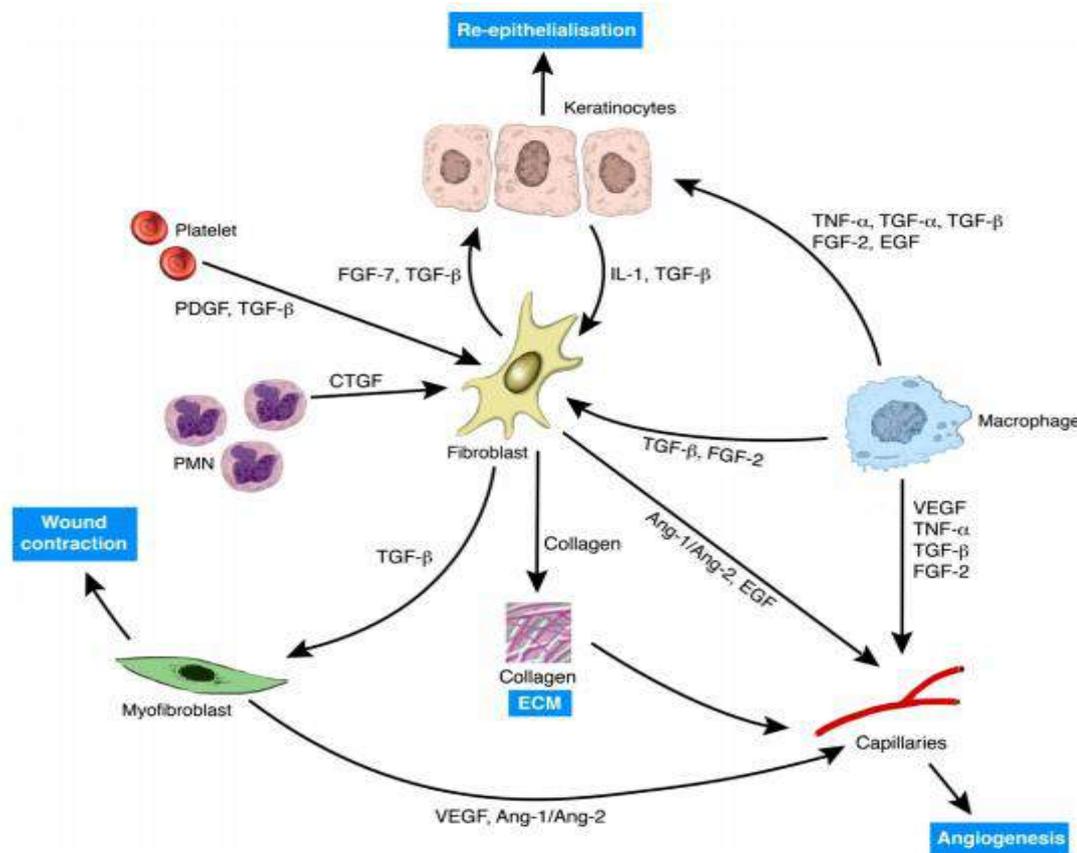


FIGURA 1: Interação dinâmica entre fatores de crescimento, citocinas e diferentes tipos celulares no processo de cicatrização (GREAVES *et al.*, 2013).

GRAGNANI *et al.* (2014b) analisaram o perfil da expressão gênica de citocinas e receptores de inflamação em cultura de queratinócitos de pacientes com queimadura. Analisando grupos de grandes queimados (25 a 50% SCQ), pequenos queimados (menor que 5% SCQ) e grupo controle, concluíram que há importantes diferenças entre as pequenas e grandes queimaduras no que se refere ao perfil de citocinas. Quimiocinas da família CXC foram mais expressas no grupo grande queimadura, exceto CXCL12. A família XC, CC e CX3C quimiocina foram reprimidas, especialmente no grupo pequeno queimadura. As interleucinas IL-8 e IL-1B foram mais expressas em grande queimadura do que em pequena queimadura, exceto IL13RA1, IL13 e IL5RA que foram reprimidas, principalmente na pequena queimadura.

NORONHA *et al.* (2014b) avaliaram os níveis de KGF e de beta-defensina-4 produzidos em cultura de fibroblastos e queratinócitos provenientes de pele de pacientes

com queimadura, sendo quatro pacientes com grandes queimaduras, quatro com queimaduras menores e dois pacientes hígidos. As beta-defensinas são peptídeos antimicrobianos envolvidos com a imunidade inata e aumentam a resistência do organismo contra a infecção microbiana, sendo esta uma causa de mortalidade entre os pacientes com queimadura. O KGF está envolvido com a reepitelização cutânea. Neste estudo, demonstraram que há maior expressão de KGF em cultura de fibroblastos e de queratinócitos de pacientes com grande queimadura se comparado a queimaduras menores. E a expressão de beta-defensina-4 mostrou-se aumentada em fibroblastos e diminuída em queratinócitos, independente da gravidade da queimadura.

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

STEINSTRAESSER *et al.* (2002) examinaram a expressão do gene CD14 na pele humana após queimadura. No estudo foram incluídos 57 pacientes com queimadura de profundidade parcial. Avaliação por qPCR *Array* foi aplicada para identificar a presença de CD14 no mRNA. Através de imunohistoquímica identificaram a expressão de CD14 na pele normal e na pele queimada. A análise quantitativa de qPCR *Array* mostrou aumento significativo da expressão de CD14 imediatamente após a queimadura.

KORIA *et al.* (2003) verificaram alterações na expressão gênica em pele artificial lesionada com acetona por meio de *microarray* ou microarranjos de DNA. Determinados fatores de transcrição mitogênicos, como EGR-1 e ETR101, foram induzidos após a exposição à acetona. Da mesma forma que a acetona, os raios ultravioletas e queimadura suprimem a atividade metabólica celular e, inclusive relacionada ao metabolismo lipídico, que possivelmente preservam a energia para outras funções relacionadas com a sobrevivência.

DASU *et al.* (2004) identificaram mudanças nos padrões de expressão gênica das células musculares esqueléticas da perna durante 24 meses após uma lesão por queimadura grave. Estudaram 6 crianças de idade entre 3 e 18 anos com queimadura acometendo mais de 40% da SCQ. Após alta hospitalar, foram feitas biópsias do músculo vasto lateral no 45º dia, 6º mês, 12º mês, 18º mês e 24º mês. O RNA total foi isolado *in vitro*, transcrito e hibridizado. Comparado com crianças não queimadas, 38

genes estavam alterados no 45° dia, dos quais 10 permaneceram alterados até o 6° mês, 4 até 12° mês e 2 genes até o 18° mês. Não houve diferença no padrão de expressão gênica no 24° mês.

GRECO *et al.* (2010) forneceram um retrato abrangente da expressão dos genes envolvidos no processo de reparação cutânea durante os primeiros 17 dias após a lesão por queimadura. Compararam a expressão gênica diferencial entre pele parcialmente lesada por queimadura de 45 pacientes com pele de 15 pacientes provenientes de cirurgia estética. Foram utilizadas 54.000 sondas representativas de 38.000 genes humanos, os resultados mostraram 2.286 genes diferencialmente expressos em espessura parcial de pele de pacientes com queimadura.

ZHOU *et al.* (2010) desenvolveram um método de avaliar perfis de expressão gênica utilizando informações que correlacionam resposta gênica e intervalo de tempo em que ela ocorreu. O método detecta com eficácia a resposta gene-específica e permite relacioná-la aos fatores experimentais testados. Seu método atua de modo complementar ao modelo clássico ANOVA, uma vez que estima, simultaneamente, os efeitos da resposta gênica e o tempo no qual elas apareceram. Propondo assim a metodologia ANOVA relacionada ao tempo (TANOVA).

CLERICUZIO *et al.* (2014) avaliaram a ação cicatrizante da substância ativa do vegetal *Ophioglossum*, cujo extrato é tradicionalmente utilizado em pomadas para a cicatrização de feridas e queimaduras. Eles isolaram a substância ativa desse vegetal, galactosil-diacilglicerol e galactopiranosil-glicerol, e avaliaram suas propriedades cicatrizantes em cultura de queratinócitos. Modelos de ferida, feito por meio de monocamada de queratinócitos, mostraram aumento da taxa de cicatrização quando expostos a doses subtóxicas da substância ativa do *Ophioglossum*. O maior efeito cicatrizante foi com uma dose de 5µg/mL, que se aproximou do efeito de um lisado de plaquetas utilizado em tratamentos clínicos. Inibidores das principais vias de sinalização celular envolvidas no reparo de feridas revelam funções importantes do cálcio intracelular e da ERK1/2, MAP-quinase ou MAPK-1. Por outro lado, a avaliação por RT-qPCR de 84 genes marcadores da cicatrização mostrou uma ausência quase total de modulação gênica. Diante dos dados, a substância ativa do *Ophioglossum* mostra-se cálcio-dependente para o reparo tecidual, com ativação de ERK1/2, não envolvendo

mecanismos genômicos. Sendo assim, os autores propuseram esta nova droga para o reparo tecidual e medicina regenerativa.

PARK *et al.* (2015) avaliaram 84 genes marcadores da cicatrização de feridas em fibroblastos dérmicos humanos em resposta à estimulação elétrica (ES) por meio de RT-qPCR. Fibroblastos dérmicos humanos primários foram cultivados em uma mistura de polímeros, poliácido L-láctico ou PLLA, e polipirrol heparina-ativado ou PPY heparina-ativado, e expostos a estimulação elétrica de 50 ou 200 mV/mm durante seis horas. Um total de 57 genes mostraram-se diferencialmente expressos, sendo 49 hiperregulados e 8 hiporregulados. Os genes diferencialmente expressos estão envolvidos com adesão celular, remodelação, atividades do citoesqueleto, metabolismo da matriz extracelular, produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas e fatores de crescimento, bem como transdução de sinal. Este estudo demonstrou que a estimulação elétrica modula a expressão de uma variedade de genes envolvidos no processo de cicatrização da ferida, o que confirma que a estimulação elétrica é uma ferramenta útil na medicina regenerativa.

4. MÉTODOS

Desenho da Pesquisa

O presente estudo possui um desenho de pesquisa experimental *in vitro*, intervencional, analítico, controlado e realizada em centro único.

Amostras

Participaram do presente estudo 4 pacientes com grande queimadura e 4 pacientes hígidos sem queimadura doadores de queratinócitos. Os grupos de estudo foram divididos em Grupo Queimadura + (GQ+) – cultura de queratinócitos de pacientes com grande queimadura suplementada com KGF; Grupo Queimadura - (GQ-) – cultura de queratinócitos de pacientes com grande queimadura sem KGF; Grupo Controle + (GC+) – cultura de queratinócitos de pacientes hígidos suplementada com KGF; Grupo Controle - (GC-) – cultura de queratinócitos de pacientes hígidos sem KGF.

Os pacientes com grande queimadura estavam internados na Unidade de Tratamento de Queimadura (UTQ) da Disciplina de Cirurgia Plástica (DCP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e apresentavam entre 25 a 50% da Superfície Corporal Queimada (SCQ) ou necessitavam de 10% de enxertia. As pacientes hígidas foram aquelas submetidas às cirurgias estéticas, como mamoplastia ou abdominoplastia na DCP-UNIFESP. Todos os pacientes incluídos preencheram os critérios de inclusão descritos posteriormente.

Local do estudo

A fase de coleta de fragmentos de pele dos pacientes queimados foi realizada na UTQ-DCP-UNIFESP que está localizada no Hospital Universitário (HU) – Hospital São Paulo (HSP). A fase experimental foi realizada no Laboratório de Cirurgia Translacional (LCT) da DCP que está localizado no Edifício Acadêmico Prof. Dr. Horácio Kneese de Mello (Edifício de Pesquisa I), na Rua Pedro de Toledo, 781, 4º andar (fundos) – Vila Clementino – São Paulo-SP.

Aspectos éticos

A fim de contemplar os aspectos éticos, o projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, sendo aprovado em 08/02/2013 sob parecer número 197.342 (Anexo 1).

Os pacientes foram incluídos neste estudo após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices 1 e 2).

Crítérios de Inclusão

Foram convidados os pacientes de ambos os gêneros (masculino e feminino), com idade acima de 18 anos que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE, internados na UTQ-DCP-UNIFESP/HU-HSP com necessidade de procedimento(s) operatório(s). Para o Grupo Queimadura (GQ), os critérios foram a presença de lesão por queimadura de 2º grau profundo ou de 3º grau acometendo entre 25% e 50% SCQ ou pacientes que necessitavam de enxertia de pele parcial em 10% de SCQ. Para o Grupo Controle (GC), foram convidados pacientes com necessidade de procedimento operatório, que seriam submetidos à cirurgia estética, abdominoplastia ou mamoplastia, não fumantes, sem doenças prévias de pele ou doenças clínicas que interferissem no processo de cicatrização.

Crítérios de Não Inclusão

Não foram incluídos pacientes que não concordaram em participar da pesquisa, que apresentavam alguma doença prévia de pele, lesão superficial (Psoríase e similares), processo infeccioso ou doença clínica que interferia diretamente com o processo de cicatrização de feridas (Colagenoses, como lúpus eritematoso, esclerodermia, dermatopolimiosite, doença mista do tecido conjuntivo).

Crítérios de Exclusão

Contaminação das garrafas de cultura, baixa taxa de proliferação celular (menor que 80% de confluência), quantidade insuficiente de RNA extraído que impedisse a avaliação dos dados do paciente e perda do material extraído. Qualquer perda haveria reposição.

Instrumentos de Pesquisa

Procedimento operatório padrão e coleta de pele

A coleta da pele foi realizada pelo cirurgião plástico durante o procedimento operatório padrão tanto na cirurgia estética, na qual normalmente há descarte de pele, sendo esta utilizada para o estudo (grupo controle), quanto na cirurgia de desbridamento ou excisão cirúrgica para o tratamento da queimadura. Durante esse desbridamento

cirúrgico, a pele vitalizada adjacente à pele necrosada acaba sendo retirada parcialmente devido ao próprio procedimento operatório, pois os limites da queimadura são irregulares e o instrumento utilizado para a excisão, a faca de Blair, é retilíneo e não preciso, sendo estes, então, os fragmentos de pele vitalizada utilizados para o estudo (grupo queimadura). Para os pacientes com queimadura de 2° grau profundo ou de 3° grau que não apresentam maiores complicações, o desbridamento do tecido desvitalizado é realizado após três dias da queimadura.

Os fragmentos de pele foram imediatamente imersos em um tubo Falcon de 50mL contendo 30mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (alta taxa de glicose [4,5 g/L], L-glutamina [584 mg/L] e piruvato de sódio [110 mg/L]) (Gibco, Grand Island, EUA), suplementado com penicilina/ streptomina (100UI/mL, 100µL) (Gibco, Grand Island, EUA). O transporte ao CT-DCP-UNIFESP foi realizado imediatamente após a coleta e acondicionado em geladeira sob temperatura de 4°C, sendo manipulado em até seis horas subsequentes.

Preparo do meio de cultura de queratinócitos

O meio de cultura de queratinócitos é constituído de uma mistura de 750mL DMEM com 250mL de meio Ham's F-12 (Gibco, Grand Island, EUA), totalizando 1L. Essa solução foi suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Hyclone, Logan, EUA) e 24mg de adenina (6-aminopurine hydrochloride) (Sigma, St. Louis, USA) diluída em 20mL da solução de DMEM/ Ham's F-12, resultando em uma concentração de $1,8 \times 10^{-4}$ mol/L. Adicionou-se ainda 1mL de toxina colérica (*Vibrio cholerae*, Type Inaba 569 B) 10^{-10} mol/L (Gibco, Grand Island, EUA), 2 mL de penicilina/ streptomina (100UI/mL, 100µL), 2mL de de hidrocortisona 0,4ug/mL (Sigma, St. Louis, USA), 1mL de transferrina/triiodo-L-thionine 2×10^{-9} mol/L (Sigma, St. Louis, USA) e 1,3 mL de insulina (porcina) 5 µg/mL (Sigma, St. Louis, USA) obtendo concentração final 5 µg/mL do meio de queratinócito. O pH final foi ajustado para 7,2 com solução de bicarbonato de sódio 100 mg/mL (Sigma, St. Louis, USA) ou com ácido clorídrico 1M (Sigma, St. Louis, USA), conforme necessidade, esterilizado com um filtro 0,22 µm e mantido sob refrigeração a 4°C. O meio apresenta coloração avermelhada e a mudança de cor define mudança de pH.

Isolamento da epiderme e cultura de Queratinócitos

A cultura de queratinócitos humanos primários foi realizada no LCT-DCP-UNIFESP, seguindo o protocolo definido por GREEN, KEHINDE, THOMAS (1979) e GREEN (1991).

A limpeza do tecido foi realizada mergulhando o fragmento de pele em 8 tubos consecutivos, contendo 30 mL de tampão fosfato-salino modificado (Dulbecco's PBS, sem cloridrato de cálcio e magnésio) 275 mOs/Kg (Sigma, St. Louis, USA), agitando vigorosamente cada tubo por 45 segundos para remover sangue e outras impurezas existentes.

Para o isolamento da epiderme, foi necessário segmentar a pele em fragmentos menores, 0,5cm x 0,5cm. Os fragmentos foram acondicionados em um tubo Falcon contendo 20 mL de dispase 0,6 – 2,4 U/mL (Gibco, Grand Island, EUA) dissolvida em DMEM (HIRSCH *et al.*, 2006), permanecendo por 15 horas para dissociar a epiderme da derme.

A cultura de queratinócitos de cada paciente foi realizada sobre uma cultura prévia de fibroblastos de ratos da linhagem 3T3-J2 (ATCC, Nova Iorque, EUA). A cultura de 3T3-J2 com 1×10^6 foi preparada um dia antes em meio DMEM com FBS 10% em garrafa de cultura de 75cm² e mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂) até confluência 50%. Na manhã do isolamento, o meio de fibroblastos foi retirado da garrafa de cultura e adicionou-se mitomicina 0.5 mg/mL (Sigma, St. Louis, USA), para cessar a proliferação do 3T3-J2, mas mantendo as células vivas e funcionais, e servir de camada sustentadora para a cultura de queratinócitos, produzindo fatores de crescimento vitais para a proliferação de queratinócitos. Retirou-se a mitomicina após duas horas, lavando a garrafa de cultura por duas vezes com PBS. O meio de cultura de queratinócitos foi adicionado à garrafa de cultura contendo 3T3-J2.

Após 15 horas, os fragmentos que estavam em dispase foram pinçados e lavados uma única vez com PBS e, em seguida, colocados em placa de Petri (100cm²) para a separação mecânica entre a epiderme e derme, em que foram utilizadas duas pinças para a tração em sentidos opostos. A epiderme apresenta uma coloração mais acinzentada, enquanto que a derme apresenta uma coloração rósea.

Para a obtenção dos queratinócitos, a epiderme foi acondicionada em um tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de solução de tripsina/EDTA 0,1%/0,04% (Gibco, Grand Island, EUA) que foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 10 minutos. Em seguida, os fragmentos maiores foram retirados e colocados em um segundo tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de solução de tripsina a 0,25%, sendo incubado novamente nas mesmas condições.

Enquanto o segundo tubo estava sendo incubado, foi adicionado ao primeiro tubo, contendo células soltas em solução PBS e tripsina, o meio de queratinócito para neutralizar a ação da tripsina. Em seguida foi centrifugado a 800 rpm por cinco minutos para a obtenção do botão de queratinócitos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o botão em meio de queratinócito. Em seguida, essa suspensão de células foi semeada na garrafa de cultura previamente preparada com 3T3-J2 e incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 10 minutos. Após a incubação do segundo tubo Falcon, este também foi centrifugado a 800 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão de células foi ressuspenso em meio de queratinócito sem EGF, adicionando esta solução contendo queratinócitos à mesma garrafa de 3T3-J2.

Após 24 horas, os queratinócitos aderiram à garrafa e o meio de cultura foi trocado para meio de queratinócito com fator de crescimento epidermal (EGF) 1 nL/mL (Sigma, St. Louis, USA) para estimular a proliferação e migração dos queratinócitos na garrafa.

Durante o cultivo, as garrafas foram acondicionadas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 48 horas, utilizando 10 mL de meio de cultura de queratinócitos com EGF em cada garrafa de cultura de 75 cm². Quando a confluência atingiu 80%, foi realizada a passagem dos queratinócitos para novas garrafas. Na terceira passagem, as células foram utilizadas nos experimentos.

Suplementação com KGF

Nos grupos de estudo que receberam suplementação de KGF, foi adicionado KGF 20 ng/mL (Sigma, St. Louis, USA) em 15 mL do próprio meio de cultura para queratinócitos durante a terceira passagem, baseado em estudos anteriores da linha de

pesquisa do LCT-UNIFESP (SOBRAL *et al.*, 2007). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso, o pH foi mantido próximo a 7,4 e o meio de cultura de queratinócitos suplementado com KGF foi mantido por 48 horas para prosseguir com os procedimentos subsequentes, sendo retirado após esse período e a análise começou a partir desse momento. Essa suplementação foi realizada no meio de queratinócitos sem a presença de EGF, que está presente no protocolo em todas as trocas de meio, exceto na primeira. Mas, para haver somente a sinalização do KGF por 48 horas, o EGF foi retirado.

Extração, purificação e quantificação de RNA total

O RNA total foi extraído dos queratinócitos utilizando o reagente Trizol[®] (Invitrogen, Foster City, EUA) e purificado utilizando o kit de membrana de sílica ArrayGrade[®] Total RNA Isolation (*SABioscience Corporation*), que filtra e retém o RNA durante a centrifugação, permitindo maior rendimento e pureza. O tampão utilizado estabiliza o RNA e previne sua degradação, ajudando a reter o RNA na coluna de centrifugação.

Após dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, a separação de fase foi obtida com clorofórmio (Sigma, St. Louis, USA) e centrifugação, a 10.000 rpm por cinco minutos. O RNA precipitado a partir da fase aquosa da solução foi lavado com etanol a 75%, seco e dissolvido em água livre de RNase. O RNA total foi, em seguida, purificado com RNeasy MiniKit (Qiagen, Valencia, EUA) e submetidos a tratamento com DNase.

A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria NanoVue Plus GE (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA) (Figura 2).



FIGURA 2. Quantificação de RNA total por meio de Nanovue® (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA).

Conversão do RNA em cDNA e qPCR Array

A qPCR Array é realizada em um termociclador com sistema óptico para a excitação da fluorescência e detecção da emissão de fótons, que fica acoplado a um computador com um programa (*software*) para aquisição de dados e análise final da reação. Utiliza como molde inicial a molécula de RNA e, por transcrição reversa, gera a molécula complementar de DNA, a cDNA, a partir de nucleotídeos de DNA trifosfatados, *primers*, sequências iniciais para a polimerização de DNA, e DNA polimerase, promovendo ampliações gênicas cíclicas, ou seja, cópias de cDNA. Os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado, resultando em um gráfico sigmoide (BUSTIN *et al.*, 2009; SANDERS *et al.*, 2014).

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge os limiares máximo e mínimo da fase exponencial é denominado *quantification cycle* (Cq), também encontrado na literatura como *cycle threshold* (C_T), *take-off point* (TOP) ou *crossing point* (Cp), e permite a quantificação exata e reprodutível dos ciclos. A expressão relativa da qPCR Array liga valores relevantes Cq, ou suas médias, através de uma equação matemática que gera a taxa de expressão relativa e fornece o *fold change*, ou mudança de razão, entre a amostra e o controle.

Genes endógenos de referência são utilizados como *housekeeping*, ou controle interno, para permitir a identificação de variações dos resultados obtidos e o *fold change*, ou mudança de razão, dos genes diferencialmente expressos, podem apresentar-se hiporregulados (*fold change* > 2), hiperregulados (*fold change* < 2) ou sem diferença

significativa ($-2 < \textit{fold change} < 2$) (BUSTIN *et al.*, 2009; PAGE & STROMBERG, 2011; SANDERS *et al.*, 2014).

No presente estudo, foi utilizado 1µg de RNA total de cada amostra por placa de qPCR *Array* para a síntese de cDNA, o kit *RT2 First Strand* (SABioscience Corporation) para as reações de transcrição reversa e completa eliminação do DNA genômico e o kit *RT2 Profiler® PCRarray* (SABioscience Corporation) (<http://www.sabiosciences.com/howpcrarrayworks.php>), que contém uma placa com 84 genes marcadores da cicatrização (PAHS-121ZC), para a análise da qPCR *Array*.

Foi feito um *pool*, ou uma única solução, com cDNA dos 4 pacientes de cada grupo, experimental e controle com e sem tratamento, ou de suas respectivas garrafas de cultura de queratinócitos GQ-, GQ+, GC-, GC+, e cada *pool* foi distribuído nas placas de qPCR *Array* para a análise em triplicata, dos 84 genes marcadores da cicatrização (PAHS-121ZC) (Quadro 1), utilizando-se no total 12 placas.

Nestas placas, existem poços para cada um dos 84 genes marcadores da inflamação, além de poços referentes a genes *housekeeping* ou controle interno, totalizando 96 poços. No Quadro 1, estão apresentados os 84 genes marcadores da cicatrização, separados em quatro categorias.

QUADRO 1. *Human Wound Healing PCR Array* (Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores da cicatrização.

RT² Profiler™ PCR Array Human Wound Healing (Qiagen, Valencia, EUA) (nº no catálogo: PAHS-121Z)
<p>1.EXTRACELLULAR MATRIX & CELL ADHESION:</p> <p>ECM Components: COL14A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A3, COL5A1, COL5A2, COL5A3, VTN</p> <p>Remodeling Enzymes: CTSG, CTSK, CTSL2, F13A1, F3 (Tissue Factor), FGA (Fibrinogen), MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, PLAT (tPA), PLAU (uPA), PLAUR (uPAR), PLG, SERPINE1 (PAI-1), TIMP1</p> <p>Cellular Adhesion: CDH1 (E-cadherin), ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6</p> <p>Cytoskeleton: ACTA2 (α-SMA), ACTC1, RAC1, RHOA, TAGLN</p> <p>2.INFLAMMATORY CYTOKINES & CHEMOKINES: CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CD40LG (TNFSF5), CXCL1, CXCL11 (ITAC/IP-9), CXCL2, CXCL5 (ENA-78/LIX), IFNG, IL10, IL1B, IL2, IL4, IL6</p> <p>3.GROWTH FACTORS: ANGPT1, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTGF, EGF, FGF10, FGF2, FGF7, HBEGF (DTR), HGF, IGF1, MIF, PDGFA, TGFA, TGFB1, TNF, VEGFA</p> <p>4.SIGNAL TRANSDUCTION: TGFβ: TGFB1, TGFB3, STAT3 WNT: CTNNB1, WISP1, WNT5A</p> <p>Phosphorylation: MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), PTEN</p> <p>Receptors: EGFR, IL6ST (GP130)</p> <p>Other: PTGS2</p>

A amplificação, aquisição e análise dos dados foram realizadas pelo termociclador em tempo real ou qPCR *Array* (ABI Prism 7500 Sequence Detection System, da Applied Biosystems, Foster City, EUA). As condições dos ciclos térmicos, ou amplificação, foram os seguintes: 30 segundos a 48°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos, desnaturação a 95°C e 60 segundos de anelamento a 60°C. Foram realizadas reações em triplicata para cada grupo para assegurar a significância estatística.

Em cada curva, cada gene foi checado para eficiência, limiar máximo e mínimo e curva padrão. Para garantir comparações entre curvas, o mesmo limiar foi estabelecido para todos os genes e corridas. Três genes foram usados como controle interno, actina-beta (ACTB), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1), e a média do valor Cq foi usada para padronizar a expressão gênica ($2^{\Delta Cq}$) e determinar a diferença entre os grupos.

Os resultados podem ser mostrados de diversas apresentações. Numa delas, no *Heat Map*, ou mapa de calor, apresenta por meio de coloração quais os genes diferencialmente expressos, sendo que a cor verde representa os genes hiporregulados, a cor vermelha representa os genes hiperregulados, a cor próxima ao preto mostra os genes sem expressão gênica significativa e a cor cinza representa os genes não expressos. Esse mapa de calor traz informações gerais, e não apenas os genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes.

O *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, apresenta o valor do *fold change*, ou mudança de razão, da expressão gênica relativa do grupo analisado em relação ao grupo referencial. A linha central representa a expressão gênica do grupo de referência ou controle, enquanto que os pontos revelam valores do *fold change*, ou mudança de razão, do grupo em análise. As outras linhas, acima e abaixo da linha central, delimitam *fold change*, ou mudança de razão, igual a dois, sendo que pontos que ultrapassam a linha superior, que aparecem em verde, representam genes hiperregulados e pontos que ultrapassam a linha inferior, que aparecem em vermelho, revelam genes hiporregulados. Os pontos que aparecem dentro das linhas, com *fold change*, ou mudança de razão, entre 2 e -2, aparecem em colorações próximas ao preto e representam genes sem diferença na expressão gênica relativa.

Análise Estatística

Para a obtenção dos dados estatísticos paramétricos e não paramétricos, foi utilizado o programa *RT2 Profiler PCR Array DATA Analysis online (SABiosciences Corporation)*, disponível em: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>.

Para a análise dos resultados do qPCR *Array*, considerou-se o parâmetro *fold change* ou mudança de razão > 2 , hiperregulado, ou < -2 , hiporregulado, na expressão relativa de um grupo de interesse *versus* um grupo referencial ou controle. Os parâmetros dos resultados obtidos no equipamento como *comments*, ou comentários, que podem ser “OK” ou “A”, significam confiabilidade no *fold change* ou mudança de razão. O *comment*, ou comentário, “B” indica ciclagem gênica muito elevada, maior que 30 vezes, o que significa que pode haver grandes variações nos resultados obtidos e baixa expressão gênica relativa. E o *comment*, ou comentário, “C” significa que a ciclagem não foi determinada ou interpretada, podendo gerar um resultado errôneo.

Para a análise de variância (ANOVA), considerou-se o valor-p $< 0,05$ estatisticamente significativo. A ANOVA é uma técnica estatística que compara simultaneamente médias de diferentes populações para verificar se existem diferenças amostrais reais ou casuais, ou seja, diferenças estatisticamente significantes entre essas médias. Os resultados de regulação ou expressão diferenciada somente são mostrados se tem valor-p $< 0,05$.

5. RESULTADOS

Participaram deste estudo oito pacientes, sendo quatro do grupo controle e quatro com grande queimadura (Tabela 1).

TABELA 1. Dados com a média de idade e gênero dos pacientes incluídos no estudo e que compõe o banco de RNA e de fragmentos de queimadura para expressão proteica.

Grupos/Dados	n	Média de Idade	Gênero
Grupo Controle	4	42,5 anos	4 F
Grupo Queimadura	4	36 anos	1M 3F

n=número; F=feminino; M=masculino

Foram analisadas a expressão gênica de 4 grupos, sendo eles Grupo Queimados com KGF (GQ+), Grupo Queimados sem KGF (GQ-), Grupo Controle com KGF (GC+) e Grupo Controle sem KGF (GC-) e posteriormente foram realizadas comparações entre os grupos (Tabela 2). Para cada grupo, foi feito um *pool* com o cDNA de todos os pacientes para garantir variabilidade amostral nas análises.

TABELA 2. Número de genes diferencialmente expressos da expressão gênica relativa dos grupos queimadura e controle, na presença ou ausência de KGF, sendo que em cada comparação o segundo grupo é sempre o grupo de referência.

Comparação	Genes Hiporregulados	Genes Hiperregulados	Total
1.)GC+ <i>versus</i> GC-	1	1	2
2.)GQ- <i>versus</i> GC-	5	0	5
3.)GQ+ <i>versus</i> GC-	5	0	5
4.)GQ+ <i>versus</i> GQ-	0	0	0
5.)GQ+ <i>versus</i> GC+	26	7	33
6.)GQ- <i>versus</i> GC+	25	11	36

GQ+=grupo queimadura com KGF; GQ-=grupo queimadura sem KGF; GC+=grupo controle com KGF; GC-=grupo controle sem KGF

Na Tabela 3 abaixo, encontram-se os genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes (*fold change* ou mudança de razão > 2 ou < -2 , *comments* ou comentários “OK” ou “A” e valor-p $< 0,05$) com os respectivos valores do *fold change*, ou mudança de razão, das comparações 2, 3, 5 e 6, ou seja, que possuem o GQ como grupo experimental conforme demonstrado na Tabela 2. A comparação 4 não consta na Tabela 3, uma vez que não houveram genes significativamente expressos e a comparação 1 não consta por não ter como grupo experimental o GQ, objeto do estudo.

TABELA 3. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes das comparações efetuadas que possuem GQ como grupo experimental [verde=hipo regulados; vermelho=hiper regulados]; [X=versus].

Comparação/ Genes	2.)		3.)		5.)		6.)	
	GQ-	X GC-	GQ+	X GC-	GQ+	X GC+	GQ-	X GC+
ACTA2	-		-		-3,3848		-2,8422	
COL14A1	-		-		2,4468		2,9138	
COL1A2	-		-		-502,7706		-422,1858	
COL3A1	-32,0680		-38,1890		-61,5159		-51,6561	
COL5A1	-		-		-9,1196		-7,6579	
COL5A2	-		-		-9,5516		-8,0207	
COL5A3	-		-		-		2,2258	
CSF3	-22,1804		-26,4141		-		-	
CTGF	-		-		-15,9698		-13,4102	
CTNNB1	-		-		2,2589		-47,0349	
CTSK	-29,4683		-35,0931		-56,0127		-	
CXCL2	-		-		2,2493		2,6786	
EGFR	-		-		-3,0935		-2,5976	
FGF7	-		-		-11,8338		-9,9371	
FGF10	-		-		-		3,0041	
IFNG	-		-		2,5015		2,9790	
IL6	-		-		-5,5064		-4,6238	
IL6ST	-		-		-7,2338		-6,0744	
IL10	-		-		-		2,9054	
ITGA3	-		-		-		2,0584	
ITGA5	-		-		-4,2751		-3,5899	
ITGAV	-		-		-2,8123		-2,3616	
ITGB1	-23,6028		-28,1080		-31,6939		-26,6140	
ITGB5	-		-		-14,6218		-12,2782	
MAPK1	-		-		-2,0078		-2,6220	
MIF	-		-		-9,5175		-7,9921	
MMP1	-		-		-5,4201		-4,5514	
MMP2	-31,5399		-29,7173		-32,1600		-34,1323	
PDGFA	-		-		2,3331		2,7785	
PLAU	-		-		2,5314		3,0146	
PTEN	-		-		2,6233		2,4987	
RAC1	-		-		-7,5117		-6,3078	
RHOA	-		-		-13,1029		-11,0027	
SERPINE1	-		-		-2,3642		-2,7178	
TAGLN	-		-		-20,3098		-17,0545	
TGFB1	-		-		-3,7557		-3,1537	
TIMP1	-		-		-3,6779		-3,0884	
WISP1	-		-		-2,0470		-	
VEGFA	-		-		-		3,5844	

Todos os genes apresentados na Tabela 3 estão descritos no Apêndice 3. A Tabela 3 apresenta 31 genes em comum entre as comparações nº 5 e 6, sendo 6 hiperregulados e 25 hiporregulados. São 4 os genes hiporregulados (COL3A1, CTSK, ITGB1 e MMP2) em comum nas comparações nº 2, 3 e 5. O gene CSF3 está hiporregulado nas comparações nº 1, 2 e 3. E o gene COL1A2 está hiperregulado na comparação nº 1, porém intensamente hiporregulado nas comparações nº 5 e 6.

As expressões gênicas relativas de cada uma das comparações, conforme apresentados na Tabela 3, estão descritos abaixo individualmente.

COMPARAÇÃO 1: GC+ *VERSUS* GC-

Grupo Controle + KGF (GC+) em análise *versus* Grupo Controle (GC-) referência.

A Figura 3 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 1.

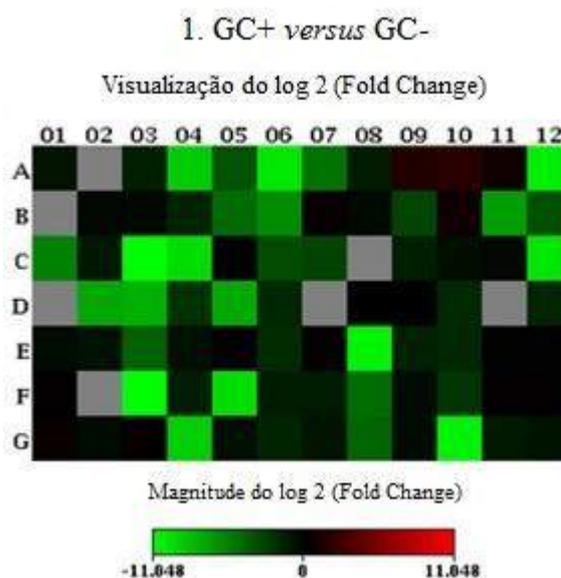


FIGURA 3. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa à comparação 1 entre GC+ *versus* GC-.

A cor verde no mapa representa genes hiporregulados (*fold change* ou mudança de razão menor que -2), a cor vermelha representa genes hiperregulados (*fold change* ou mudança de razão maior que 2), a cor preta representa genes sem diferença significativa na expressão gênica (*fold change* ou mudança de razão entre 2 e -2) e a cor cinza representa genes não expressos. Porém, não significa que são estatisticamente significantes.

A Figura 4 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 1.

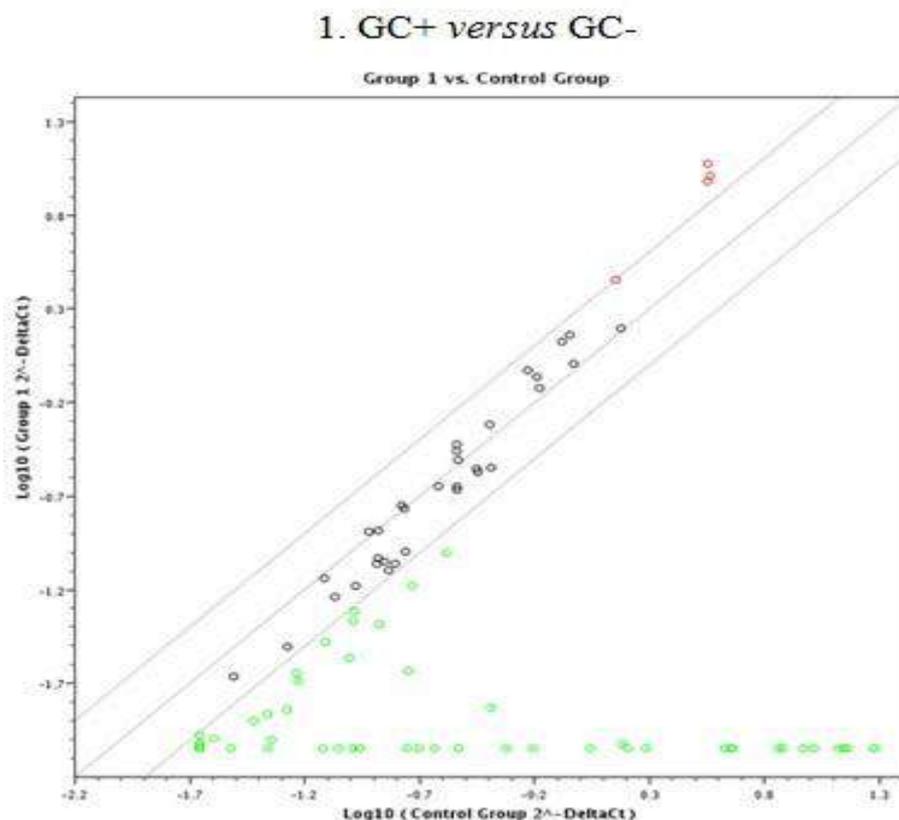


FIGURA 4. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa à comparação 1 entre GC+ versus GC-.

Os genes diferencialmente expressos com fold change ou mudança de razão > 2 ou < -2 , com *comments* ou comentários OK ou A e valor- $p < 0,05$ estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 1 entre o GC+ versus GC-. [Quando foi analisado diretamente a ação do KGF, única diferença entre os dois grupos analisados].

1. GC+ versus GC-	
Gene	Fold change (mudança de razão)
COL1A2	3,3338
CSF3	-69,0835

O resultado da comparação 1 (GC+ *versus* GC-) revela dois genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 2,4% dos genes, sendo um hiperregulado (50%) e um hiporregulados (50%).

COMPARAÇÃO 2: GQ- *VERSUS* GC-

Grupo Queimadura (GQ-) em análise *versus* Grupo Controle (GC-) referência.

A Figura 5 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 2.

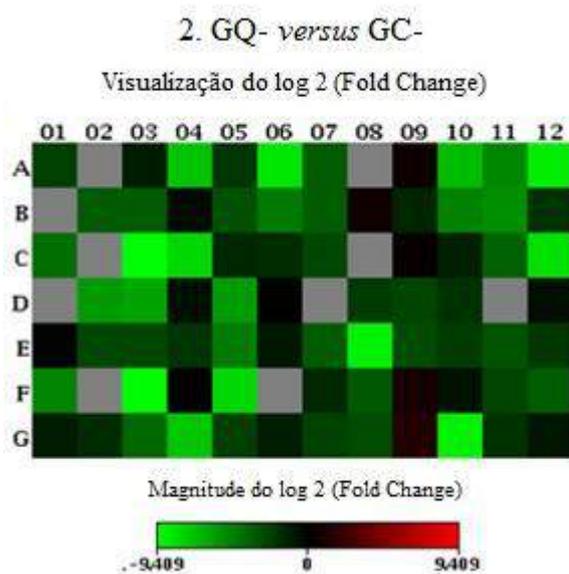


FIGURA 5. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa à comparação 2 entre GQ- *versus* GC-.

A Figura 6 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 2.

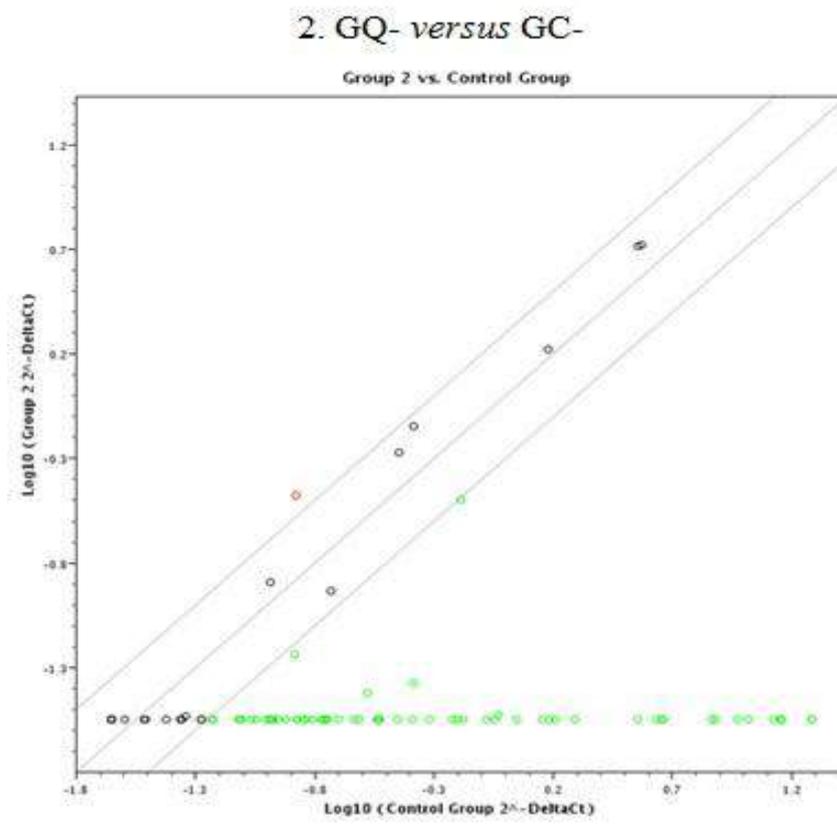


FIGURA 6. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa à comparação 2 entre GQ- versus GC-.

TABELA 5. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 2 entre o GQ- versus GC-. [Quando foi analisado diretamente a queimadura, única diferença entre os dois grupos analisados].

2. GQ- versus GC-	
Gene	Fold change (número de cópias)
CSF3	-22,1804
ITGB1	-23,6028
CTSK	-29,4683
MMP2	-31,5399
COL3A1	-32,0680

O resultado da comparação 2 (GQ- versus GC-) revela cinco genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 6% dos genes, sendo todos (100%) hiporregulados.

COMPARAÇÃO 3: GQ+ VERSUS GC-

Grupo Queimadura + KGF (GQ+) em análise *versus* Grupo Controle (GC-) referência

A Figura 7 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 3.

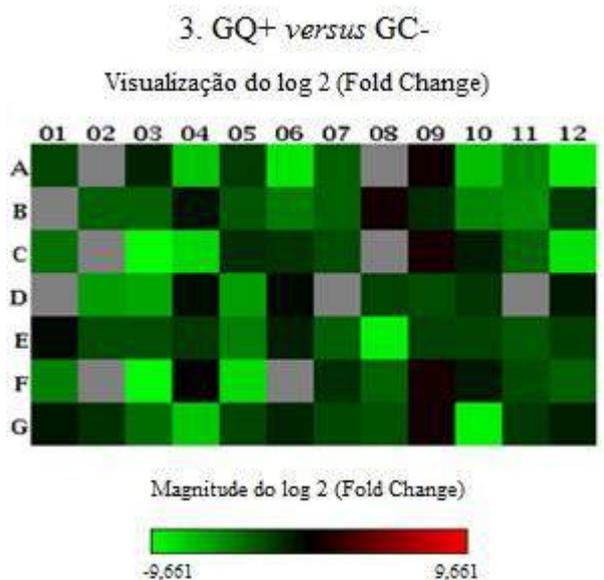


FIGURA 7. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ *versus* GC-.

A Figura 8 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 3.

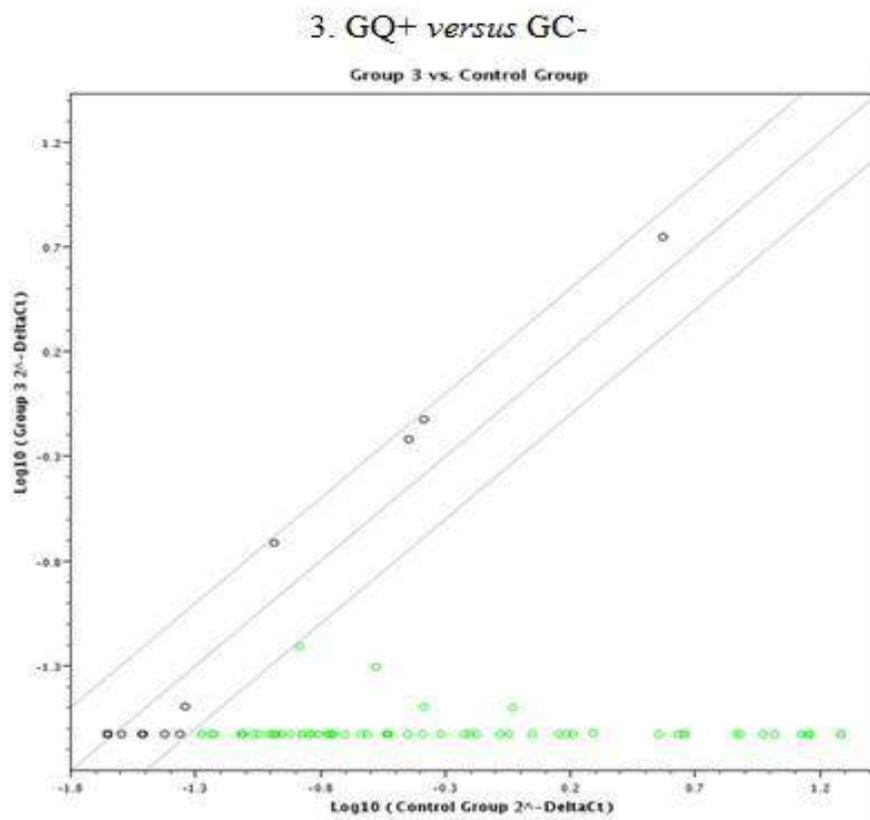


FIGURA 8. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.

TABELA 6. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 3 entre o GQ+ versus GC-. [Quando foram analisados a ação do KGF e a queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

3. GQ+ versus GC-	
Gene	Fold change (mudança de razão)
CSF3	-26,4141
ITGB1	-28,1080
MMP2	-29,7173
CTSK	-35,0931
COL3A1	-38,1890

O resultado da comparação 3 (GQ+ versus GC-) revela cinco genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 6% dos genes, sendo todos (100%) hiporregulados.

COMPARAÇÃO 4: GQ+ VERSUS GQ-

Grupo Queimadura + KGF (GQ+) em análise *versus* Grupo Queimadura (GQ-) referência.

A Figura 9 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 4.

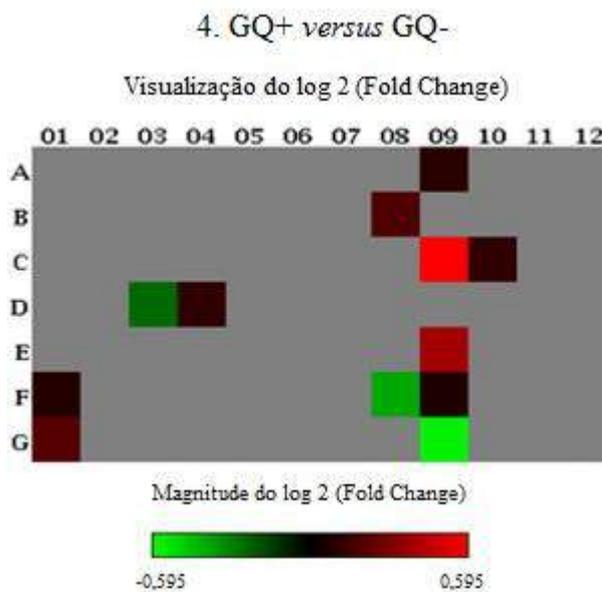


FIGURA 9. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ+ *versus* GQ-.

A Figura 10 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 4.

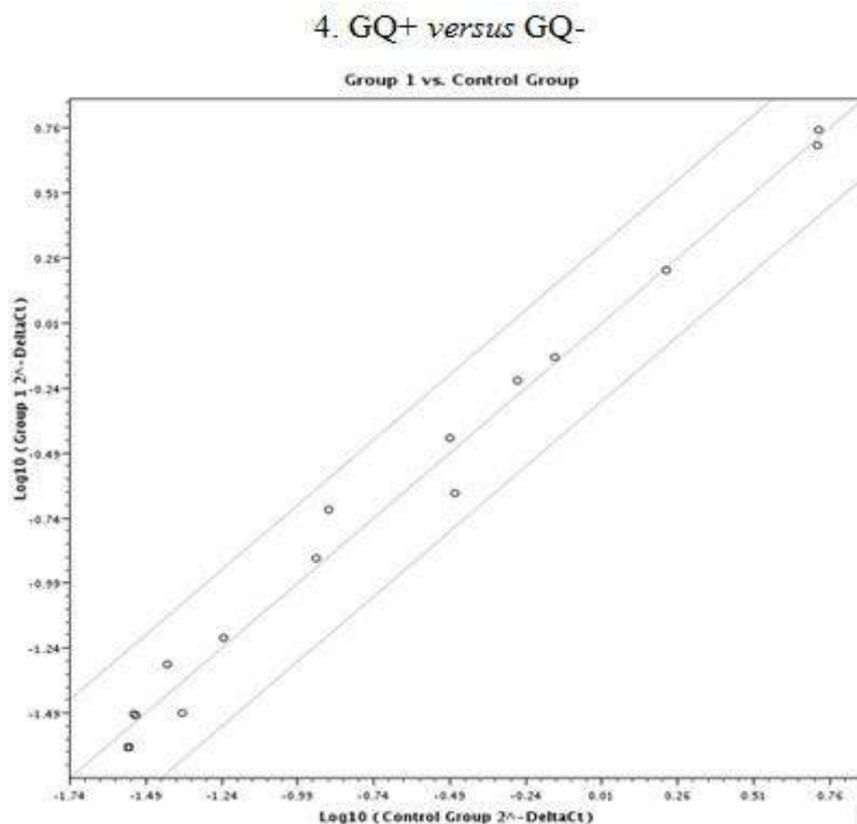


FIGURA 10. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ+ versus GQ-.

TABELA 7. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 4 entre o GQ+ versus GQ-. [Quando foi analisado diretamente a ação do KGF, única diferença entre os dois grupos analisados].

4. GQ+ versus GQ-	
Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
-	0

Para a expressão gênica relativa do GQ+ versus GQ- não houve nenhum gene diferencialmente expresso que fosse estatisticamente significativo. Mesmo havendo valores do *fold change* ou mudança de razão > 2 , o parâmetro *comments* ou comentários estava com “B” ou “C” e o valor de $p < 0,05$.

COMPARAÇÃO 5: GQ+ VERSUS GC+

Grupo Queimadura + KGF (GQ+) em análise *versus* Grupo Controle + KGF (GC+) referência.

A Figura 11 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 5.

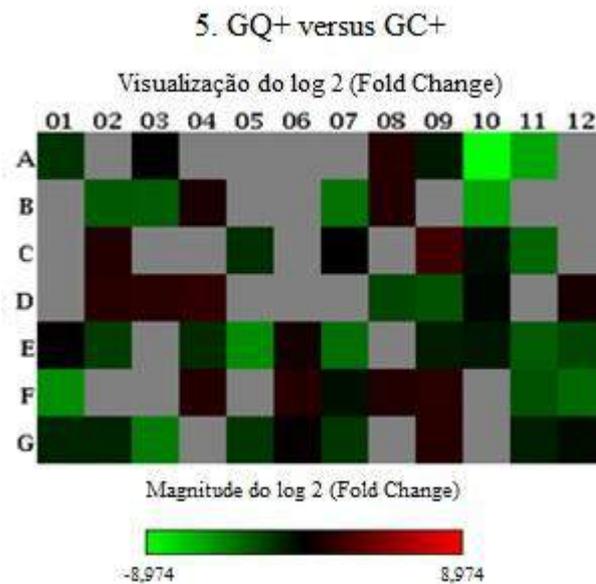


FIGURA 11. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ *versus* GC+.

A Figura 12 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 5.

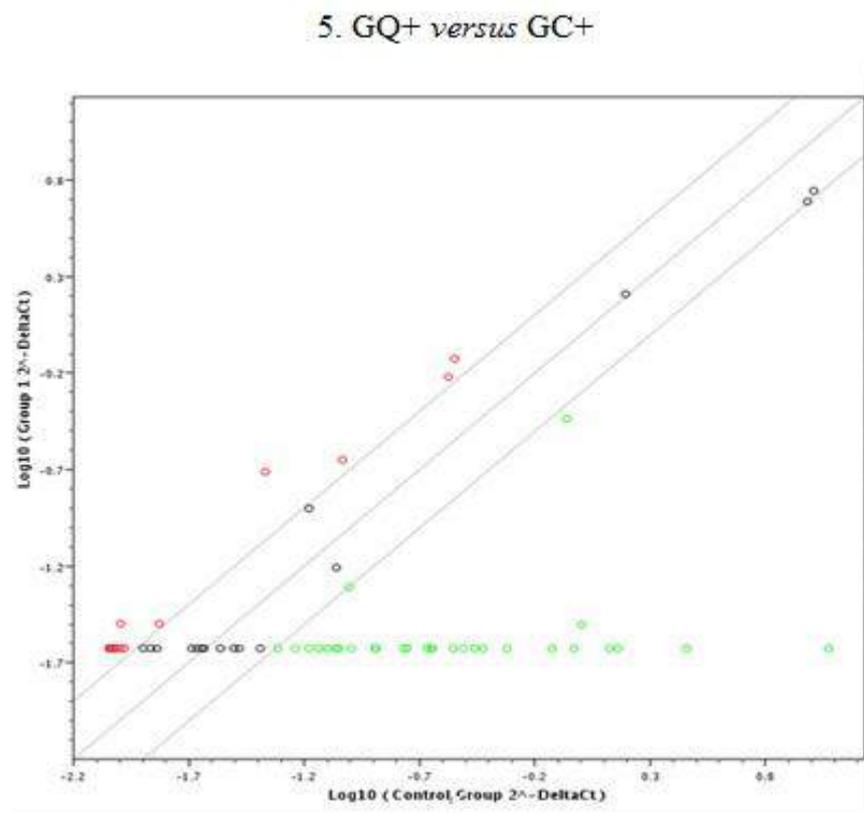


FIGURA 12. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.

TABELA 8. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 5 entre o GQ+ *versus* GC+. [Quando foram analisados a ação do KGF e queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

5. GQ+ <i>versus</i> GC+	
Gene	Fold change (mudança de razão)
PTEN	2,6233
PLAU	2,5314
IFNG	2,5015
COL14A1	2,4468
PDGFA	2,3331
CTNNB1	2,2589
CXCL2	2,2493
MAPK1	-2,0078
WISP1	-2,0470
SERPINE1	-2,3642
ITGAV	-2,8123
EGFR	-3,0935
ACTA2	-3,3848
TIMP1	-3,6779
TGFB1	-3,7557
ITGA5	-4,2751
MMP1	-5,4201
IL6	-5,5064
IL6ST	-7,2338
RAC1	-7,5117
COL5A1	-9,1196
MIF	-9,5175
COL5A2	-9,5516
FGF7	-11,8338
RHOA	-13,1029
ITGB5	-14,6218
CTGF	-15,9698
TAGLN	-20,3098
ITGB1	-31,6939
MMP2	-32,1600
CTSK	-56,0127
COL3A1	-61,5159
COL1A2	-502,7706

O resultado da comparação 5 (GQ+ *versus* GC+) revela 33 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 39% dos genes, sendo 26 genes (79%) hiporregulados e 7 genes (21%) hiperregulados.

COMPARAÇÃO 6: GQ- VERSUS GC+

Grupo Queimadura (GQ-) em análise *versus* Grupo Controle + KGF (GC+) referência.

A Figura 13 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 6.

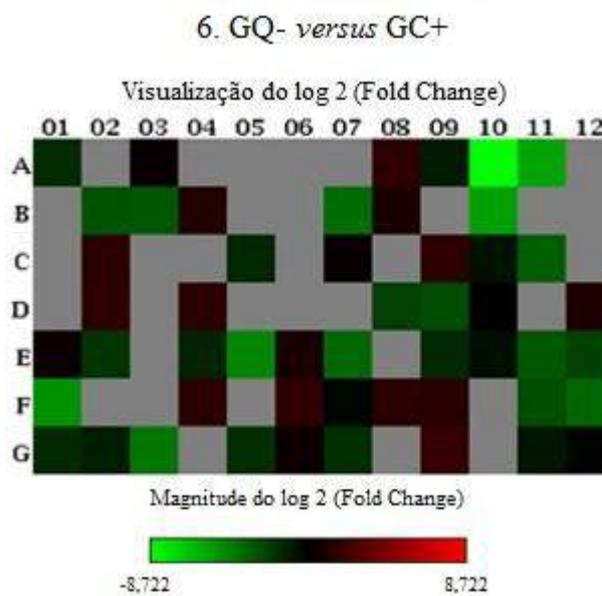


FIGURA 13. *Heat map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ- *versus* GC+.

A Figura 14 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 6.

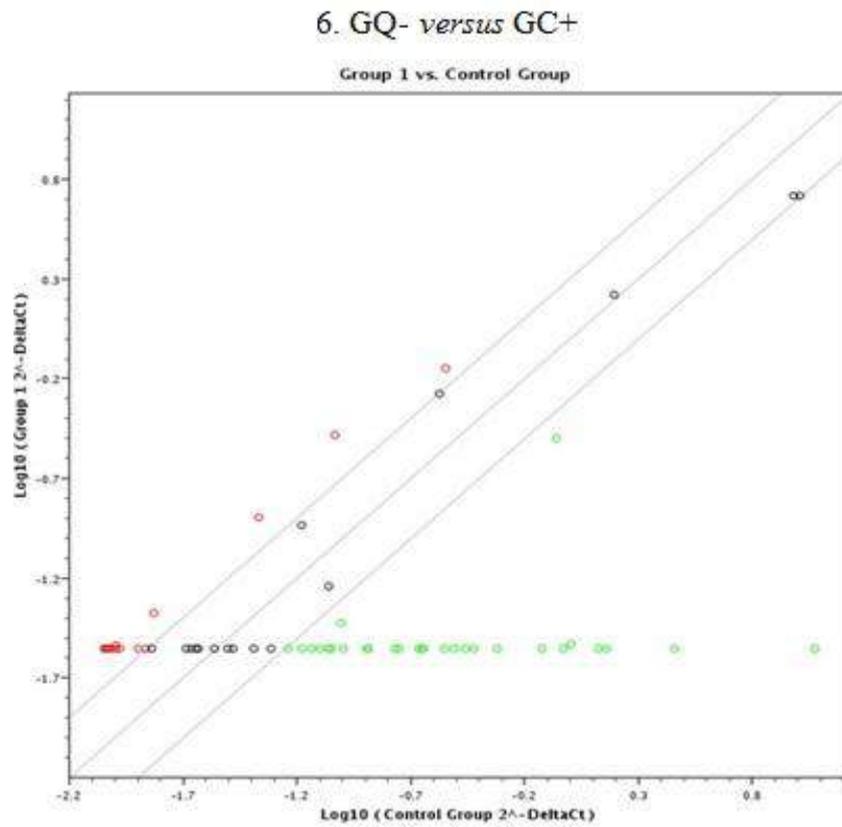


FIGURA 14. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ- versus GC+.

TABELA 9. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 6 entre o GC- versus GC+. [Quando foram analisados a ação do KGF no grupo de referência ou controle, além da queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

6. GQ- versus GC+	
Gene	Fold change (mudança de razão)
VEGFA	3,5844
PLAU	3,0146
FGF10	3,0041
IFNG	2,9790
COL14A1	2,9138
IL10	2,9054
PDGFA	2,7785
CXCL2	2,6786
PTEN	2,4987
COL5A3	2,2258
ITGA3	2,0584
ITGAV	-2,3616
EGFR	-2,5976
MAPK1	-2,6220
SERPINE1	-2,7178
ACTA2	-2,8422
TIMP1	-3,0884
TGFB1	-3,1537
ITGA5	-3,5899
MMP1	-4,5514
IL6	-4,6238
IL6ST	-6,0744
RAC1	-6,3078
COL5A1	-7,6579
MIF	-7,9921
COL5A2	-8,0207
FGF7	-9,9371
RHOA	-11,0027
ITGB5	-12,2782
CTGF	-13,4102
TAGLN	-17,0545
ITGB1	-26,6140
MMP2	-34,1323
CTSK	-47,0349
COL3A1	-51,6561
COL1A2	-422,1858

O resultado da comparação 6 (GQ- *versus* GC+) revela 36 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 43% dos genes, sendo 25 genes (70%) hiporregulados e 11 genes (30%) hiperregulados.

6. DISCUSSÃO

Sofrer uma queimadura extensa é um dos processos mais devastadores que um indivíduo pode sofrer em vida (STAVROU *et al.*, 2015). Métodos para melhorar a cicatrização de feridas e reparo dos tecidos, intervenções terapêuticas que atenuem a resposta inflamatória aguda e diminuam a expressão de algumas citocinas após lesão por queimadura, podem oferecer oportunidades de reduzir a taxa de mortalidade e melhorar a qualidade de vida de pacientes, além de contribuir na redução de custos em cuidados com a saúde (HERNDON & TOMPKINS, 2004; GOSAIN & GAMELLI, 2005; BAXTER *et al.*, 2012).

Uma melhor compreensão do valor terapêutico dos fatores de crescimento (FC) pode ser essencial para aprimorar a terapia em queimados (WEARING & SHERRATT, 2000). Vários estudos *in vivo* demonstraram a importância do KGF na cicatrização de feridas (WERNER *et al.*, 1992; STAINO-COICO *et al.*, 1993; PIERCE *et al.*, 1994; GEMMATI *et al.*, 2009).

No presente estudo, os experimentos com KGF em cultura de queratinócitos de pacientes com queimadura em comparação com pacientes hígidos é inovador, não havendo referências similares na literatura que pudesse servir de parâmetro.

As comparações entre GC e GQ, na presença e ausência de KGF, trouxeram importantes resultados com alterações em todas as categorias dos 84 genes relacionados à cicatrização. Como existiam 4 grupos (GQ-, GQ+, GC-, GC+) poderíamos obter um total de 12 alternativas de comparações: GQ+ com GQ-, GQ+ com GC-, GQ+ com GC+; GQ- com GQ+, GQ- com GC-, GQ- com GC+; GC+ com GQ+, GC+ com GQ-, GC+ com GC-; GC- com GQ+, GC- com GQ- e GC- com GC+. Sabe-se que nesse tipo de comparação, sempre o primeiro grupo é analisado em relação ao segundo, ou seja, o segundo grupo é o de referência. Sendo assim, analisa-se a hiporregulação ou a hiperregulação da expressão gênica de um grupo relativa a esse grupo de referência.

Como o objetivo foi analisar a ação do KGF em queratinócitos de paciente com queimadura, os pacientes do grupo controle não apresentavam nenhuma alteração diagnosticada no momento da coleta, ou seja, eram hígidos. Inclusive, os pacientes do grupo controle não poderiam ser fumantes, mesmo porque as cirurgias estéticas no HU não são realizadas em fumantes. Houve um controle rigoroso para este estudo comparativo em relação aos pacientes com queimadura.

Foram realizadas 6 comparações entre os grupos, sendo elas 1. GC+ *versus* GC-, 2. GQ- *versus* GC-, 3. GQ+ *versus* GC-, 4. GQ+ *versus* GQ-, 5. GQ+ *versus* GC+ e 6. GQ- *versus* GC+.

A primeira comparação, grupo controle com KGF em relação ao grupo controle sem KGF, teve como objetivo avaliar unicamente a ação do KGF ao meio de cultura de queratinócitos de pacientes hígidos, obtendo-se somente um gene hiporregulado (CSF3) e um gene hiperregulado (COL1A2) pela ação do KGF.

Na segunda comparação, confrontou-se o grupo queimadura sem KGF com o grupo controle sem KGF para definir quais genes estariam diferencialmente expressos em decorrência da queimadura, que nesse caso foram 5 genes hiporregulados.

Na terceira comparação, analisou-se o grupo queimadura com KGF em relação ao grupo controle sem KGF para verificar a ação do KGF no grupo queimadura na expressão gênica relativa, sendo o GC- o grupo referencial, e correlacionar com a segunda comparação. Entretanto, a presença do KGF no grupo queimadura promoveu a hiporregulação dos mesmos 5 genes que mostra a comparação 2, na qual em nenhum grupo foi suplementado com KGF. Esta foi a primeira indicação de que o KGF não está alterando a expressão gênica em queratinócitos provenientes de pacientes com queimadura.

Quando realizou-se a quarta comparação, entre o grupo queimadura com KGF e o grupo queimadura sem KGF, era esperado uma maior relevância no resultado da expressão gênica relativa, pois nessa comparação avaliou-se diretamente a ação do KGF em queratinócitos de pacientes com queimadura, porém nenhum gene se mostrou diferencialmente expresso. Novamente, o resultado indica que o KGF não apresentou ação sobre a expressão gênica em queratinócitos provenientes de pacientes com queimadura pelo método utilizado, pois nenhum gene revelou-se diferencialmente expresso.

Já a quinta e sexta comparações, o grupo referencial foi mudado para grupo controle com KGF. Na quinta comparação, analisou-se o grupo queimadura com KGF em relação ao grupo controle com KGF, resultando em 33 genes diferencialmente expressos, sendo 26 hiporregulados e 7 hiperregulados em relação ao grupo referencial.

Na sexta comparação, analisou-se o grupo queimadura sem KGF em relação ao grupo controle com KGF para correlacionar com a quinta comparação que apresenta o mesmo grupo referencial. A ausência de KGF nesta sexta comparação no grupo analisado não evidenciou nenhuma mudança significativa. Houveram 36 genes diferencialmente expressos, sendo 25 hiporregulados e 11 hiperregulados, grande parte de genes similares à quinta comparação, mas sem KGF no grupo analisado foi obtido mais genes que na comparação anterior, sugerindo que a ação do KGF quando colocado nos dois grupos altera menos a expressão diferencial relativa entre os grupos.

Pode-se dizer, assim, que a presença ou ausência de KGF alterou em grande porcentagem os mesmos genes na expressão gênica relativa das comparações 2 e 3 e das comparações 5 e 6. Outras possibilidades de comparações não foram realizadas, pois não definiam parâmetro adequado de análise, uma vez que o grupo experimental é o GQ e o grupo referencial é o GC, sendo usado em algumas comparações somente para afastar possíveis incongruências.

Das 6 comparações realizadas, os genes COL3A1, ITGB1 e MMP-2 apareceram diferencialmente expresso nas comparações 2, 3, 5 e 6, ou seja, nas comparações em que o grupo analisado é o GQ na presença e ausência de KGF em relação ao grupo referencial que é o GC na presença e ausência de KGF.

Dos dez genes mais hiporregulados da quinta comparação, com *fold change* ou mudança de razão menor que -10, oito deles estão envolvidos com produção de matriz extracelular e células de adesão e dois pertencem à categoria de citocinas inflamatórias e quimiocinas. E dos sete genes mais hiperregulados, embora o *fold change* tenha ficado próximo ao limiar de 2, a maioria, 5 genes, está relacionada com sinalização celular pelas categorias de transdução de sinal, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e quimiocinas. Apenas 2 estão envolvidos com a produção de colágeno e células de adesão.

Correlacionando as comparações 5 (GQ+ versus GC+) e 6 (GQ- versus GC+), a diferença é a presença de KGF no grupo queimadura, tendo GC+ como grupo referencial para ambos. O perfil da expressão gênica de ambos é similar. Entretanto, o gene CTNNA1, que codifica a proteína catenina beta-1, está intensamente hiporregulado na comparação 6, *fold change* de -47, enquanto na comparação 5 está hiperregulado,

fold change de 2. Este gene está envolvido com a síntese de proteínas de adesão intercelular e com transdução de sinal para as células pararem de se dividir após completa reepitelização cutânea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>).

O CTNNB1 tem sido relatado como regulador na diferenciação de células tronco de queratinócitos e da morfogênese do folículo piloso, muito importante na manutenção da arquitetura normal da pele e da reepitelização. A hiperexpressão de CTNNB1 na camada basal da epiderme conduz a uma via de sinalização para diferenciação anormal de queratinócitos, que pode ser notada em peles psoriáticas (GABER *et al.*, 2015).

O gene COL1A2 apresenta-se extremamente hiporregulado nas comparações 5 (*fold change* -502) e 6 (*fold change* -422). Esse gene codifica a cadeia pro-alfa2 de colágeno tipo I, a forma mais abundante do organismo, no tecido conjuntivo, na derme, nos ossos, nos tendões e na córnea. Para a formação do pró-colágeno, são necessárias duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2 (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL1A2>, acesso em 29/06/2015).

O processo de cicatrização consiste em 3 fases: inflamatória (3 horas a 1 dia), proliferativa (1 a 7 dias) e maturação (7 a 14 dias), didaticamente dividindo-se o processo. KUBO *et al.* (2014) verificaram a expressão de 13 genes em murinos com queimadura, entre eles o gene para colágeno tipo 1, na tentativa de sugerir a estimativa do tempo decorrido pós-trauma. Os autores verificaram um aumento na expressão de colágeno tipo 1 na fase proliferativa ou de maturação, concluindo que não foi possível estimar o tempo decorrido da queimadura pela avaliação da expressão gênica (KUBO *et al.*, 2014).

De acordo com o estudo de YANG *et al.* (2001), a hiperexpressão do colágeno tipo I em queimadura de camundongos transgênicos para TGF-beta1 está relacionado com o efeito parácrino do TGF-beta1 hiperexpresso. Ou seja, a presença aumentada de TGF-beta1 influencia a hiperregulação do gene COL1A2, sendo proporcional à sua concentração. Seguindo o mesmo raciocínio, ZHANG *et al.* (2011), relataram que a depleção de um fator de transcrição conhecido por SIP1 em cicatrizes patológicas pode resultar em uma hiperregulação COL1A2 induzida por TGF-beta1 e em uma depleção anormal de MMP-1 na fibrose e a formação de cicatriz patológica, ou seja, mais um

estudo apresentando a influência de TGF-beta1 sobre COL1A2 e a síntese de colágeno I.

Outro efeito parácrino sobre a expressão de COL1A2 foi demonstrado por ALFARO *et al.* (2013) que injetaram fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF) em modelo de ferida com células-tronco mesenquimais e enxertaram em camundongos para analisar seu efeito na fibrose. Utilizaram qPCR *Array* para verificar os níveis de COL1A2. Os autores demonstraram que a exposição à CTGF em estágios iniciais da cicatrização de feridas (0 a 15 dias) diminuem a deposição de colágeno e a exposição prolongada (28 dias) ao CTGF aumenta os níveis de colágenos transcritos.

O gene COL3A1 codifica informações para síntese da cadeia pró-alfa 1 do colágeno tipo III, e três cópias dessa cadeia formam o pró-colágeno III. O colágeno tipo III está presente na pele, nas paredes dos vasos sanguíneos, nos pulmões, entre outros (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL3A1>, acesso em 29/06/2015). No presente estudo, o gene COL3A1 está hiporregulado nas comparações 2 (CQ- *versus* GC-), 3 (CQ+ *versus* GC-), 5 (CQ+ *versus* GC+) e 6 (CQ- *versus* GC+), sendo que a presença de KGF intensificou essa hiporregulação cerca de 20% os valores de *fold change*. Na literatura, não foi encontrado estudo relacionando COL3A1 com queimadura ou KGF, apenas referência sobre a síndrome hereditária de Ehlers-Danlos que causa desordens no tecido conjuntivo por defeito no gene COL3A1 e síntese de colágeno (ALLAPARTHI *et al.*, 2013).

O gene CTSK apresenta-se hiporregulado nas comparações 2 (GQ- *versus* GC-, *fold change* -29), 3 (GQ+ *versus* GC-, *fold change* -35) e 5 (GQ+ *versus* GC+, *fold change* -56), é conhecido como *Cathepsin K*, e é responsável pela síntese de catepsina, uma potente enzima, protease de cisteína, de degradação da matriz extracelular com ação colagenolítica, especialmente sobre o colágeno I, elastolítica e processamento de antígenos, com degradação de células B. A catepsina exerce atividade sob baixas condições de pH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1513>, acesso em 29/06/2015; HIRAI *et al.*, 2013). Não foram encontrados estudos relacionando CTSK com queimadura ou KGF.

O gene ITGB1 está hiporregulado nas comparações 2 (GQ- *versus* GC-, *fold change* -23), 3 (GQ+ *versus* GC-, *fold change* -28), 5 (GQ+ *versus* GC+, *fold change* -

31) e 6 (GQ- versus GC+, *fold change* -26). O ITGB1 é responsável pela adesão intercelular por sintetizar integrina beta-1, também conhecida como CD29. As integrinas são proteínas de adesão presentes na membrana celular que funcionam como pontes intercelulares e participam da interação com a MEC. Possuem um papel importante no processo de cicatrização, regulando apoptose e remodelação tecidual, assim como na resposta imunológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3688>, acesso em 29/06/2015).

As integrinas trabalham em conjunto com outras proteínas, como a caderina que é uma glicoproteína de adesão celular, as selectinas e os sindecans que são intermediadores na interação célula-célula e célula-MEC. Os ligantes das integrinas são fibronectina, vitronectina, colágeno e laminina. Quando ativadas, promovem uma resposta de regulação do ciclo celular, com alteração de formato ou motilidade celular ou, ainda, promovem a adição de novos receptores de membrana às células, permitindo, por exemplo, a sinalização às plaquetas para iniciar uma interação com fatores de coagulação (ALAN *et al.*, 2007).

Estudo de STRICKLER *et al.* (2015) relaciona ITGB1 com imunidade e cicatrização. Os autores mencionaram que a deficiência de adesão leucocitária (LAD) é hereditária, causada por mutação gênica, e é caracterizada por deficiência imunológica, neutrofilia periférica, infecções bacterianas e fúngicas recorrentes, cicatrização deficiente e taxa de mortalidade elevada em crianças. É sabido que existe uma deficiência imunológica no paciente queimado (CORNICK *et al.*, 2014).

O gene MMP-2 apresenta-se hiporregulado nas comparações 2 (GQ- versus GC- com *fold change* de -31), 3 (GQ+ versus GC-, *fold change* -29), 5 (GQ+ versus GC+, *fold change* -32) e 6 (GQ- versus GC+, *fold change* -34). O gene MMP-2 contém informação gênica para a síntese da enzima metaloproteinase tipo 2 (MMP-2), enzima da matriz extracelular que degrada colágeno tipo IV, o principal componente estrutural da camada basal dos epitélios, além de estar presente na angioneogênese, reparo tecidual, inflamação e remodelação óssea. Mutações no MMP2 causam nódulos firmes subcutâneos e anormalidades na pele (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MMP2>, acesso em 29/06/2015).

KUBO *et al.* (2014) revelaram a hiperexpressão de MMP-2 do 3º dia até o 14º dia após queimadura em murinos. ZHAO *et al.* (2014) sugerem que a angiogênese envolve a secreção e ativação de MMP-2 por células endoteliais e que a expressão de MMP-2 está aumentada no 1º e 3º dias, caindo a partir do 7º após queimadura em ratos. Nos grupos GQ com e sem KGF do presente estudo, houve hiporregulação, diferente do encontrado por KUBO *et al.* (2014) e ZHAO *et al.* (2014), portanto mostra a necessidade de estudo específico desse gene em projetos futuros.

O gene CSF3 codifica uma citocina chamada fator estimulante de colônias granulocitárias (Colony Stimulating Factor 3, Granulocyte), que quando ativada é encontrada no meio extracelular, controla a produção, diferenciação e função dos granulócitos, que são células de defesa do organismo, além de possuir capacidade clonogênica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1440>, acesso em 29/06/2015; DUGAN *et al.*, 2007).

No presente estudo, o CSF3 mostra-se hiporregulado nas comparações 1 (GC+ versus GC-, *fold change* -69), 2 (GQ- versus GC-, *fold change* -22), 3 (GQ+ versus GC-, *fold change* -26), visto que o grupo referencial nessas comparações é o GC-. Nota-se que a presença da queimadura nas comparações 2 e 3 promove menor hiporregulação gênica relativa quando comparada a expressão gênica de queratinócitos de pacientes hígidos na comparação 1.

DUGAN *et al.* (2007) analisaram o impacto do estresse crônico psicogênico antes da queimadura em camundongos expostos ao predador, uma hora por dia durante três dias consecutivos, antes de efetuar uma lesão por queimadura com 15% de SCQ. Descobriram que esse estresse prévio foi positivo ao induzir o aumento de CSF3 e atenuar o aumento de monócitos e neutrófilos imaturos e de MCP-1 induzido pela queimadura.

O gene FGF7 codifica uma proteína conhecida como FGF7 ou KGF, que é um membro da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e objeto do presente estudo. A família FGF possui atividades relacionadas a sobrevivência e mitose e estão envolvidos em vários processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, o crescimento celular, a morfogênese, reparo tecidual, entre outros. O FGF7 é mitogênico para queratinócitos, mas não para fibroblastos e células endoteliais. Estudos com

camundongos implicam funções na morfogênese do epitélio, reepitelização de feridas, desenvolvimento de folículos pilosos e organogênese pulmonar precoce (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2252>, acesso em 29/06/2015).

No presente estudo, a hiporregulação relativa do KGF está presente nas comparações 5 (GQ+ versus GC+, *fold change* -12) e 6 (GQ- versus GC+, *fold change* -10), cujo grupo de referência é a presença de KGF no grupo controle.

KOPP *et al.* (2004) avaliaram a ação do KGF em queimadura de segundo grau em porcos analisando três diferentes grupos, sendo um grupo controle, um grupo com enxerto de cultura de queratinócitos HaCat e um último grupo com enxerto de cultura de queratinócitos HaCat contendo KGF, este último atuando como um sistema de liberação de KGF. O resultado mostra que no grupo controle, um epitélio fino foi formado após 10 dias. No segundo grupo sem KGF houve completa epitelização após 7 dias e no grupo tratado com KGF a epitelização aconteceu em 5 dias, comprovando a ação do KGF no processo de epitelização.

STAIANO-COICO *et al.* (1993) identificaram a melhora na cicatrização de feridas em orelha de coelhos com KGF exógeno. PIERCE *et al.* (1994) constataram que KGF exógeno acelerou a cicatrização de feridas em orelha de porcos. MARTI *et al.* (2004) mostrou que a injeção de KGF acelerou o fechamento de ferida e reduziu a inflamação em ratos diabéticos.

É evidente na literatura que o KGF possui ação sobre a cicatrização da pele. Sabe-se que o KGF é produzido por fibroblastos, age em receptores de queratinócitos e que a comunicação celular, especialmente por IL-1 e TGF-beta, estimula a liberação de KGF e proliferação de queratinócitos, interagindo de forma cíclica e dinâmica. GREAVES *et al.* (2013) mostraram que o TGF-beta é produzido por fibroblastos e queratinócitos e está intimamente relacionado com a produção de KGF pelos fibroblastos.

Como perspectivas, identificou-se a necessidade de serem realizados novos pesquisas experimentais *in vitro*, para a definição de uma nova concentração da suplementação do KGF ao meio de cultura, novas pesquisas relacionados ao tempo de exposição do KGF no meio de cultura para analisar a ação aguda e crônica de KGF na

cultura de queratinócitos, além de maior número de pacientes com queimadura envolvidos.

Tais fatores também podem ser citados como as dificuldades encontradas no presente estudo, pois tanto a concentração do KGF quanto o tempo de exposição ao KGF já foram mencionados na literatura e possuem uma relação direta com os resultados na cicatrização de feridas.

Os dados encontrados no presente projeto são importantes, originais e determinam um painel inicial na literatura da ação do KGF sobre queratinócitos de pacientes com grave queimadura, devendo gerar discussão pela falta de referências na literatura determinar o crescimento do estudo na área.

A utilização clínica do KGF em pacientes com queimadura, seja aplicação tópica ou sistêmica, para a avaliação *in vivo* do processo de cicatrização e, em especial, da imunidade é algo a ser discutido a longo prazo. Sabe-se que o KGF é uma substância que determina proliferação celular, porém enquanto não existirem dados suficientes na pesquisa básica, não é possível definir sua utilização clínica. Mesmo porque não se pode descartar a hipótese do KGF poder promover alterações gênicas ou mutações.

Novos métodos e novas tecnologias precisam ser desenvolvidos para atenuar a resposta inflamatória do paciente com queimadura e melhorar o processo de regeneração da pele perdida nesse trauma, buscando diminuir o risco de morte, a taxa de infecção pela falta da barreira cutânea além de outras morbidades, bem como diminuir o custo com o tratamento e melhorar a qualidade de vida e a reabilitação do paciente.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A suplementação de KGF à cultura de queratinócitos de pacientes com queimadura não determinou expressão gênica diferencial de nenhum dos genes marcadores da cicatrização.

8. REFERÊNCIAS

- Abdullahi A, Jeschke MG. Nutrition and anabolic pharmacotherapies in the care of burn patients. *Nutr Clin Pract*. 2014 Oct;29(5):621-30.
- Alan N, Goel HL, Zarif MJ, Butterfield JE, Perkins HM, Sansoucy BG, Sawyer TK, Languino LR. The integrin-growth factor receptor duet. *J Cell Physiol*. 2007;213(3):649-53.
- Allaparthi S, Verma H, Burns DL, Joyce AM. Conservative management of small bowel perforation in Ehlers-Danlos syndrome type IV. *World J Gastrointest Endosc*. 2013;5(8):398-401.
- Alfaro MP, Deskins DL, Wallus M, DasGupta J, Davidson JM, Nanney LB, Guney MA, Gannon M, Youn PP. A physiological role for connective tissue growth factor in early wound healing. *Lab Invest*. 2013;93(1):81–95.
- American Burn Association (ABA), National Burn Repository® 2014, disponível em <http://ameriburn.org/2014NBRAnnualReport.pdf>, acesso em 29/06/2015.
- Arturson G. Pathophysiology of the burn wound. *Ann Chir Gynaecol*. 1980;69(5):178–90.
- Baxter RM, Dai T, Kimball J, Wang E, Hamblin MR, Wiesmann WP, McCarthy SJ, Baker SM. Chitosan dressing promotes healing in third degree burns in mice: Gene expression analysis shows biphasic effects for rapid tissue regeneration and decreased fibrotic signaling. *J Biomed Mat Res*. 2013;101A(2):340-8.
- Bilate AMB. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de reumatologia clínica*. 2007;8:47-51.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):1-12.
- Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA. Regulation of Keratinocyte Growth Factor Gene Expression by Interleukin 1. *J Biol Chem*. 1994;269(14):10753-7.

- Ching YH, Sutton TL, Pierpont YN, Robson MC, Payne WG. The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. *Eplasty*. 2011;11:e41.
- Clericuzio M, Burlando B, Gandini G, Tinello S, Ranzato E, Martinotti S, Cornara L. Keratinocyte wound healing activity of galactoglycerolipids from the fern *Ophioglossum vulgatum* L. *J Nat Med*. 2014;68(1):31-7.
- Cornick SM, Noronha SA, Noronha SM, Cezillo MV, Ferreira LM, Gragnani A. Toll like receptors gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir Bras*. 2014;29(3):33-8.
- Damante, CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos. Tese de Doutorado, 2007 Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia.
- Dasu MR, Herndon DN, Spies M, Perez-Polo JR. Genomic analysis of insulin-like growth factor-I gene transfer in thermally injured rats. *Wound Repair Regen*. 2004;12(2):217-24.
- Degim Z, Celebi N, Alemdaroglu C, Deveci M, Ozturk S, Ozogul C. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int Wound J*. 2011;8:343-54.
- Diaz EC, Herndon DN, Porter C, Sidossis LS, Suman OE, Børsheim E. Effects of pharmacological interventions on muscle protein synthesis and breakdown in recovery from burns. *Burns*. 2015;41(4):649-57.
- Dugan AL, Schwemberger S, Noel GJ, Babcock G, Ogle CK, Horseman ND. Psychogenic stress prior to burn injury has differential effects on bone marrow and cytokine responses. *Exp Biol Med*. 2007;232(2):253-61.
- Edelman LS. Social and economic factors associated with the risk of burn injury. *Burns*. 2007;33(8):958-65.

Evers LH, Bhavsar D, Mailander P. The biology of burn injury. *Exper Dermatol*. 2010;19:777–83.

Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cells. *Science*. 1989;245(4919):752-5.

Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther*. 2003;5:25–34.

Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral J M, Jeschke MG. Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock*. 2008;30:503-7.

Gaber MAEW, Kandil MAEH, El-Farargy SM, Galbet DA. Beta-catenin expression in psoriasis. *Indian Dermatol Online J*. 2015;6(1):13-6.

Gemmati D, Federici F, Catozzi L, Giancesini S, Tacconi G, Gian GL, Zamboni P. DNA-array of gene variants in venous leg ulcers: Detection of prognostic indicators. *Journal of vascular surgery*. 2009;50(6):1444-51.

Gibran NS, Heimbach DM. Current status of burn wound pathophysiology. *Clin Plast Surg*. 2000;27(1):11–22.

Graghani A, Rossi MB, Albuquerque JCM, Brito GSS, Aloise AC, Ferreira LM. Fator de crescimento de queratinócitos protegeu queratinócitos humanos cultivados expostos ao estresse oxidativo. *Acta Cir Bras*. 2010;25(1):93-7.

Graghani A, Muller BR, Silva IDCG, Noronha SMR, Ferreira LM. Keratinocyte growth factor, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta gene expression in cultured fibroblasts and keratinocytes from burned patients. *Acta Cir Bras*. 2013;28:551-8.

Graghani A, Dell'Aquila AM, Doi AM, Müller BR, Lacerda LA, Machado AMO, Ferreira LM. Perfil microbiológico da unidade de queimaduras da EPM/UNIFESP, São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Cir. Plást*. 2014a;29(1):114-9.

- Gragnani A, Cezillo MVB, Da Silva IDCG, De Noronha SMR, Correa-Noronha SAA, Ferreira LM. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. *Burns (Oxford)*. 2014b;4:947-56.
- Greaves NS, Ashcroft KJ, Baguneid M, Bayat A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J Dermatol Sci*. 2013 Dec;72(3):206-17
- Greco JA, Pollins AC, Boone BE, Levy SE, Nanney LB. A microarray analysis of temporal gene expression profiles in thermally injured human skin. *Burns*. 2010;36(2):192-204.
- Green H, Kehinde THE, Thomas J. Growth of cultivated human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad US*. 1979;76:5665-9.
- Green H. Cultured cells for treatment of disease. *Sci Am*. 1991;265(5):96-102.
- Gosain A, Gamelli RL. A primer in cytokines. *J Burn Care Rehabil*. 2005;26:7-12.
- Han TH, Lee S, Kwon JE, Kwak IS, Kim KM. The limited immunomodulatory effects of escharectomy on the kinetics of endotoxin, cytokines and adhesion molecules in major burns. *Mediat Inflamm*. 2004;13:241-6.
- Herndon DN, Barrow RE, Rutan RL, Rutan TC, Desai MH, Abston S. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. *Ann Surg*. 1989;209:547-52.
- Herndon DN, Tompkins RG. Support of the metabolic response to burn injury. *Lancet*. 2004;363(9424):1895-902.
- Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: Pathophysiology and types of burns. *BMJ*. 2004;328(7453):1427-9.
- Hirai T, Kanda T, Sato K, Takaishi M, Nakajima K, Yamamoto M, Kamijima R, Digiovanni J, Sano S. Cathepsin K is involved in development of psoriasis-like skin

lesions through TLR-dependent Th17 activation. *J Immunol.* 2013;190(9):4805-11.

Hirsch T, Peter SV, Dubin G, Mittler D, Jacobsen F, Lehnhardt M, Elof Eriksson, Steinau HU, Steinstraesser L. Adenoviral gene delivery to primary human cutaneous cells and burn wounds. *Mol Med.* 2006;12(9-10):199-207.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL3A1>, acesso em 29/06/2015.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL1A2>, acesso em 29/06/2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1513>, acesso em 29/06/2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3688>, acesso em 29/06/2015.

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MMP2>, acesso em 29/06/2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1440>, acesso em 29/06/2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2252>, acesso em 29/06/2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1499>, acesso em 29/06/2015.

Iurk LK, Oliveira AF, Gragnani A, Ferreira LM. Evidências no tratamento de queimaduras. *Rev Bras Queimaduras.* 2010;9:95-9.

Jeschke MG, Gauglitz GG, Finnerty CC, Kraft R, Mlcak RP, Herndon DN. Survivors versus nonsurvivors postburn: differences in inflammatory and hypermetabolic trajectories. *Ann Surg.* 2014;259(4):814-23.

Keller U, Krampert M, Kumin A, Braun S, Werner S. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *Eur. J. Cell Biol.* 2004;83:607-12.

Kessler-Becker D, Krieg T, Eckes B. Expression of pro-inflammatory markers by human dermal fibroblasts in a three-dimensional culture model is mediated by an autocrine interleukin-1 loop. *Biochem J.* 2004;379(2):351-8.

Koria P, Brazeau D, Kirkwood K, Hayden P, Klausner M, Andreadis ST. Gene Expression Profile of Tissue Engineered Skin Subjected to Acute Barrier Disruption.

Genomics in tissue engineered skin. 2003;121(2):368-82.

Koria P, Andreadis ST. KGF promotes integrin-alfa-5 expression through CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:1020-31.

Kopp J, Wang GY, Kulmburg P, Schultze-Mosgau S, Huan JN, Ying K, Seyhan H, Jeschke MD, Kneser U, Bach AD, Ge SD, Dooley S, Horch RE. Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF. *Mol Ther*. 2004 Jul;10(1):86-96.

Kubo H, Hayashi T, Ago K, Kanekura T, Ogata M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Leg Med*. 2014;16(1):8-13.

Marti G, Ferguson M, Wang J, Byrnes C, Dieb R, Qaiser R, Bonde P, Duncan MD, Harmon JW. Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model. *Gene Ther*. 2004;11:1780-5.

Mitsunaga Junior JK; Gragnani A; Ramos MLC; Ferreira LM. Rat an experimental model for Burns: A systematic review. *Acta Cir Bras*. 2012;27:417-23.

Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am*. 1990;262(4):56-61.

National Burn Repository, 2011. Report of data from 2001-2011. Disponível em: http://www.ameriburn.org/resources_publications.php. Acesso em 09.09.2012.

Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA, Herndon DN. Current treatment of severely burned patients. *Ann Surg*. 1996;223:14-25.

Niu J, Chang Z, Peng B, Xia Q, Lu W, Huang P, Tsao MS, Chiao PJ. Keratinocyte Growth Factor/ Fibroblast Growth Factor-7-regulated Cell Migration and Invasion through Activation of NF-kappaB Transcription Factors. *The journal of biological chemistry*. 2007;282(9):6001-11.

Noronha SAAC, Noronha SMR, Lanziani LE, Ferreira LM, Gragnani A. Innate and

adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir Bras.* 2014a;29:60-7.

Noronha SAAC, Noronha SMR, Lanziani LE, Ipolito MZ, Ferreira LM, Gragnani A. Human beta defensin-4 and keratinocyte growth factor gene expression in cultured keratinocyte and fibroblasts of burned patients. *Acta Cir Bras.* 2014b;29(3):39-43.

Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, Givol D, Lonai P. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol.* 1993;158(2):475-86.

Paddock HN, Schultz GS, Baker HV, Varela JC, Beierle EA, Moldawer LL, Mazingo DW. Analysis of Gene Expression Patterns in Human Postburn Hypertrophic Scars. *J Burn Care & Rehabil.* 2003;24(6):371-7.

Page RB, Stromberg AJ Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1383-93.

Park HJ, Rouabhia M, Lavertu D, Zhang Z. Electrical Stimulation Modulates the Expression of Multiple Wound Healing Genes in Primary Human Dermal Fibroblasts. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(13-14):1982-90.

Portal da Saúde/ Xeyla, R. Atenção à saúde: Cartilha orienta atendimento às vítimas de queimadura. 30/08/2012. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/6901/162/cartilha-orienta-atendimento-as-vitimas-de-queimadura.html>. Acesso em 09.09.2012.

Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma* 2012;2(1):18-28. In: ReSurge International. http://www.org/about/gfx/fs09_burns%20factsheet.pdf (last accessed June 9th 2011).

Pierce GF, Yanagihara D, Klopchin K, Danilenko DM, Hsu E, Kenney WC, Morris CF. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte

- growth factor. *J Exp Med.* 1994;179 (3):831–40.
- Real DSS, Reis RP, Piccolo MS, Okamoto RH, Gragnani A, Ferreira LM. Oxandrolone use in adult burn patients. Systematic review and meta-analysis. *Acta Cir Bras.* 2014;29(3):68-76.
- Ricarte Filho JCM, Kimura ET. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(6):1102-7.
- Rosa, G. J. M.; Rocha, L. B.; Furlan, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 2007;36:185-209.
- Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Nat Acad Sci.* 1989;86(3):802-6.
- Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406(26):6471-83.
- Schultz G, Rotatori DS, Clark W. EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem.* 1991;45(4):346-52.
- Sheridan, RL. Burn care: Results of technical and organizational progress. *JAMA.* 2003;290(6):719-22.
- Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care & Research.* 2010;31(6):849-73.
- Staiano-Coico L, Krueger JG, Rubin JS, D'Limi S, Vallat VP, Valentino L, Fahey T 3rd, Hawes A, Kingston G, Madden MR, Mathwich M, Gottlieb AB, Aaronson SA. Human keratinocyte growth factor effects in a porcine model of epidermal wound

healing. *J Exp Med*. 1993;178:865–78.

Steinstraesser L, Alarcon W, Fan MH, Klein RD, Aminlari A, Zuccaro C, Su GL, Wang SC. Thermal injury induces expression of CD14 in human skin. *Burns*. 2002;28(3):223-30.

Sobral CS, Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Inhibition of proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* by KGF in an experimental burn model using human cultured keratinocytes. *Burns*. 2007; 33(5):613-20.

Strickler A, Gallo S, King A, Rosenzweig SD. Leucocyte adhesion deficiency type 1 with developmental delay secondary to CMV infection and filiation questions. *BMJ Case Rep* 2015. Epub Apr 9.

Song J, Finnerty CC, Herndon DN, Kraft R, Boehning D, Brooks NC, Tompkins RG, Jeschke MG. Thermal Injury Activates eEF2k-Dependent eEF2 Pathway in Pediatric Patients. *J Parenter Enteral Nutr*. 2012;Jan 23. [Epub ahead of print].

Stavrou D, Haik J, Wiser I, Winkler E, Liran A, Holloway S, Boyd J, Zilinsky I, Weissman O. Validation of the Hebrew version of the Burn Specific Health Scale - Brief questionnaire. *Burns*. 2015 Feb;41(1):188-95.

Vale ECS. Inicial management of burns: approach by dermatologists. *An Bras Dermatol*. 2005;80(1):9-19.

Wearing HJ, Sherratt JA. Keratinocyte growth factor signalling: a mathematical model of dermal-epidermal interaction in epidermal wound healing. *Math Biosc*. 2000;165:41-62.

Werner S, Peters KG, Longaker MT, Fuller-Pace F, Banda MJ, Williams LT. Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:6896–900.

Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of

wounds. *Science*. 1994;266:819-22.

Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2007;127:998–1008.

Wolf SE, Tompkins RG, Herdon DN. On the horizon: Research priorities in burns for the next decade. *Surg Clin North Am*. 2014;94(4):917-30.

Wu J, Ma B, Yi S, Wang Z, He W, Luo G, Chen X, Wang X, Chen A, Barisoni D. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays. *J Trauma*. 2004;57(6):1276-86.

Yang L, Chan T, Demare J, Iwashina T, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Healing of Burn Wounds in Transgenic Mice Overexpressing Transforming Growth Factor- β 1 in the Epidermis. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2147-215.

Yang Q, Orman MA, Berthiaume F, Ierapetritou MG, Androulakis IP. Dynamics of short-term gene expression profiling in liver following thermal injury. *J Surg Res*. 2012;176(2):549-58.

Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, Fuchs E. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat Genet*. 2006;38:356–362

Zhang ZF, Zhang YG, Hu DH, Shi JH, Liu JQ, Zhao ZT, Wang HT, Bai XZ, Cai WX, Zhu HY, Tang CW. Smad interacting protein 1 as a regulator of skin fibrosis in pathological scars. *Burns*. 2011;37(4):665-72.

Zhao J, Chen L, Shu B, Tang J, Zhang L, Xie J, Qi S, Xu Y. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Influences Angiogenesis by Regulating the Coordinated Expression of VEGF and the Ang/Tie System. *Plos One*. 2014;9(3):e92691.

Zhou B, Xu W, Herndon D, Tompkins R, Davis R, Xiao W, Wong WH; Inflammation and Host Response to Injury Program, Toner M, Warren HS, Schoenfeld DA, Rahme L, McDonald-Smith GP, Hayden D, Mason P, Fagan S, Yu YM, Cobb JP, Remick DG, Mannick JA, Lederer JA, Gamelli RL, Silver GM, West MA, Shapiro MB, Smith

R, Camp DG 2nd, Qian W, Storey J, Mindrinos M, Tibshirani R, Lowry S, Calvano S, Chaudry I, West MA, Cohen M, Moore EE, Johnson J, Moldawer LL, Baker HV, Efron PA, Balis UG, Billiar TR, Ochoa JB, Sperry JL, Miller-Graziano CL, De AK, Bankey PE, Finnerty CC, Jeschke MG, Minei JP, Arnoldo BD, Hunt JL, Horton J, Cobb JP, Brownstein B, Freeman B, Maier RV, Nathens AB, Cuschieri J, Gibran N, Klein M, O'Keefe G. Analysis of factorial time-course microarrays with application to a clinical study of burn injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(22):9923-8.

NORMAS ADOTADAS

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> - terminologia em saúde.

Goldenberg, S. Orientação Normativa para Elaboração e difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo; 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requeriment for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br>.

Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. São Paulo: Livraria Médica Paulita; 2008. 84p.

ABSTRACT

Introduction: Severe burn injury is a complex trauma that needs intensive care in the acute setting. Therapeutic interventions that aim to attenuate the acute inflammatory response and to accelerate the healing may contribute to reducing morbidity, mortality and treatment costs. Several studies have demonstrated the importance of keratinocyte growth factor (KGF) in wound healing. **Objective:** Evaluate the effect of KGF in the expression of 84 wound healing genes in human primary keratinocytes cultured from patients with burn. **Methods:** After obtaining viable fragments of skin from four healthy (control group) and four burn patients, human primary keratinocytes was cultured and divided into 4 groups: GQ+ (n = 4 – keratinocytes of severe burn patients treated with KGF), GQ- (n = 4 – untreated keratinocytes of severe burn patients), GC+ (n = 4 – keratinocytes of control group treated with KGF) and GC- (n = 4 – untreated keratinocytes of control group). The gene expression's analysis was performed with qPCR *Array*, making six comparisons: 1) GC+ *versus* GC -; 2) GQ- *versus* GC-; 3) GQ+ *versus* GC-; 4) GQ+ *versus* GQ-, 5) GQ+ *versus* GC+ and 6) GQ- *versus* GC+. **Results:** Comparison 1 showed one down and one up-regulated genes. Comparisons 2 and 3 showed the same five down-regulated genes. Comparison 4 did not show statistically significant gene expression. Comparison 5 showed 26 down-regulated and 7 up-regulated genes. And comparison 6 showed 25 down-regulated and 11 up-regulated genes. **Conclusion:** Supplementation of KGF to the culture of keratinocytes from patients with burn injury not determined the differential gene expression of genes markers of wound healing.

Keywords: 1. Burns; 2. Gene expression; 3. Wound healing; 4. Keratinocyte growth factor (KGF); 5. Keratinocytes.

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupos Queimados

Este é um convite à participação em estudo de pesquisa clínica.

1 – Título do projeto: **“KGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO EM QUERATINÓCITOS DE PACIENTES QUEIMADOS”**.

2 – Desenho do estudo e objetivo(s): “Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o que acontece após o acidente da queimadura, avaliando a expressão de 84 genes marcadores da cicatrização através de qPCR *Array* em cultura de queratinócitos humanos primários oriundos de pacientes com queimadura. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele normal, sem queimadura, que fica ao redor da lesão da queimadura e que durante o procedimento operatório de limpeza do tecido morto (necrosado) da queimadura sai junto da mesma, e que será enviada ao laboratório para cultura.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: durante o procedimento operatório a que o paciente vítima de queimadura é normalmente submetido quando apresenta lesão de II grau profundo ou de III grau, para a retirada do tecido morto (necrosado), que acontece normalmente ao redor do terceiro ou quarto dia após a queimadura, e a pele normal ao redor da área da retirada do tecido morto será coletada para o envio ao laboratório para o isolamento das células e a avaliação. Não será realizada nenhuma conduta diferente da que é feita na cirurgia dos pacientes que não estão no estudo, pois a pele normal ao redor da área necrosada é retirada pelo fato da área queimada não ser regular e o procedimento ser realizado com a faca de Blair, instrumento desenvolvido para a retirada desse tecido morto, mas que tem uma dimensão que sempre retira pele normal ao redor da necrose, portanto, o paciente não será submetido a nenhuma mudança na rotina do protocolo da Unidade de Tratamento de Queimaduras.

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados: amostras de pele normal ao redor da área necrosada retirada ou do descarte proveniente da cirurgia estética serão coletadas e enviadas ao laboratório de cultura de células.

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do estudo: nenhum desconforto fora do habitual aos pacientes que são submetidos à cirurgia na unidade será acrescentado ao paciente; a cirurgia sempre é realizada sob anestesia geral e com analgesia rotineira com opióide forte (morfina, fentanil) após a cirurgia.

6 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto ao paciente no presente estudo. Porém, a queimadura é um trauma complexo de difícil tratamento com grande número de infecções e alta taxa de óbito. Assim, com a obtenção de novos conhecimentos sobre marcadores inflamatórios que estão envolvidos na evolução da queimadura, o estudo estará colaborando com todos os pacientes queimados no futuro com as possíveis mudanças em protocolos se os dados mostrarem essa necessidade.

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não existem, pois os procedimentos relacionados no estudo são realizados de rotina, sem nenhuma mudança, somente que, a pele normal que sai junto do tecido necrótico ou morto e que seria desprezada, e no estudo será coletada e enviada ao laboratório.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Alfredo Gragnani Filho, que pode ser encontrado no endereço

Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Telefone(s): 5576.4118. E-mail: alfredogf@ig.com.br Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br
9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “**KGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO EM QUERATINÓCITOS DE PACIENTES QUEIMADOS**”.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

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

Prof. Alfredo Gragnani Filho

Data

____ / ____ / ____

APÊNDICE 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Este é um convite à participação em estudo de pesquisa clínica.

1 – Título do projeto: “**KGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO EM QUERATINÓCITOS DE PACIENTES QUEIMADOS**”.

2 – Desenho do estudo e objetivo(s): “Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o que acontece após o acidente da queimadura, avaliando a expressão de 84 genes marcadores da cicatrização através de qPCR *Array* em cultura de queratinócitos humanos primários oriundos de pacientes com queimadura. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele normal. A amostra a ser utilizada é a que seria descartada durante realização do procedimento operatório estético - abdominoplastia ou mamoplastia ao qual será submetido.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: durante o procedimento operatório estético ao qual será submetido, pele normal é descartada. Essa pele que normalmente seria desprezada no lixo hospitalar será utilizada nos experimentos do projeto em questão. Não será realizada nenhuma conduta diferente da que é feita na cirurgia dos pacientes que não estão no estudo, pois a pele normal excedente é retirada pela necessidade do procedimento operatório estético, portanto, o paciente não será submetido a nenhuma mudança na rotina do protocolo da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados: amostras de pele normal proveniente do descarte da cirurgia estética serão coletadas e enviadas ao laboratório de cultura de células.

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do estudo: nenhum desconforto fora do habitual aos pacientes que são submetidos à cirurgia na unidade será acrescentado ao paciente; a cirurgia sempre é realizada sob anestesia geral e com analgesia rotineira com analgésicos após a cirurgia.

6 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto ao paciente no presente estudo. Porém, a queimadura é um trauma complexo de difícil tratamento com grande número de infecções e alta taxa de óbito. Assim, com a obtenção de novos conhecimentos sobre mediadores inflamatórios que estão envolvidos na evolução da queimadura, o estudo estará colaborando com todos os pacientes queimados no futuro com as possíveis mudanças em protocolos se os dados mostrarem essa necessidade.

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não existem, pois os procedimentos relacionados no estudo são realizados de rotina, sem nenhuma mudança no protocolo, somente reaproveitando a pele que seria descartada e que no estudo será coletada e enviada ao laboratório.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Alfredo Gragnani Filho, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Telefone(s): 5576.4118. E-mail: alfredogf@ig.com.br Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “**KGF NA EXPRESSÃO GÊNICA DA CICATRIZAÇÃO EM FIBROBLASTOS DÉRMI QUERATINÓCITOS DE PACIENTES QUEIMADOS**”.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

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

Prof. Alfredo Gragnani Filho

Data

____ / ____ / ____

APÊNDICE 3

Descrição dos genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes presentes nas cinco comparações efetuadas entre GQ e GC.	
Genes	Informações
ACTA2	<p>Descrição: Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta / Actina Local: cromossomo 10 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica proteína da família da actina. É importante para a motilidade (isoformas beta e gama), contractilidade (isoforma alfa), estrutura e integridade celular. Sinônimos: AAT6; ACTSA; MYMY5 Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59</p>
COL14A1	<p>Descrição: collagen, type XIV, alpha 1 / Colágeno 14 alfa-1 Local: Cromossomo 8 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica proteína da cadeia alfa do colágeno XIV e está envolvido coma regulação da fibrilogênese. Sinônimos: UND Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7373</p>
COL1A2	<p>Descrição: Collagen, type I, alpha 2 / Colágeno 1 alfa-2 Local: Cromossomo 7 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica proteína pro-alfa 2 do colágeno tipo I, cuja tripla hélice é composta com duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2. O colágeno tipo I é o principal colágeno do tecido conjuntivo e é abundante na derme, ossos e tendão. Sinônimos: OI4 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1278</p>
COL3A1	<p>Descrição: Collagen, type III, alpha 1 / Colágeno 3 alfa-1 Local: Cromossomo 2 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica a cadeia pro-alfa 1 do colágeno tipo III, um colágeno fibrilar muito encontrado no tecido conjuntivo, pele, sistema vascular, pulmão e intestino. Sinônimos: EDS4A Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1281</p>

COL5A1	<p>Descrição: Collagen, type V, alpha 1 / Colágeno 5 alfa-1 Local: Cromossomo 9 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica cadeia alfa do colágeno tipo V, um dos tipos de colágeno fibrilares menos abundantes no organismo. Moléculas de colágenos fibrilares são trímeros que podem ser compostos por um ou mais tipos de cadeia alfa. O colágeno tipo V está presente em tecidos onde se encontra colágeno tipo I e parece regular o conjunto de heterofibras que compõe os colágenos tipo I e V. Sinônimos: EDSC Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1289</p>
COL5A2	<p>Descrição: Collagen, type V, alpha 2 / Colágeno 5 alfa-2 Local: Cromossomo 2 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica a cadeia pró-alfa2 do colágeno tipo V. Uma cadeia pró-alfa2 combina-se com duas cadeias pro-alfa 1 para formar o procolágeno V. Ligações cruzadas entre as fibrilas de pró-colágeno V resultam em colágeno Tipo V, que são muito fortes e maduros. O colágeno tipo V também participa na formação de outros tipos de colágeno do tecido conjuntivo. Sinônimos: AB collagen Fonte: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/COL5A2</p>
COL5A3	<p>Descrição: Collagen, type V, alpha 3 / colágeno 5 alfa-3 Local: Cromossomo 19 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica a cadeia alfa de um dos colágenos fibrilares menos abundantes no organismo. Colágenos fibrilares são trímeros, podendo ser compostos por um ou mais tipos de cadeias alfa. O colágeno tipo V é encontrado em tecidos que contêm colágeno tipo I e parece regular o conjunto de heterofibras dos colágenos tipo I e V. Este gene está intimamente relacionado com o colágeno tipo XI e é possível que as cadeias de colágenos tipos V e XI constituam um único tipo de colágeno com combinações de cadeias específicas para cada tecido. Sinônimos: não há Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50509</p>
CSF3	<p>Descrição: Colony stimulating factor 3 / Fator estimulador de colônia tipo 3 Local: Cromossomo 17 Categoria: Fatores de crescimento Função: Codifica uma proteína que controla a produção, diferenciação e função dos granulócitos. A proteína ativa é encontrada no meio extracelular. Sinônimos: GCSF (Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias); CSF3OS; C17orf33 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1440</p>

CTGF	<p>Descrição: Connective tissue growth fator / Fator de crescimento de tecido conjuntivo</p> <p>Local: Cromossomo 6</p> <p>Categoria: Fatores de crescimento</p> <p>Função: Codifica proteína mitogênica secretada por células do endotélio vasculas. Tem importante função na proliferação e diferenciação de condrócitos, adesão de vários tipos de células e está relacionado com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF).</p> <p>Sinônimos: CCN2; NOV2; HCS24; IGFBP8</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1490</p>
CTNNB1	<p>Descrição: Catenin (cadherin-associated protein), beta 1 / Catenina beta 1</p> <p>Local: Cromossomo 3</p> <p>Categoria: Transdução de sinal</p> <p>Função: Codifica proteína chamada beta-catenina, presente em vários tipos celulares e tecidos. Está envolvida com adesão e comunicação celular. Participa da via de sinalização WNT, sendo que algumas proteínas ligam-se à beta-cateninas para conseguir entrar no núcleo das células. Uma vez no núcleo, a beta-catenina interage com outras proteínas que controlam a expressão gênica. A via de sinalização WNT está envolvida com a proliferação e diferenciação celular, além de participar da manutenção e renovação das células-tronco, estas que são células importantes no reparo ao dano tecidual e podem dar origem a outros tipos celulares. As beta-cateninas também estão envolvidas com a formação do folículo capilar.</p> <p>Sinônimos: CTNNB (beta-catenina); MRD19; armadillo</p> <p>Fonte: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1 e http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CTNNB1</p>
CTSK	<p>Descrição: cathepsin K / catepsina K</p> <p>Local: Cromossomo 1</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Codifica uma proteinase de cisteína lisossômica, presente em vários tecidos. Está envolvida na remodelação e reabsorção óssea. É membro da família de proteínas C1-peptidase predominantemente expressa em osteoclastos. No entanto, a proteína também é expressa em câncer da mama, podendo contribuir com a capacidade de invasão tumoral.</p> <p>Sinônimos: CTSO; PKND; PYCD; CTS02; CTSO1; CTSO2</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1513</p>

CXCL2	<p>Descrição: chemokine (C-X-C motif) ligand 2/ Quimiocina-2 Local: Cromossomo 4 Categoria: Citocinas inflamatórias e quimiocinas Função: Este gene antimicrobiano é membro de uma superfamília de quimiocinas que codificam proteínas envolvidas com os processos imunomoduladores e inflamatórios. Existem quatro subgrupos nesta família baseados na localização do resíduo de cisteína N-terminal e maturação desse peptídeo. Essa família de quimiocinas é expresso em locais de inflamação e podem suprimir a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas. Sinônimos: GRO2; GROb; MIP2; MIP2A; SCYB2; MGSA-b; MIP-2a; CINC-2a Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2920</p>
EGFR	<p>Descrição: epidermal growth factor receptor / Receptor de fator de crescimento epidermal Local: Cromossomo 7 Categoria: Transdução de sinal Função: Codifica uma glicoproteína transmembrana membro de uma superfamília proteína quinase, ou seja, envolvidas com fosforilação e transferência de energia celular (ATP). É receptor de membrana da família do fator de crescimento epidermal. Quando a proteína liga-se ao receptor, há estímulo para a dimerização do receptor, autofosforilação da tirosina e proliferação celular. Sinônimos: ERBB; HER1; mENA; ERBB1; PIG61; NISBD2 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1956</p>
FGF7	<p>Descrição: fibroblast growth factor 7 / Fator de crescimento de fibroblasto 7 Local: Cromossomo 15 Categoria: Fatores de crescimento Função: Codifica proteína membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos, composta por 22 membros. Possui atividade mitogênica e de sobrevivência celular e está envolvido com proliferação, morfogênese, reparo tecidual, além de invasão e crescimento tumoral. Esta proteína é um importante factor de crescimento específico de célula epitelial, cuja atividade mitogênica é predominantemente em queratinócitos, e não em fibroblastos ou células endoteliais. Estudos em homólogos deste gene animais mostram funções na morfogênese do epitélio, reepitelização de feridas, desenvolvimento de cabelo e organogênese pulmonar precoce. Sinônimos: KGF; HBGF-7. Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2252</p>

FGF10	<p>Descrição: fibroblast growth factor 10 / Fator de crescimento de fibroblastos 10</p> <p>Local: Cromossomo 5</p> <p>Categoria: Fatores de crescimento</p> <p>Função: Gene que codifica um membro da superfamília dos fatores de crescimento de fibroblasto, composta por 22 membros. Possui atividade mitogênica e de sobrevivência celular e está envolvido com proliferação, morfogênese, reparo tecidual, além de invasão e crescimento tumoral. É fator primordial no processo de cicatrização de feridas.</p> <p>Sinônimos: não há</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2255</p>
IFNG	<p>Descrição: Interferon, gamma / Interferon gama</p> <p>Local: Cromossomo 12</p> <p>Categoria: Citocinas inflamatórias e quimiocinas</p> <p>Função: Codifica membro tipo 2 da família de interferon. É uma citocina antiviral, imunomoduladora, possui atividade antitumoral e é um potente ativador de macrófagos.</p> <p>Sinônimos: IFG; IFI</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458</p>
IL6	<p>Descrição: interleukin 6 / Interleucina 6</p> <p>Local: Cromossomo 6</p> <p>Categoria: Citocinas inflamatórias e quimiocinas</p> <p>Função: Gene que codifica a citocina interleucina 6, presente no processo inflamatório e maturação de células B. É uma proteína pirogênica capaz de induzir a febre em pessoas com doença auto-imunes ou com infecção. É produzida geralmente em locais de inflamação aguda e crônica. Está relacionada a diversas doenças relacionadas a inflamação, como diabetes melito e artrite reumatoide sistêmica juvenil.</p> <p>Sinônimos: HGF; HSF; BSF2; IL-6; IFNB2</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569</p>
IL6ST	<p>Descrição: interleukin 6 signal transducer / Interleucina 6 transdutora de sinal</p> <p>Local: Cromossomo 5</p> <p>Categoria: Transdução de sinal</p> <p>Função: Codifica proteína transdutora de sinal distribuída por diversas citocinas, incluindo IL-6, fator neurotrófico ciliar (CNTF), factor inibidor de leucemia (LIF) e oncostatina M (OSM). Esta proteína funciona como parte do complexo do receptor de citocina. A ativação desta proteína é dependente da ligação de citocinas aos seus receptores.</p> <p>Sinônimos: CD130; GP130; CDW130; IL-6RB</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3572</p>

IL10	<p>Descrição: interleukin 10 / Interleucina-10 Local: Cromossomo 1 Categoria: Citocinas inflamatórias e quimiocinas Função: Codifica citocina produzida primariamente por monócitos e tardiamente por linfócitos. Tem efeitos pleiotrópicos (múltiplas funções) na imunomodulação e inflamação. Promove hiporregulação de linfócitos Th1, MHC-II e moléculas co-estimulantes de macrófagos. Aumenta a sobrevivência e proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos. Essa citocina pode bloquear a atividade de NFkappaB, envolvido na regulação da via de sinalização de JAK-STAT. Sinônimos: CSIF; TGIF; GVHDS; IL-10; IL10A Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586</p>
ITGA3	<p>Descrição: integrin, alpha 3 Local: cromossomo 17 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Proteína que pertence à família das integrinas, que são heterodímeras compostas por cadeia alfa e beta e funcionam como moléculas de adesão celular. Este gene codifica a cadeia 3 alfa e interage com várias proteínas da matriz extracelular. Sinônimos: VL3A; CD49C; GAPB3; ILNEB; MSK18; VCA-2; VLA3a; GAP-B3 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3675</p>
ITGA5	<p>Descrição: integrin, alpha 5 / Integrina alfa 5 Local: Cromossomo 12 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica cadeia 5 alfa da integrina. É uma proteína de membrana heterodímera que se une com beta-1 para formar um receptor de fibronectina. Sinônimos: FNRA; CD49e; VLA-5; VLA5A Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3678</p>
ITGAV	<p>Descrição: integrin, alpha V / integrina alfa V Local: Cromossomo 2 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica integrina alpha 5. Esta proteína combina-se com várias cadeias beta da integrina para formar diferentes integrinas. Forma heterodímeros com beta-1, beta-3, beta 5, beta 6 e beta 8. O heterodímero de alfa 5 e beta 3 é o receptor de vitronectina, uma proteína que interage com várias proteínas da matriz extracelular para mediar a adesão de células e pode desempenhar um papel na migração celular. Esta proteína pode regular a angiogênese e a progressão de câncer. Sinônimos: CD51; MSK8; VNRA; VTNR Fonte: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3685</p>

ITGB1	<p>Descrição: integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) / Integrina beta 1</p> <p>Local: Cromossomo 10</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Membros da família das integrinas são receptores de membrana envolvidos na adesão celular e no reconhecimento de vários processos, incluindo embriogênese, hemostasia, a reparação de tecidos, a resposta imune e difusão metastática de células tumorais. Este gene codifica uma subunidade beta.</p> <p>Sinônimos: CD29; FNRB; MDF2; VLAB; GPIIA; MSK12; VLA-BETA</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3688</p>
ITGB5	<p>Descrição: integrin, beta 5 / integrina beta 5</p> <p>Local: Cromossomo 3</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Codifica a integrina 5, que está envolvida com a via de sinalização PI3K-Akt (fosfatidilinositol-3-cinase envolvida na sinalização Akt (ou PKB), via esta que controla a proliferação celular), que diminui proliferação celular e induz um sinal de sobrevivência para a proteção contra a apoptose. Um parálogo importante deste gene é ITGB4.</p> <p>Sinônimos: não há</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3693, http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ITGB5&keywords=itgb5 e Balista PA. Inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e neuroproteção mediada pela cascata de sinalização de akt na fase aguda do modelo de pilocarpina [dissertação]. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2010. 100p.</p>
MAPK1	<p>Descrição: mitogen-activated protein kinase 1/ MAP-quinase 1</p> <p>Local: Cromossomo 22</p> <p>Categoria: Transdução de sinal</p> <p>Função: Codifica o membro 1 da família da MAP-quinase. Esta família é regulada por sinais da matriz extracelular, integrando múltiplos sinais para a sinalização celular como proliferação, diferenciação, maturação e regulação de transcrição. Esta quinase após ser ativada transloca-se para o núcleo e fosforila alvos nucleares.</p> <p>Sinônimos: ERK</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5594</p>

MIF	<p>Descrição: macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) / Fator inibidor da migração de macrófagos</p> <p>Local: cromossomo 22</p> <p>Categoria: Fatores de crescimento</p> <p>Função: Codifica linfocina envolvida na imunidade celular, imunorregulação e inflamação. Possui importante função de regulação de macrófagos na defesa contra a a supressão dos efeitos anti-inflamatorios de glicocorticoides. Essa linfocina complexa-se com a proteína JAB-1 no citosol celular perto da membrana plasmática, que pode indicar uma função adicional na via de sinalização das integrinas.</p> <p>Sinônimos: GIF; GLIF; MMIF</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=mif</p>
MMP1	<p>Descrição: matrix metalloproteinase 1 / Metaloproteinase de matriz 1</p> <p>Local: cromossomo 11</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: as proteínas da família mataloproteinase de matriz (MMP) estão envolvidas com a degradação da matriz extracelular, um processo fisiológico natural relacionado com remodelação tecidual e processos patológicos como artrite e metástase. A maioria das MMPs são secretadas de forma inativa e só são ativadas quando clivadas por proteinases extracelular.</p> <p>Sinônimos: CLG; CLGN</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4312</p>
MMP2	<p>Descrição: matrix metalloproteinase 2 / Metaloproteinase de matriz 2</p> <p>Local: Cromossomo 16</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Gene que codifica uma proteína membro da família MMP, que são dependentes de zinco e são capazes de clivar componentes da matriz extracelular e moléculas envolvidas na transdução de sinal. É uma colagenase do tipo 4 que contém 3 fibronectinas tipo 2 no local catalítico e permite a ligação de colágeno tipo 4, tipo 5 e elastinas desnaturados.</p> <p>Sinônimos: CLG4; MONA; CLG4A; MMP-2; TBE-1; MMP-II</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4313</p>
PDGFA	<p>Descrição: platelet-derived growth factor alpha polypeptide / fator de crescimento derivado de plaquetas alfa</p> <p>Local: Cromossomo 7</p> <p>Categoria: Fatores de crescimento</p> <p>Função: Codifica um membro da família do fator de crescimento derivado de plaquetas. Os quatro membros dessa família são mitogênicos para células de origem mesenquimal e são caracterizadas por 8 cisteínas. Podem formar homodímeros ou heterodímeros com o PDGF beta.</p> <p>Sinônimos: PDGF1; PDGF-A</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5154</p>

PLAU	<p>Descrição: plasminogen activator, uroquinase / Ativador de plasminogênio uroquinase (uPA) Local: Cromossomo 10 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: Codifica a protease serina envolvida na degradação da matriz extracelular e do plasma, além de possibilitar a migração e proliferação de células tumorais. Esta proteína converte plasminogênio em plasmina por clivar a ligação peptídica Arg-Val no plasminogênio Sinônimos: ATF; QPD; UPA; URK; uPA; BDPLT5 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5328</p>
PTEN	<p>Descrição: phosphatase and tensin homolog / fosfatase homóloga à tensina Local: Cromossomo 10 Categoria: Transdução de sinal Função: Gene supressor de tumor que em diversos tipo de câncer aparece com mutação. Codifica a proteína fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase que se assemelha à tensina, bem como atividade catalítica semelhante à tirosina fosfatase (dupla função fosforilação/desfosforilação), que geralmente desfosforila fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato nas células e possui função supressora de tumor, regulando negativamente a via de sinalização AKT (ou também conhecida por PKB), que controla a proliferação celular, diminuindo proliferação celular e induz um sinal de sobrevivência para a proteção contra a apoptose. Sinônimos: BZS; DEC; CWS1; GLM2; MHAM; TEP1; MMAC1; PTEN1; 10q23del Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728</p>
RAC1	<p>Descrição: ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) / C3 relacionados toxina botulínica substrato 1 Local: Cromossomo 7 Categoria: Matriz extracelular e células de adesão Função: A proteína codificada por este gene é uma GTPase que pertence à superfamília RAS (oncogene) de pequenas proteínas GTP ligantes. Os membros desta superfamília parecem regular uma diversos eventos celulares, incluindo o controle do crescimento celular, a reorganização do citoesqueleto e a ativação de proteínas cinases. Duas isoformas foram encontradas para este gene. Sinônimos: MIG5; Rac-1; TC-25; p21-Rac1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5879</p>

RHOA	<p>Descrição: ras homolog family member A / Membro A homólogo da família RAS</p> <p>Local: Cromossomo 3</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Regula uma via de transdução de sinal que liga receptores de membrana plasmática para a montagem de adesões focais e fibras de stress de actina. Está envolvida na sinalização necessária para a formação do anel contrátil de miosina durante a citocinese (movimento) no ciclo celular. É fundamental para a adesão entre os queratinócitos. Essencial para a regulação na migração celular e montagem e desmontagem de adesão. Regula a atividade do canal de potássio e promove endocitose.</p> <p>Sinônimos: ARHA; ARH12; RHO12; RHOH12</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/387 e http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RHOA&keywords=rhoa</p>
SERPINE 1	<p>Descrição: serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1</p> <p>Local: Cromossomo 3</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Codifica a neuroserpina 1, que é uma protease inibidora de serina (que degrada a matriz extracelular), bloqueando algumas reações bioquímicas. Inibe o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), este que é transcrito pelo gene PLAU.</p> <p>Sinônimos: PLANH1, PAI1</p> <p>Fonte: http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SERPINI1 e http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERPINE1&keywords=serpine,1</p>
TAGLN	<p>Descrição: transgelin /</p> <p>Local: Cromossomo 11</p> <p>Categoria: Matriz extracelular e células de adesão</p> <p>Função: Seu papel não está claro. A proteína codificada é sensível a transformações e mudanças estruturais na actina encontrada nos fibroblastos e músculo liso. Sua hiporregulação é um sinal precoce para o início da transformação</p> <p>Sinônimos: SM22; SMCC; TAGLN1; WS3-10</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6876</p>
TGFB1	<p>Descrição: transforming growth factor, beta 1 / Fator de transcrição transformante beta 1</p> <p>Local: Cromossomo 19</p> <p>Categoria: Fatores de crescimento</p> <p>Função: Codifica um membro da família do fator de crescimento transformante beta e está envolvido com proliferação, diferenciação, adesão, migração e outras funções celulares. Vários tipos celulares tem receptor para essa proteína. Este fator de crescimento pode hiporregular ou hiper-regula outros fatores de crescimento.</p> <p>Sinônimos: CED; LAP; DPD1; TGFB; TGFbeta</p> <p>Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7040</p>

TIMP1	<p>Descrição: TIMP metallopeptidase inibitor 1 / Inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1 Local: Cromossomo X Categoria: Função: Proteína inibidora de metaloproteinases de matriz (MMPs), que degradam a matriz extracelular. Também é capaz de promover a proliferação de vários tipos celulares e possui atividade antiapoptótica. Sinônimos: EPA; EPO; HCI; CLGI; TIMP Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7076</p>
VEGFA	<p>Descrição: vascular endothelial growth factor A / Fator de crescimento do endotélio vascular Local: Cromossomo 6 Categoria: Fatores de crescimento Função: Membro da família do fator de crescimento do endotélio vascular. Codifica um homodímero glicosilado mitogênico e tem como função aumentar a permeabilidade vascular, angiogênese, vasculogênese, promove migração celular e inibe apoptose. Sinônimos: VPF; VEGF; MVCD1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422</p>
WISP1	<p>Descrição: WNT1 inducible signaling pathway protein 1 / proteína indutora da via de sinalização WNT1 Local: Cromossomo 8 Categoria: Transdução de sinal Função: Codifica uma proteína indutora da via de sinalização WNT1 pertencente à família do fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF). É normalmente expressa por fibroblastos e, em tumores de cólon, estão hiperreguladas. Sinônimos: CCN4; WISP1c; WISP1i; WISP1tc Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8840</p>

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA CICATRIZAÇÃO EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DE PACIENTES QUEIMADOS

Pesquisador: ALFREDO GRAGNANI FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11873413.1.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 197.342

Data da Relatoria: 08/02/2013

Apresentação do Projeto:

A lesão por queimadura é um evento traumático, geralmente de origem térmica, que atinge a pele e vários órgãos, promovendo respostas locais e sistêmicas no organismo. A morbidade e a mortalidade das queimaduras estão relacionadas com a extensão da superfície corporal atingida e a profundidade das queimaduras na pele. Métodos para melhorar a cicatrização de feridas e reparo dos tecidos, ou mesmo intervenções terapêuticas que atenuem a resposta inflamatória aguda, podem oferecer oportunidades de reduzir a taxa de mortalidade e melhorar a qualidade de vida de pacientes, além de contribuir na redução de custos em cuidados com a saúde. Uma melhor compreensão do valor terapêutico dos fatores de crescimento (FC) pode ser essencial para aprimorar a terapia em queimados. Os FC pertencem a uma classe de citocinas que atuam no reparo e cicatrização tecidual e, em especial, em queimaduras. Modulam a proliferação, migração e aumento da atividade metabólica das células. O fator de crescimento de queratinócitos (KGF), ou FGF-7, parece ter um papel único como um mediador na interação mesenquimal-epitelial. O KGF é produzido por fibroblasto e atua em queratinócito, por sinalização parácrina. Vários estudos demonstram sua importância na cicatrização de feridas, uma vez que o KGF está relacionado à melhora na cicatrização, à diminuição do processo inflamatório agudo e ao fechamento da ferida de modo acelerado. Ainda, estudos demonstram que a expressão gênica do KGF é aumentada, em fibroblastos, após lesão

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 **Fax:** (11)5571-1062 **E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

cutânea. Sabendo-se que a expressão gênica pode ser analisada através do método PCR array, procuramos, no presente estudo, avaliar a ação do KGF na expressão gênica de 84 genes mediadores da cicatrização através do método PCR Array, em cultura de fibroblastos dérmicos humanos primários oriundos de pacientes com queimadura. O presente estudo visa possibilitar a evolução das intervenções clínicas aplicadas a tais casos, diminuindo as taxas de morbimortalidade do grupo.

METODOLOGIA: Serão incluídos oito pacientes, divididos em três grupos: três pacientes no grupo grande queimado, três pacientes no grupo pequeno queimado e dois no grupo controle, internados na Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) localizada no Hospital Universitário - Hospital São Paulo. A fase experimental, *in vitro*, será realizada no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica. Para cada paciente, 84 genes envolvidos na cicatrização serão avaliados. A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas serão realizadas em um ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando a metodologia Taqman fluorescente (TaqMan One Step RT-PCR Master Mix Reagentes, Biosystems Aplicada).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente estudo é avaliar a ação do KGF na expressão gênica de 84 genes mediadores da cicatrização através de PCR Array em cultura de fibroblastos dérmicos humanos primários oriundos de pacientes com queimadura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem risco, estudo *in vitro* de células de doadores vítimas de queimadura para procedimento laboratorial molecular (expressão gênica)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O delineamento do presente estudo é de pesquisa experimental, *in vitro*, de células de doadores vítimas de queimadura, sendo observacional, analítico, controlado, realizado em centro único.

Espera-se que exista alteração da expressão gênica de KGF em fibroblastos dérmicos primários dos pacientes queimados, com relação direta na melhora no processo de cicatrização, na diminuição do processo inflamatório agudo e no fechamento da ferida da ferida. Sabe-se que a expressão gênica do KGF é aumentada, em fibroblastos, após lesão cutânea. Entretanto, como a cicatrização pós-queimadura é diferente da cicatrização de feridas comuns, se o resultado for positivo, poderão ser desenvolvidas intervenções terapêuticas e métodos para melhorar a cicatrização de feridas e reparo dos tecidos, oferecendo oportunidades de redução na taxa de morbi-mortalidade e melhora na qualidade de vida dos pacientes queimados, além de contribuir na redução de custos em cuidados com a saúde.

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados (folha de rosto assinada e datada pelo responsável da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp) e TCLEs para grupo estudo e controle.

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acata o parecer do relator.

SAO PAULO, 15 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5539-7162 Fax: (11)5571-1062 E-mail: cepunifesp@unifesp.br

FONTES CONSULTADAS

Gragnani Filho, A. Cultura de células e queimaduras [livre docência]. [São Paulo]: Universidade Federal de São Paulo; 2013. 101p.

Lima JR, Serra MCVF. Tratado de queimaduras. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 2004. 656p.