

JESSICA BONUCCI

**VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO
EM FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM
QUEIMADURA**

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

SÃO PAULO

2016

JESSICA BONUCCI

**VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM
QUEIMADURA**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. SILVANA A. ALVES CORREA

SÃO PAULO

2016

Bonucci, Jessica.

Vitamina C na expressão gênica de marcadores de estresse oxidativo em fibroblastos cultivados de pacientes com queimadura./ Jessica Bonucci. -- São Paulo, 2016.

xiv, 80f.

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

Título em inglês: Vitamin C on oxidative stress gene expression of fibroblasts from burned patients.

1. Queimaduras; 2. Expressão gênica; 3. Estresse oxidativo; 4. Ácido ascórbico; 5. Fibroblastos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À minha família, que é a minha base. Em especial aos meus pais **EDSON** e **ALRENE** por todo amor e carinho que nunca me faltaram. Pelo o que batalharam por mim, por toda a educação que me deram, por sempre estarem por perto orientando, apoiando e incentivando todas as minhas decisões. Vocês são meus exemplos. Minhas conquistas também são de vocês.

Ao meu namorado **LUÍS PAULO** pela compreensão, companheirismo, amizade e amor. Pela história que contruímos até agora e por todos os sonhos que ainda vamos conquistar.

Aos meus **AMIGOS** pela amizade, pelas risadas, pelos abraços e por sempre estarem presentes. Fizeram parte de muitos anos da minha vida e farão de muitos que ainda estão por vir. Posso não ter muitos amigos, mas os que eu tenho são os melhores que alguém poderia ter.

A todas as pessoas, que ao longo do tempo passam pela nossa vida e deixam uma marca, um aprendizado, uma lição e a todas que ainda passarão para deixar novos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

À **PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA**,
PROFESSORA TITULAR da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), pela contribuição e importância na pesquisa.

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 dedicação com o Programa.

Ao **PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO**,
PROFESSOR ADJUNTO da Disciplina de Cirurgia Plástica e VICE CHEFE da Disciplina de Cirurgia Plástica da EPM/UNIFESP, orientador do presente estudo, por toda a contribuição no meu aprendizado e crescimento profissional. Pela atenção, dedicação, orientação e pelo exemplo como um grande profissional.

À **PROFESSORA SILVANA APARECIDA ALVES CORREA**,
COORIENTADORA desse estudo, e aos 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 todo o ensinamento que foi essencial para este estudo.

À toda equipe multiprofissional da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, em especial à **Dra. ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA** pela dedicação e respeito aos pacientes vítimas de queimadura.

Aos **PACIENTES**, que participaram desse estudo, contribuindo para a evolução do conhecimento e tratamento da queimadura e suas comorbidades.

Ao Grupo de Pesquisa do Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica, aos alunos de mestrado, doutorado e de iniciação científica, por toda a

troca de conhecimento e contribuição pela evolução do grupo. Em especial à **VERÔNICA** e **MARIA CLÁUDIA**, por toda parceria, ajuda e conselhos em todos os momentos.

Aos colegas do Curso de Aperfeiçoamento em Pesquisa Científica e do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP-EPM, por contribuírem para o início do desenvolvimento de cada ideia, enriquecendo nossos projetos com dúvidas e sugestões construtivas.

À **SANDRA DA SILVA**, **MARTA REJANE** e **SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, por sempre estarem disponíveis e pela grande atenção que sempre dispensaram a mim.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria ”.

(Khalil Gibran)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
A GRADECIMENTOS.....	v
EPÍGRAFE.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA.....	xii
RESUMO.....	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO	8
3- LITERATURA.....	10
4- MÉTODOS.....	17
5- RESULTADOS.....	28
6- DISCUSSÃO.....	47
7- CONCLUSÃO.....	57
8- REFERÊNCIAS.....	59
NORMAS ADOTADAS.....	66
<i>ABSTRACT</i>	67
APÊNDICES.....	68
ANEXOS.....	76
FONTES CONSULTADAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantificação de RNA total por meio de Nanovue® (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA).	23
Figura 2. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 1 entre GC+ versus GC-.....	32
Figura 3. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 1 entre GC+ versus GC-.....	33
Figura 4. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 2 entre GQ- versus GC-.....	34
Figura 5. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 2 entre GQ- versus GC-.....	34
Figura 6. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.....	37
Figura 7. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.....	37
Figura 8. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ- versus GC+.....	38
Figura 9. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ- versus GC+.....	39
Figura 10. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.....	41
Figura 11. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.....	42
Figura 12. <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ+ versus GQ-.....	45
Figura 13. <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ+ versus GQ-.....	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. <i>Human Wound Healing PCR Array</i> (Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores do estresse oxidativo.....	25
--	----

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.....29
- Tabela 2.** Número de genes diferencialmente expressos da expressão gênica relativa dos grupos Queimadura e Controle, na presença ou ausência de Vitamina C, sendo que em cada comparação o segundo grupo é sempre o grupo de referência.....29
- Tabela 3.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes das comparações efetuadas que possuem GQ como grupo experimental.....30
- Tabela 4.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 1 entre o GC+ *versus* GC-.....33
- Tabela 5.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 2 entre o GQ- *versus* GC-.....35
- Tabela 6.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 3 entre o GQ+ *versus* GC-.....38
- Tabela 7.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 4 entre o GQ- *versus* GC+.....39
- Tabela 8.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 5 entre o GQ+ *versus* GC+.....43
- Tabela 9.** Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 6 entre o GQ+ *versus* GQ-.....46

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

LISTA DE ABREVIATURAS

ALOX12	<i>arachidonate 12-lipoxygenase, 12S</i>
ALT	alanine aminotransferase
AMPK- α	<i>AMP-activated protein kinase-α</i>
AOX1	<i>aldehyde oxidase 1</i>
APOE	<i>apolipoprotein E</i>
AR	aldose reductase
AST	aspartate aminotransferase
ATOX1	<i>antioxidant 1 copper chaperone</i>
ATP	trifosfato de adenosina
BNIP3	<i>BCL2 interacting protein 3</i>
CAT	Catalase
CCS	<i>copper chaperone for superoxide dismutase</i>
CD14	grupo de diferenciação-14 (do inglês <i>cluster of differentiation</i> -14)
cDNA	DNA complementar
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>)
Cp	<i>crossing point</i>
Cq	<i>quantification cycle</i>
C _T	<i>cycle threshold</i>
CO ₂	gás carbônico
COX-1	<i>cytochrome c oxidase subunit 1</i>
COX-2	<i>cytochrome c oxidase subunit 2</i>
CYBB	<i>cytochrome b-245 beta chain</i>
CYGB	<i>Cytoglobin</i>
DCP	Disciplina de Cirurgia Plástica.
DMEM	<i>meio eagle modificado por dulbecco (do inglês Dulbecco's modified Eagle's médium).</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico.
DHCR24	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>
DUOX1	<i>dual oxidase 1</i>
DUOX2	<i>dual oxidase 2</i>
DUSP1	<i>dual specificity phosphatase 1</i>
EGR-1	<i>early growth response protein 1</i>

EPHX2	<i>epoxide hydrolase 2</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
ETR101	proteína de resposta imediata 101 (do inglês <i>immediate early protein</i>), sinônimo: ier101.
<i>et al.</i>	e colaboradores.
EPX	<i>eosinophil peroxidase</i>
FAD	flavina-adenina-dinucleótido
FBS	soro fetal bovino
FOXM1	<i>forkhead box M1</i>
FTH1	<i>ferritin heavy chain 1</i>
GCLC	<i>glutamate-cysteine ligase catalytic subunit</i>
GCLM	<i>glutamate-cysteine ligase modifier subunit</i>
GC	grupo controle
GC-	grupo controle sem Vitamina C
GC+	grupo controle com Vitamina C
GQ	grupo queimadura
GQ-	grupo queimadura sem Vitamina C
GQ+	grupo queimadura com Vitamina C
GPX	<i>glutathione peroxidase</i>
GPX1	<i>glutathione peroxidase 1</i>
GPX2	<i>glutathione peroxidase 2</i>
GPX3	<i>glutathione peroxidase 3</i>
GPX5	<i>glutathione peroxidase 5</i>
GPX6	<i>glutathione peroxidase 6</i>
GPX7	<i>glutathione peroxidase 7</i>
GR	<i>glutathione reductase</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
GSR	<i>glutathione-disulfide reductase</i>
GSS	<i>glutathione synthetase</i>
GTF2I	<i>general transcription factor III</i>
GTP	RhoGTPase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HSP	Hospital São Paulo
IC	complexo I
IL-1 α	interleucina-1 α
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-4	interleucina-4
IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IL13	interleucina-13
HU	Hopital Universitário
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
KO	<i>Knockout</i>

KRT1	<i>keratin 1</i>
LCT	Laboratorio de Cirurgia Translacional
LPO	lactoperoxidase
MBL2	<i>mannose binding lectin 2</i>
MGST3	<i>microsomal glutathione S-transferase 3</i>
MiRNA	micro RNA
MPV17	<i>mitochondrial inner membrane</i>
MSRA	<i>methionine sulfoxide reductase A</i>
MT3	<i>metallothionein 3</i>
NAC	n-Acetilcisteína
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NCF1	<i>neutrophil cytosolic factor 1</i>
NCF2	<i>neutrophil cytosolic factor 2</i>
NOS2	<i>nitric oxide synthase 2</i>
NOX4	NADPH oxidase 4
NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding
NQO1	NADPH quinone dehydrogenase 1
NUDT1	<i>nudix hydrolase 1</i>
O ₂	oxigênio
OH	radical hidroxila
OXR1	<i>oxidation resistance 1</i>
OXS1	<i>oxidative stress responsive 1</i>
PBS	tampão fosfato salino (do inglês <i>buffer phosphate-saline</i>)
PCR	reação em cadeia de polimerase
PDLIM1	<i>PDZ and LIM domain 1</i>
PNKP	<i>polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
PRDX1	<i>peroxiredoxin 1</i>
PRDX2	<i>peroxiredoxin 2</i>
PRDX3	<i>peroxiredoxin 3</i>
PRDX4	<i>peroxiredoxin 4</i>
PRDX5	<i>peroxiredoxin 5</i>
PRDX6	<i>peroxiredoxin 6</i>
PREX1	<i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1</i>
PRNP	<i>prion protein</i>
PTGS1	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 1</i>
qPCR Array	reação em cadeia de polimerase em tempo real quantitativa
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNF7	<i>ring finger protein 7</i>
ROS	espécies reativas de oxigênio
SCARA3	<i>scavenger receptor class A member 3</i>
SCQ	superfície corporal queimada
SEPP1	<i>selenoprotein P, plasma, 1</i>

SFTPD	<i>surfactant protein D</i>
SIRT2	<i>sirtuin 2</i>
SOD	<i>superoxide dismutase</i>
SOD1	<i>superoxide dismutase 1</i>
SOD2	<i>superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>
SOD3	<i>superoxide dismutase 3, extracellular</i>
SQSTM1	<i>sequestosome 1</i>
SRXN1	<i>sulfiredoxin 1</i>
STK25	<i>serine/threonine kinase 25</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	fator de necrose tumoral.
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa.
TPO	<i>thyroid peroxidase</i>
TTN	<i>Titin</i>
TXNRD1	<i>thioredoxin reductase 1</i>
TXNRD2	<i>thioredoxin reductase 2</i>
UCP2	<i>uncoupling protein 2</i>
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UTQ	Unidade de Tratamento de Queimaduras
VIMP	<i>VCP interacting membrane selenoprotein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

-	menos.
%	por cento.
<	menor.
>	maior.
°C	graus Celsius.
μg	micrograma.
$\mu\text{g/mL}$	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.
ng/mL	nanograma por mililitro.

valor-p	nível descritivo do teste.
u/mL	unidade por mililitro.
rpm	rotações por minuto.
Δ cq	variação da quantificação do ciclo.
TOP	Ponto de partida (do inglês <i>take-off point</i>).

RESUMO

Introdução: A queimadura é um trauma complexo e de difícil tratamento, com graves repercussões sociais econômicas e de saúde pública. Está entre as principais causas de morbidade e mortalidade. A lesão térmica medeia uma resposta sistêmica comum, independente do local ou extensão da lesão, e também respostas específicas ao trauma local e distante. Genes relacionados ao estresse oxidativo estiveram expressos diferencialmente nos grupos de pacientes com queimadura. Além disso, reduções significativas na concentração de vitamina C têm sido relatados em pacientes com grandes queimaduras. Vários estudos demonstram a importância da Vitamina C em vítimas de grandes traumas, como por exemplo os queimados. **Objetivo:** Avaliar a ação da vitamina C na expressão de 84 genes relacionados com o estresse oxidativo em fibroblastos cultivados da pele de pacientes com queimadura. **Métodos:** Foram obtidos fragmentos de pele de dez pacientes queimados (grupo queimadura) e oito pacientes hígidos (grupo controle). Foi realizada a cultura de fibroblastos humanos primários através do método explante e distribuídos em 4 grupos: GQ+ (n = 10 – fibroblastos de queimadura tratados com Vitamina C), GQ- (n = 10 – fibroblastos de queimadura sem tratamento), GC+ (n = 8 – fibroblastos de controle tratados com Vitamina C) e GC- (n = 8 – fibroblastos de 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 GC+, 5) GQ+ versus GC+ e 6) GQ+ versus GQ-. **Resultados:** As comparações 1 e 3 não apresentaram nenhum gene alterado. As comparações 2 e 4 apresentaram os mesmos sessenta e cinco genes hiporregulados. A comparação 5 apresentou setenta e um genes hiporregulados, destes 64 iguais às comparações 2 e 4. E a comparação 6 apresentou 10 genes hiperregulados. **Conclusão:** A suplementação de Vitamina C à cultura de fibroblastos de pacientes com queimadura mostrou 10 genes diferencialmente alterados, todos hiperexpressos, sendo os de maior interesse, DUOX1, GPX5, GPX2 e PTGS1.

Palavras-chave: 1. Queimadura; 2. Expressão gênica; 3. Estresse Oxidativo; 4. Vitamina C; 5. Fibroblastos.

1. INTRODUÇÃO

Queimadura é um grave problema de saúde pública para todo o mundo. Ocorrem por ano, mais de 300.000 mortes causadas por acidentes com fogo, sem considerar as queimaduras por escaldamento, elétricas, químicas e outras formas que não têm suas estatísticas disponíveis em níveis globais (MOCK *et al.*, 2009). Além disso, milhões de casos ocorrem resultando em deficiências permanentes e problemas estéticos, que frequentemente causam rejeição social e transtornos depressivos (GRAGNANI *et al.* 2010)

Os traumas por queimadura são responsáveis por sequelas muitas vezes irreparáveis e até a morte. A quebra da integridade da pele leva a uma diminuição da temperatura corporal e com isso, um aumento do consumo energético. As consequências das queimaduras levam a deficiência no potencial imune, o que pode resultar em infecções secundárias. Isto, por causa do desarranjo da resposta imunológica tanto pelos fatores específicos, mediadores celulares e humorais, como pelos não específicos, leucócitos e macrófagos (SPANHOLTZ *et al.*, 2009).

A resposta metabólica do grande queimado é imediata e pode persistir por pelo menos 5 semanas. Este estado hipermetabólico é caracterizado por um aumento da temperatura corporal, aumento do consumo de oxigênio e glicose, aumento na produção de CO₂, aumento da proteólise, aumento da glicogenólise e aumento da lipólise. Após o trauma por queimadura, os mediadores da inflamação liberados no local das feridas associado à fase de hidratação determinam a formação de um grande edema (JESCHKE *et al.*, 2007). Na queimadura esse processo inflamatório inicial intenso é local, em uma pequena área queimada, esse edema circunscreve-se ao local da ferida, já nos grandes queimados, os mediadores inflamatórios são produzidos em quantidades extremas, o que resulta em uma resposta sistêmica, com intenso edema em todos os tecidos do organismo (PADFIELD *et al.*, 2006).

Esta inflamação é um fator importante para promover a cicatrização das feridas causadas pelas lesões térmicas. Os efeitos benéficos da inflamação local incluem limpeza de restos celulares e proteção contra agentes microbianos, além do crescimento e proliferação celular. Porém, o prolongamento do processo inflamatório agudo dificulta a cicatrização na medida em que o nível elevado de citocinas promove a degradação de colágeno, apoptose de células dérmicas, comprometimento vascular e produção de radicais livres de oxigênio (SHUPP *et al.*, 2010).

Os radicais livres são produzidos constantemente durante o funcionamento normal das nossas células, em sua maioria sob a forma de espécies reativas de oxigênio (EROs). A isquemia seguida consecutivamente de reperfusão causada pela queimadura gera um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante em favor da geração excessiva de radicais livres, conhecido como estresse oxidativo (CARDEN & GRANGER, 2000). A progressão da lesão causada pela reperfusão pós-isquemia resulta em adesão e ativação de neutrófilos, liberação de citocinas pró-inflamatórias, bem como a formação de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (CUZZOCREA *et al.*, 1997). Estudos em diversos organismos e sistemas celulares identificaram o envolvimento comum de espécies reativas de oxigênio como mediadores da resposta inflamatória inicial à cicatrização (HRISTOVA *et al.*, 2014).

A nível molecular, a liberação de histamina no sítio da queimadura, leva a ativação do sistema complemento com ativação das células inflamatórias. A atividade aumentada de histamina, reforçada pelas propriedades catalíticas da xantina oxidase, provoca progressivos aumentos locais na permeabilidade vascular que se segue nas 24 horas seguintes, acometendo toda área corporal, inclusive, a área não queimada. Subprodutos tóxicos da xantina oxidase, incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH) parecem danificar diretamente estruturas dérmicas (WARD & TILL, 1990).

A resposta inicial à queimadura é frequentemente associada com danos secundários a outros tecidos distantes da pele e da lesão inalatória que pode estar associada (TILL *et al.*, 1983; TILL *et al.*, 1985; CETINKALE, SENEL, BULAN, 1999; GURBUZ *et al.*, 1997). Esta resposta parece ser mediada por EROs e neutrófilos ativados (HERNANDEZ *et al.*, 1987; SIMPSON *et al.*, 1993).

A produção de EROs e ERNs em queimaduras pode ter implicações nas respostas mecânica, patológica e de sinalização celular em órgãos afetados, causando danos às células do sistema imunológico, atacando componentes celulares e prejudicando proteínas, lipídeos e DNA (PARIHAR *et al.*, 2008).

Muitos tipos de EROs são formados no corpo. Os EROs mais comuns são: o ânion superóxido, o radical hidroxila (OH), o oxigênio diatômico e o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2). O ânion superóxido, produto da redução de um elétron do O_2 , é o precursor de muitas EROs e um mediador das reações em cadeia da oxidação. O radical hidroxila é o mais prejudicial, porém tem curta duração. O peróxido de hidrogênio é produzido *in vivo* por muitas reações e pode ser convertido para o radical hidroxila que é altamente prejudicial (PARIHAR *et al.*, 2008).

Em queimaduras, uma das substâncias mais nocivas produzidas são os peróxidos lipídicos (HOSNUTER *et al.*, 2004). As membranas celulares são ricas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, que são os alvos de ataque preferidos dos radicais livres, provocando lesão tecidual quando sofrem peroxidação. Uma associação intensa foi demonstrada entre a quantidade de peroxidação de lípidos e o grau de complicações em queimadura, tais como danos de órgãos e choque (SAEZ *et al.*, 1984; PALLAST *et al.*, 2009).

Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelos radicais livres envolvem: (i) mecanismos de prevenção, (ii) mecanismos de reparação, (iii) as defesas físicas e (iv) defesas antioxidantes. Defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Antioxidantes não enzimáticos são representados por ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenóides, flavonóides, e outros antioxidantes (VALKO *et al.*, 2007). A glutatona peroxidase é essencial para a conversão de glutatona em glutatona oxidada, quando o H_2O_2 é convertido em água (PARIHAR *et al.*, 2008).

A vitamina C é um micronutriente solúvel em água, necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno (DARR, COMBS, PINNELL, 1993), e é um importante antioxidante no plasma humano, eliminando radicais livres e protegendo contra a peroxidação lipídica (FREI, STOCKER, AMES, 1988).

Um estudo demonstrou que durante os primeiros 5 dias após a lesão, pacientes queimados apresentam uma diminuição de selênio e das vitaminas antioxidantes (C, beta-caroteno, licopeno) e um aumento nos produtos de peroxidação lipídica (BERTINMAGHIT *et al.*, 2000).

Níveis plasmáticos reduzidos de vitamina C foram constatados em pacientes queimados que desenvolveram insuficiência múltipla de órgãos, em comparação com níveis mais elevados em pacientes que não desenvolveram falência múltipla de órgãos (BORRELLI *et al.*, 1996).

O tratamento pós-queimadura com antioxidantes convencionais, tais como a vitamina C, glutathione, e n-Acetilcisteína (NAC), demonstrou restaurar as defesas antioxidantes e atenuar a lesão tecidual (NGUYEN *et al.*, 1993; LALONDE *et al.*, 1997). Níveis elevados de vitamina C administrada em bolus (66 mg/kg) seguida por infusão (33 mg/kg/h) em um modelo experimental de rato foi eficaz em aliviar o edema pós-queimadura (TANAKA *et al.*, 1999).

Os estudos atuais de eficiência de diferentes antioxidantes para neutralizar os efeitos tóxicos dos radicais livres encontram-se numa fase embrionária. Não há consenso definitivo sobre os tipos e doses de antioxidantes que devem ser usados para tratar queimaduras. Terapias eficazes futuras para os casos de queimadura podem incluir a utilização de uma combinação de substâncias anti-inflamatórias, com combinações de antioxidantes poderosos a fim de reduzir a inflamação e ao mesmo tempo neutralizar a geração de oxidantes tóxicos nos órgãos afetados (PARIHAR *et al.*, 2008).

Por muito tempo os fibroblastos foram considerados os principais secretores de fatores insolúveis da matriz extracelular, mas posteriormente ficou claro que também fabricavam fatores solúveis como fatores de crescimento e citocinas que influenciam nas interações célula-célula e célula-matriz (KESSLER-BECKER, KRIEG, ECKES, 2004). A liberação de fatores de crescimento pode estimular inclusive os próprios fibroblastos, possivelmente via autócrina. Este mecanismo sugere um papel na regulação da resposta reparadora (JORDANA *et al.*, 1994).

Fibroblastos pertencem a um grupo heterogêneo de células de origem mesenquimal presentes em muitos tecidos conectivos. Fibroblastos de diferentes localizações anatômicas, apesar de terem um aspecto morfológico muito semelhante, apresentam diferenças quanto ao seu perfil de expressão gênica, sintetizando proteínas da matriz extracelular e citocinas de modo específico de acordo com sua localização (WONG, MCGRATH, NAVSARIA, 2007).

Os princípios que regulam a especialização molecular dos fibroblastos são mal compreendidos. A diferenciação celular pode ser conseguida pela especificação única de cada tipo celular. Alternativamente, a organização pode surgir por células interpretando a sua posição ao longo de um sistema de coordenadas. Diferenças em larga escala nos programas de expressão de genes estavam relacionados com três divisões anatômicas: ântero - posterior, proximal - distal e dérmica – não dérmica, sendo que na distribuição proximal e distal, tendo como limite a cicatriz umbilical. Foi identificado em estudo de *microarray* de vários doadores de fibroblastos, de diferentes posições no organismo, uma similaridade de expressão gênica na região acima da cicatriz umbilical (RINN *et al.*, 2006).

Estes estudos de expressão gênica derivados de experimentos em animais e com o conhecimento sobre as fases de cicatrização podem ajudar a desenvolver esse campo do conhecimento médico, através da identificação de potenciais alvos terapêuticos que permitam uma melhor gestão dos eventos envolvidos na cicatrização de feridas causadas por queimadura (GRECO *et al.*, 2010).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *arrays*, que podem ser entendidos por vetores ou matrizes de genes, nesse caso, são ferramentas tecnológicas confiáveis para a análise da expressão de um determinado conjunto de genes. Seu funcionamento compreende na mistura de cDNA com o misturador de PCR apropriado, em alíquotas iguais, em cada poço e na mesma placa, que é preparada e analisa um processo específico. Em seguida, executa-se o PCR em tempo real (qPCR) (SANDERS *et al.*, 2014).

Sabendo-se que uma queimadura cutânea deflagra uma resposta inflamatória com conseqüente produção de radicais livres, levando a alterações na expressão gênica, um método eficaz para avaliar quais genes das células são alterados durante a fase aguda da inflamação é o PCR *Array*. A elucidação dos mecanismos que regulam a expressão gênica de marcadores do estresse oxidativo na presença ou ausência de vitamina C é importante para entender os processos que influenciam na recuperação do paciente queimado (SANDERS *et al.*, 2014).

Dada a correlação entre alterações do ambiente extracelular causadas pela queimadura e conseqüentes alterações de expressão gênica por fibroblastos dérmicos, foi

formulada a hipótese de que durante a resposta inflamatória aguda do paciente queimado a expressão gênica de marcadores de estresse oxidativo em fibroblastos dérmicos esteja alterada na presença da vitamina C, um antioxidante que já demonstrou benefícios em pacientes queimados.

2. OBJETIVO

2. Objetivo

Avaliar a ação da vitamina C na expressão de 84 genes marcadores de estresse oxidativo em fibroblastos cultivados da pele de pacientes com queimadura.

3. LITERATURA

Queimadura

NGUYEN *et al.* (1996) revisaram estudos e ensaios clínicos que incluem reposição volêmica, sepse, função imunológica, hipermetabolismo, excisão 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 que pode levar a instabilidade hemodinâmica e falência dos órgãos.

HAN *et al.* (2004) realizaram um estudo observacional sobre alterações nos mediadores inflamatórios nas queimaduras graves. Dezessete (17) pacientes adultos com 25% ou mais de superfície corporal queimada foram incluídos. Amostras de sangue foram obtidas 72 e 24 horas antes da cirurgia e no primeiro e terceiro dia pós-operatório. A alteração dos níveis de endotoxinas, citocinas e moléculas de adesão foram medidos por ELISA. A escarectomia ampla parece não ter impacto significativo sobre os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de interleucina-10 (IL-10). Endotoxinas e selectina-E diminuíram significativamente após escarectomia.

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 cobria 60% da superfície corporal. Em seguida, colheram soro nos seguintes momentos: 1, 3, 6, 12, 24, 48, 96 e 168 h após a lesão. Houve a avaliação de 8 tipos de citocinas presentes na resposta inflamatória, interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10, TNF, fator de crescimento endotelial vascular, proteína 1 de monócitos quimiotáticos, citocinas rato-específica e citocina quimioatrativa a neutrófilos (CINC), CINC-1, CINC-2 e CINC-3. As queimaduras resultaram em aumento significativo nos níveis séricos de IL-1 β , IL-6, IL-10, proteína 1 de monócitos quimiotáticos, CINC-1, CINC-2 e CINC-3 quando comparados com o grupo controle (n= 4 ratos). Os níveis séricos de TNF- α , fator de crescimento endotelial vascular não tiveram diferenças significativas quando comparadas com os controles.

Estresse Oxidativo

PADFIELD *et al.* (2006) identificaram um perfil de transcrição de genes que iniciam e mantêm a inflamação sistêmica em queimaduras. A lesão térmica medeia uma resposta sistêmica comum, independente do local ou extensão da lesão, e também respostas específicas a trauma local e distante. O estudo utilizou camundongos que foram mortos entre 6 e 10 horas após as queimaduras locais ou em 30% da superfície corpórea, sem intervenção no grupo controle. Utilizando a técnica de *microarrays*, 35 genes imuno-inflamatórios foram expressos diferencialmente em ambos os modelos com queimadura, 55 genes nos camundongos com queimadura local e 65 genes nos de queimadura maior. Os genes codificam quimiocinas, estresse oxidativo, complemento, sendo que os genes relacionados ao stress oxidativo estiveram expressos diferencialmente tanto no grupo de pequena queimadura quanto no de grande queimadura.

GRAGNANI *et al.* (2010) demonstraram que o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) protege queratinócitos humanos primários em cultura expostos ao estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio. O estudo dividiu os queratinócitos humanos em quatro grupos: grupo controle, Grupo KGF, Grupo H₂O₂, Grupo H₂O₂ + KGF. Cada experimento foi realizado com os queratinócitos da mesma linhagem, em triplicata. A viabilidade celular foi avaliada por ensaio de exclusão de azul de tripano, e mostrou como resultados que a morte celular aumentou no grupo H₂O₂, também aumentou em menor intensidade no grupo KGF, sendo que no grupo H₂O₂ + KGF houve uma proteção à morte celular, com significativa menor taxa de morte celular.

KANG *et al.* (2011) demonstraram que a apoptose celular induzida por radiação UVB foi significativamente reduzida na epiderme humana que hiper-expressa aldose redutase (AR), sugerindo que a AR tem um papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo por EROs e aldeídos reativos gerados em queratinócitos. Para realização do estudo, cultura de queratinócitos receberam a técnica de silenciamento de genes com pequenos RNA de interferência (siRNA) para o gene em questão. Após irradiação da cultura com duas lâmpadas que emitiam UVB de espectro contínuo 270-390 nm, com um pico de emissão a 313 nm, realizaram a análise da viabilidade celular através de um hemocítômetro e posteriormente análise por Western blot. A apoptose

celular induzida por radiação UVB foi significativamente reduzida na epiderme de ratos transgênicos que hiperexpressaram AR. Estes resultados sugerem que a AR desempenha um papel importante na resposta celular ao stress oxidativo, sequestrando ROS e aldeídos reativos gerados em queratinócitos.

Vitamina C em queimaduras

TANAKA *et al.* (2000) demonstraram que a administração de alta dose de vitamina C durante as primeiras 24 horas após a lesão térmica reduz significativamente o volume de fluidos necessário para ressuscitação volêmica, também diminuindo o ganho de peso corporal e edema da ferida. Foram incluídos 37 pacientes apresentando queimadura com mais de 30% de superfície corpórea queimada, internados nas primeiras 2 horas após a queimadura, sendo randomizados em grupo controle e grupo vitamina C. Uma redução na severidade da disfunção respiratória também foi evidente nestes pacientes. Outro benefício se deu com a diminuição significativa da peroxidação lipídica pós-queimadura. A solução de vitamina C foi administrada como uma infusão intravenosa contínua durante o período inicial de 24 horas, numa dose de 66 mg/kg por hora. O grupo controle não recebeu a infusão de vitamina C.

JEWO *et al.* (2012) demonstraram que a vitamina C protege os testículos de lesões térmicas e portanto tem o potencial para ser um tratamento auxiliar útil no tratamento de homens jovens com queimaduras graves. Após realizarem queimaduras de 3º grau em 40% da superfície corporal em 30 ratos e tratarem os animais durante 8 semanas com 4mg/kg de vitamina C, pesou-se os órgãos reprodutivos e avaliou-se os parâmetros de espermatozoides do epidídimo. O estresse oxidativo foi determinado e uma avaliação semi-quantitativa das alterações histológicas foi realizada. O estudo mostrou que a lesão térmica grave provoca danos significativos ao testículo e a espermatogênese, e que a vitamina C reduziu as lesões e danos testiculares.

MANUEL, GRAGNANI, FERREIRA (2012) realizaram um estudo a partir de culturas de fibroblastos dérmicos humanos divididos em 6 grupos: Controle; Vitamina C durante 6 horas; Vitamina C durante 6 horas + suplementação por 2 horas; H₂O₂; H₂O₂ + Vitamina C durante 6 horas; H₂O₂ + Vitamina C durante 6 horas + suplementação por 2 horas. Procederam-se com a avaliação sobre a taxa de proliferação celular, apoptose,

senescência celular e produção de radicais livres. Como conclusão, demonstrou-se que a vitamina C intracelular levou à diminuição da indução à senescência celular, porém não protegeu os fibroblastos humanos dérmicos cultivados contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂.

Fibroblastos e expressão gênica

JORDANA *et al.* (1994) demonstraram que o ambiente em que são cultivados os fibroblastos pode determinar o destino da célula e também de outros tipos de células. Portanto há uma extensa pesquisa em curso para identificar as vias de sinalização que são ativadas para aperfeiçoar as interações epitélio-mesenquimais, um evento importante na cicatrização de feridas. A combinação da engenharia de tecidos e substitutos de pele com as citocinas e fatores de crescimento pode, no futuro, ser usada para melhorar a cicatrização de feridas, bem como a possibilidade de incorporar o benefício de defensas antimicrobianas. Isso poderia levar a uma redução de custos e apoiar o uso crescente desses produtos específicos nos pacientes com queimaduras e outros tipos de feridas.

TANG & GILCHREST (1996) demonstraram que IL-1 alfa, IL-1 beta e TNF-alfa aumentam a expressão de RNAm de KGF em fibroblastos dérmicos em 352%, 504% e 535% respectivamente, em relação aos controles. Os resultados foram obtidos após extração do RNAm, amplificação por reações PCR e análise *Northern Blot*.

KESSLER-BECKER, KRIEG, ECKES (2004) demonstraram que fibroblastos de pele abdominal, quando em diferentes situações e ambientes no meio de cultura, apresentam diferenças na expressão de genes relacionados com a produção de fatores de crescimento e citocinas. Os resultados desse estudo apontaram uma reprogramação fundamental do perfil transcricional em um meio de cultura realizado sob ambiente de menor estresse, que tiveram uma indução da transcrição do gene relacionado com a produção de KGF. Com isso, evidenciou-se que a expressão gênica de fibroblastos sofre mudanças em respostas a alterações do ambiente extracelular, tendo uma produção diferenciada de suas proteínas nas diversas condições em que se encontra. A indução de KGF neste estudo corrobora a hipótese deste fator estar envolvido na regulação da inflamação durante a regeneração tecidual. A fim de avaliar a expressão gênica nas diferentes situações, isolou-se o RNAm da monocamada da cultura de fibroblastos. Após

isso, utilizou-se microchips ordenados de cDNA para hibridização com o RNAm obtido das culturas. Técnicas de imunofluorescência foram utilizadas para detectar hibridizações e assim saber quais genes estão sendo expressos, podendo-se assim comparar a expressão gênica das duas amostras. Para as seqüências positivas, procedeu-se com a análise *Northern blot* a fim de confirmar a diferença de expressão através de experimentos independentes.

Métodos de avaliação da expressão gênica

STEINSTRÆSSER *et al.* (2002) examinaram a expressão de CD14 na pele humana após queimadura. No estudo foram incluídos 57 pacientes com queimadura de profundidade parcial. Avaliação por RT-PCR 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 PCR mostrou aumento significativo da expressão de CD14 imediatamente após a queimadura.

KORIA *et al.* (2003) verificaram por meio de DNA *microarray*, alterações na expressão gênica em pele artificial lesionada com acetona. Determinados fatores de transcrição mitogênicos, como EGR-1 e ETR101, são 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 queimaduras acometendo mais de 40% da SCQ. Após alta hospitalar, foram feitas biópsias do músculo vasto lateral no 45° dia, 6° mês, 12° mês, 18° mês e 24° mês. O RNA total foi isolado *in vitro*, transcrito e hibridizado. Comparando com crianças não queimadas, 38 genes estavam significativamente 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. Compararam a expressão genética diferencial entre áreas parcialmente lesadas e áreas não lesadas de pele. Foram utilizadas 54.000 sondas representativas de 38.000 genes humanos, os resultados mostravam genes ativados e inativos com relevância estatística.

ZHOU *et al.* (2010) desenvolveram um método de avaliar perfis de expressão genética 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).

4. MÉTODOS

Desenho da Pesquisa

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

Casuística

Foram incluídos 10 pacientes com grande queimadura e 8 pacientes hígidos sem queimadura. Cada paciente teve duas garrafas cultivadas com fibroblastos, sendo uma suplementada e a outra não. Os grupos de estudo foram então divididos em:

1. Grupo Queimadura + (GQ +): cultura de fibroblastos de pacientes com grande queimadura suplementada com vitamina C
2. Grupo Queimadura – (GQ -): cultura de fibroblastos de pacientes com grande queimadura não suplementada com vitamina C
3. Grupo Controle + (GC +): cultura de fibroblastos de pacientes hígidos suplementada com vitamina C
4. Grupo Controle – (GC -): cultura de fibroblastos de pacientes hígidos não suplementada com vitamina C

Os pacientes com grande queimadura estavam internados na Unidade de Tratamento de Queimadura (UTQ) da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (DCP-UNIFESP) do Hospital São Paulo (HSP) – Hospital Universitário (HU) da EPM/UNIFESP e apresentavam queimaduras de 2º grau profundo ou 3º grau, acometendo entre 25% a 50% da Superfície Corporal Queimada (SCQ) ou necessitavam de 10% de enxertia. Os pacientes hígidos foram aqueles submetidos à cirurgias estéticas como mamoplastia pela Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (DCP-UNIFESP). Todos os pacientes incluídos preencheram os critérios de inclusão descritos posteriormente.

O “n” foi considerado adequado por se tratar de linhagens de células cultivadas, procedendo-se com a extração de seu material genético, não existindo outras variáveis, além da carga genética celular individual, e por ser realizado o experimento após a terceira passagem, momento em que já não existe alteração celular por sinais sistêmicos que poderiam afetar as células no isolamento imediato após a obtenção do fragmento de pele. O cálculo do tamanho da amostra não foi realizado por inexistência de dados na

literatura explicando o número utilizado em estudo *in vitro*, por isso, foi utilizada uma amostra de conveniência.

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 foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (CEP-UNIFESP), sendo aprovado em 10/05/2013 sob parecer número 269.015 (Anexo 1).

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

Critérios de Inclusão

Grupo Queimadura

Foram convidados os pacientes de ambos os gêneros, 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). Apresentavam queimadura de 2º grau profundo ou 3º grau, acometendo entre 25% a 50% da SCQ.

Grupo Controle

Foram convidados os pacientes de ambos os gêneros (masculino e feminino), com idade acima de 18 anos, não fumantes, que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE, com necessidade de procedimento operatório – cirurgia estética – mamoplastia para utilizar a pele que seria descartada.

Crêterios de Não Inclusão

Não foram includos os pacientes que não concordaram em participar da pesquisa, que apresentavam alguma doena prévia de pele ou lesão superficial, processo infeccioso ou doenas clínicas que interferissem diretamente com processo de cicatrizao de feridas (Colagenoses como lúpus eritematoso, esclerodermia, dermatopolimiosite, doena mista do tecido conjuntivo).

Crêterios de Exclusão

Foram excluídas as garrafas de cultivo que apresentaram alguma contaminao, taxa de proliferao baixa (menor que 80% de confluência de células nas garrafas), quantidade insuficiente de RNA extraído que impedisse a avaliao dos dados do paciente e perda do material extraído. Qualquer perda haveria reposio.

Instrumento de pesquisa

Procedimento operatório padrão e coleta de pele

A obteno das amostras de pele necessárias para o desenvolvimento da pesquisa foi realizada pelo cirurg o plástico durante o procedimento operatório padrão, tanto na cirurgia est tica, na qual normalmente há descarte de pele, sendo esta utilizada para o grupo controle, quanto na cirurgia de desbridamento utilizada para o tratamento dos queimados da UTQ-DCP-UNIFESP-HU-HSP. Neste estudo, foram utilizadas as peles com células viáveis que seriam descartadas para a realizao do experimento.

O desbridamento é a retirada do tecido morto de um paciente com queimadura de 2  grau profundo ou 3  grau que normalmente acontece no 3  dia após a queimadura. Durante essa limpeza, a pele normal que se encontra ao redor da lesão acaba sendo retirada por conta do próprio procedimento operatório, já que o instrumento utilizado, a Faca de Blair,   impreciso e incapaz de retirar apenas a pele necrosada, além de a queimadura apresentar limites irregulares. Essa pele normal, que seria descartada, foi enviada para o laboratório a fim de se realizar o isolamento das células com posterior avaliao.

O tecido estéril coletado foi imediatamente imerso em um tubo Falcon de 50mL contendo 30mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC, New York, NY, EUA) suplementado com 100UI/ml de penicilina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e de 100µg/ml estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para o transporte até o LCT-DCP-UNIFESP e mantido à temperatura de 4°C, sendo manipulado imediatamente.

Meio de cultura de fibroblastos

O meio de cultura de fibroblastos é constituído por meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC, New York, NY, EUA) suplementado com 100UI/ml de penicilina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e de 100µg/ml estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 20% de Soro Fetal Bovino (FBS) (ATCC, New York, NY, EUA).

O pH final foi ajustado para 7,4 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 derme e cultura de Fibroblastos

A cultura de fibroblastos humanos primários foi realizada no LCT-DCP-UNIFESP, seguindo o protocolo padrão do laboratório (MANUEL, GRAGNANI E FERREIRA, 2012).

A limpeza do tecido foi realizada dentro de um fluxo laminar para manter o ambiente estéril, 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) (Sigma, St. Louis, USA), suplementado com 100UI/ml de penicilina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e de 100µg/ml estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA), agitando vigorosamente cada tubo por 45 segundos para remover sangue e outras impurezas existentes.

Para o isolamento da derme, foi necessário segmentar a pele em fragmentos menores de 0,5cm x 0,5cm. Os fragmentos foram acondicionados em um tubo Falcon contendo 20 mL de dispase II 0,6 – 2,4 U/mL (04 942 078 001) (Roche, Indianapolis, IN,

USA) dissolvida em (DMEM) (ATCC, New York, NY, EUA), permanecendo por 18 horas para dissociar a epiderme da derme.

Após 18 horas, os fragmentos que estavam na dispase foram pinçados e lavados uma única vez com 30 mL de Versene (15040-066) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) a fim de neutralizar a ação da dispase e em seguida, colocados em uma placa de Petri de 100 mm² para a separação mecânica entre a epiderme e derme, utilizando 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 fibroblastos, a derme foi colocada em placas de petri de 100 mm² com pequenas ranhuras feitas com uma lâmina de bisturi. Após 20 minutos, quando os fragmentos apresentavam-se aderidos à placa, foi colocado 10 mL de meio de fibroblasto.

Em torno de 7 dias, as células atingiam uma confluência de 80% da placa, sendo então realizada culturas secundárias por meio de tripsinização, ou seja, era realizada a primeira passagem dos fibroblastos para uma garrafa de 75 cm². Ao atingirem a terceira passagem, as células foram utilizadas nos procedimentos ou congeladas em nitrogênio líquido para posterior utilização.

As placas e garrafas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂), até as células atingirem a confluência de 80%. Foram utilizados 10 mL de meio de cultura de fibroblasto em cada placa e garrafa, sendo a troca do meio realizada a cada 48 horas.

Suplementação com a Vitamina C

Nos grupos de estudo que receberam suplementação com o antioxidante, foi adicionado o Ascorbato de Sódio (*L-ascorbic acid*, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) na concentração de 250 µM em 10mL do próprio meio de cultura para fibroblastos durante a terceira passagem. A concentração foi definida com base em projeto piloto e estudo anterior da linha de pesquisa do LCT-UNIFESP (MANUEL *et al.*, 2012). As soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e foi tomado o cuidado de mantê-la protegida da luz, pelo fato de a Vitamina C ser fotossensível. O meio suplementado foi

trocado a cada 48 horas durante 4 dias, tempo necessário para a confluência de células na garrafa chegar em 80%. Foi tomado o cuidado de manter o pH próximo a 7,4.

Extração e purificação de RNA

O RNA total foi extraído dos fibroblastos 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 1).



FIGURA 1. Quantificação de RNA total por meio de Nanovue[®] (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA).

Conversão do RNA em cDNA e qPCR Array

O qPCR Array é realizado em um termociclador com sistema ótico 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 amplificações 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, 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 do 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 > *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 do estresse oxidativo (PAHS-065YC-24), para a análise da qPCR Array.

Foi feito um *pool*, ou uma única solução, com cDNA dos pacientes pertencentes ao mesmo grupo GQ-, GQ+, GC-, GC+, totalizando 4 *pools*. Cada *pool* foi distribuído nas placas de qPCR *Array* para a análise em triplicata, dos 84 genes marcadores do estresse oxidativo (PAHS-065YC-24) (Quadro 1), utilizando-se no total 12 placas.

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

QUADRO 1. *Human Oxidative Stress PCR Array* (Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores do estresse oxidativo.

RT² Profiler™ PCR Array Human Oxidative Stress (Qiagen, Valencia, EUA) (nº no catálogo: PAHS-065YC-24)
<p>1. ANTIOXIDANTES:</p> <p>Glutathiona Peroxidases (GPx): GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSTP1, GSTZ1.</p> <p>Peroxiredoxinas (TPx): PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX4, PRDX5, PRDX6 (AOP2).</p> <p>Outras Peroxidases: CAT, CYBB, CYGB, DUOX1, DUOX2, EPX, LPO, MGST3, MPO, PTGS1, PTGS2 (COX2), PXDN, TPO, TTN.</p> <p>Outros Antioxidantes: ALB, APOE, GSR, MT3, SELS, SOD1, SOD3, SRXN1, TXNRD1, TXNRD2</p>
<p>2. GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO:</p> <p>Superoxido Dismutases (SOD): SOD1, SOD2, SOD3</p> <p>Outros Genes envolvido com o metabolismo: ALOX12, CCS, DUOX1, DUOX2, GTF2I, MT3, NCF1, NCF2, NOS2 (iNOS), NOX4, NOX5, PREX1, UCP2.</p> <p>Outros Genes envolvidos no metabolismo de ROS: AOX1, BNIP3, EPHX2, MPV17, SFTPD.</p>
<p>3. GENES RESPONSÁVEIS DO ESTRESSE:</p> <p>APOE, ATOX1, CAT, CCL5 (RANTES), CYGB, DHCR24, DUOX1, DUOX2, DUSP1 (PTPN16), EPX, FOXM1, FTH1, GCLC, GCLM, GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7, GSR, GSS, HMOX1, HSPA1A, KRT1, LPO, MBL2, MPO, MSRA, NQO1, NUDT1, OXR1, OXSR1, PDLIM1, PNKP, PRDX2, PRDX5, PRDX6 (AOP2), PRNP, RNF7, SCARA3, SELS, SEPP1, SIRT2, SOD1, SOD2, SQSTM1, SRXN1, STK25, TPO, TTN, TXN, TXNRD1, TXNRD2.</p>
<p>4. TRANSPORTADORES DE OXIGÊNIO: CYGB, MB</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 as 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. A média do valor Cq foi usada para padronizar a expressão gênica ($2^{\Delta Cq}$) e determinar a diferença entre os grupos.

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 um teste estatístico 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 $< 0,05$.

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

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

Em relação à análise estatística considerou-se estatisticamente significante o valor $p < 0,05$ nos dois testes estatísticos adotados pelo programa: teste não paramétrico de Wilcoxon para análises pareadas e teste não paramétrico de Friedman para análises múltiplas.

Os experimentos foram realizados em triplicata a fim de aumentar a significância e confiabilidade dos resultados.

5. RESULTADOS

Participaram deste estudo 18 pacientes, sendo oito do grupo controle e dez do grupo queimado (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 fragmentos para expressão proteica.

Grupos/Dados	n	Média de Idade e Desvio Padrão	Gênero
Grupo Controle	8	38 anos \pm 10,01	8 F
Grupo Queimadura	10	34,2 anos \pm 10,23	5M / 5F

n=número; F=feminino; M=masculino

Foram analisadas a expressão gênica de 4 grupos, sendo eles: Grupo Queimados com Vitamina C (GQ+), Grupo Queimados sem Vitamina C (GQ-), Grupo Controle com Vitamina C (GC+) e Grupo Controle sem Vitamina C (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 e realizado em triplicata para garantir variabilidade amostral nas análises.

TABELA 2. Número de genes diferencialmente expressos da expressão gênica relativa dos grupos queimadura (n=10) e controle (n=8), na presença ou ausência de Vitamina C, 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-	0	0	0
2.)GQ- <i>versus</i> GC-	65	0	65
3.)GQ+ <i>versus</i> GC-	0	0	0
4.)GQ- <i>versus</i> GC+	65	0	65
5.)GQ+ <i>versus</i> GC+	71	0	71
6.)GQ+ <i>versus</i> GQ-	0	10	10

GQ+ =grupo queimadura com Vit C; GQ- =grupo queimadura semVit C; GC+ =grupo controle com Vit C; GC- =grupo queimadura sem Vit C

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, 4, 5 e 6, ou seja, que possuem o GQ como grupo experimental conforme demonstrado na Tabela 2. As comparações 1 e 3

não constam na Tabela 3, uma vez que não houveram genes significativamente expressos.

TABELA 3. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes das comparações efetuadas que possuem GQ (n=10) como grupo experimental.

Comparação/ Genes	2.) GQ- X GC-	4.) GQ- X GC+	5.) GQ+ X GC+	6.) GQ- X GQ+
ALOX12	-	-	-65896.94	2.29
AOX1	-368.38	-368.38	-776.84	-
APOE	-	-	-224979.43	-
ATOX1	-24.80	-24.80	-80.64	-
BNIP3	-34.93	-34.93	-151.96	-
CAT	-143.23	-143.23	-294.76	-
CCS	-581.79	-581.79	-1936.98	-
CYBB	-83465.12	-83465.12	-	-
CYGB	-8954.63	-8954.63	-19872.89	-
DHCR24	-	-242.48	-196.78	2.19
DUOX1	-84720.73	-84720.73	-37974.68	3.97
DUOX2	-	-	-164865.73	-
DUSP1	-70.38	-70.38	-90.26	-
EPHX2	-8790.20	-8790.20	-16144.33	-
EPX	-73931.19	-73931.19	-171326.50	-
FOXM1	-129.88	-129.88	-129.02	-
FTH1	-	-	-2.66	-
GCLC	-2319.73	-2319.73	-2851.55	-
GCLM	-8.89	-8.89	-26.73	-
GPX1	-48525.21	-48525.21	-61476.28	-
GPX2	-6404.81	-6404.81	-5353.54	2.13
GPX3	-43.75	-43.75	-57.81	-
GPX5	-	-	-31465.14	4.80
GPX6	-328.81	-328.81	-307.64	-
GPX7	-6.87	-6.87	-24.87	-
GSR	-1472.41	-1472.41	-3619.22	-
GSS	-279.99	-279.99	-842.97	-
GTF2I	-58183.54	-58183.54	-163971.16	-
KRT1	-191.47	-191.47	-488.02	-
LPO	-884.43	-884.43	-1754.78	-
MBL2	-44069.07	-35019.90	-12823.84	-
MGST3	-20906.43	-20906.43	-16560.04	2.25
MPV17	-5028.64	-5028.64	-117960.24	-
MSRA	-64627.18	-64627.18	-88653.32	-
MT3	-1287.85	-1287.85	-1150.46	-
NCF1	-30.28	-30.28	-126.81	-
NCF2	-128.36	-128.36	-613.75	-
NOS2	-138.25	-138.25	-201.35	-
NOX4	-20.29	-20.29	-62.91	-
NOX5	-33.65	-33.65	-118.50	-

Comparação/ Genes	2.) GQ- X GC-	4.) GQ- X GC+	5.) GQ+ X GC+	6.) GQ- X GQ+
NQO1	-30.19	-30.19	-113.05	-
NUDT1	-23.84	-23.84	-62.49	-
OXR1	-78.65	-78.65	-144.07	-
OXS1	-1069.06	-1069.06	-1487.11	-
PDLIM1	-2203.57	-2203.57	-4397.06	-
PNKP	-77.03	-77.03	-165.72	-
PRDX1	-222.04	-222.04	-496.35	-
PRDX2	-69403.24	-69403.24	-208778.14	-
PRDX3	-	-	-200289.25	-
PRDX4	-1180.49	-1180.49	-877.22	2.40
PRDX5	-14.37	-14.37	-62.05	-
PRDX6	-136.20	-136.20	-367.04	-
PREX1	-5513.16	-5513.16	-1921.03	5.11
PRNP	-289.26	-289.26	-40.84	-
PTGS1	-3604.75	-3604.75	-665.27	9.65
RNF7	-12810.08	-12810.08	-6746.53	3.38
SCARA3	-638.31	-	-1687.66	-
VIMP	-1029.48	-1029.48	-517.36	-
SEPP1	-136.97	-136.97	-294.00	-
SFTPD	-77.25	-77.25	-260.58	-
SIRT2	-161.07	-161.07	-472.92	-
SOD1	-208.10	-208.10	-636.27	-
SOD2	-128.38	-128.38	-218.28	-
SOD3	-21.88	-21.88	-33.05	-
SQSTM1	-3949.75	-3949.75	-1659.05	-
SRXN1	-2693.45	-2693.45	-4474.41	-
STK25	-15.41	-15.41	-60.60	-
TPO	-498.66	-498.66	-198.35	-
TTN	-659.81	-659.81	-1557.14	-
TXNRD1	-10840.64	-10840.64	-7061.89	-
TXNRD2	-4.54	-4.54	-18.34	-
UCP2	-35.45	-35.45	-101.70	-

[verde=hipo regulados; vermelho=hiper regulados]; [X=versus].

Apenas os genes apresentados na comparação 6 da Tabela 3 estão descritos no Apêndice 3, visto que é nosso grupo de interesse clínico, pois na prática as outras comparações não mostraram genes diferencialmente expressos ou mostraram um número muito grande de genes com *fold change* com valores tão alterados que não podem ser considerados para análise adequada, ficando nosso foco com a comparação entre o uso de vitamina C ou o não uso no grupo queimadura. A comparação 6 apresenta 10 genes hiperregulados, dentre eles os cinco mais hiperregulados são: ring finger protein 7 (RNF7), dual oxidase 1 (DUOX1), glutathione peroxidase 5 (GPX5),

phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1 (PREX1), prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1).

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 com Vitamina C (GC+) em análise *versus* Grupo Controle sem Vitamina C (GC-) referência.

A Figura 2 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 1.

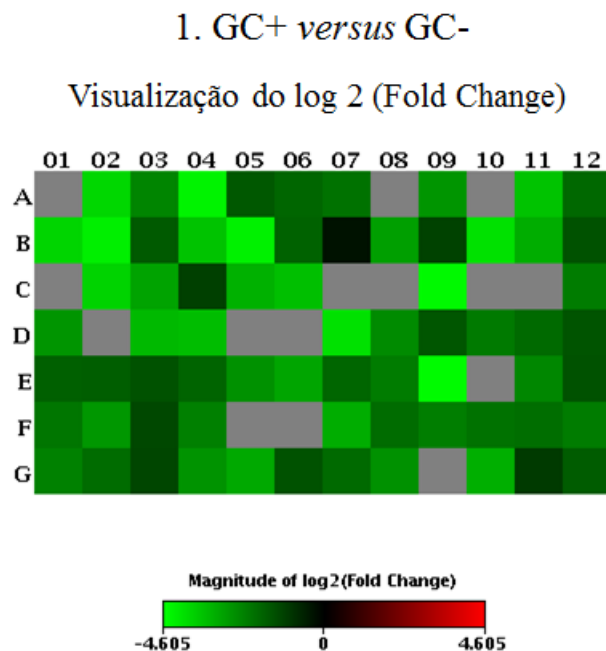


FIGURA 2. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa à comparação 1 entre GC+ *versus* GC-.

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 3 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 1.

1. GC+ versus GC-

Visualização do log 2 (Fold Change)

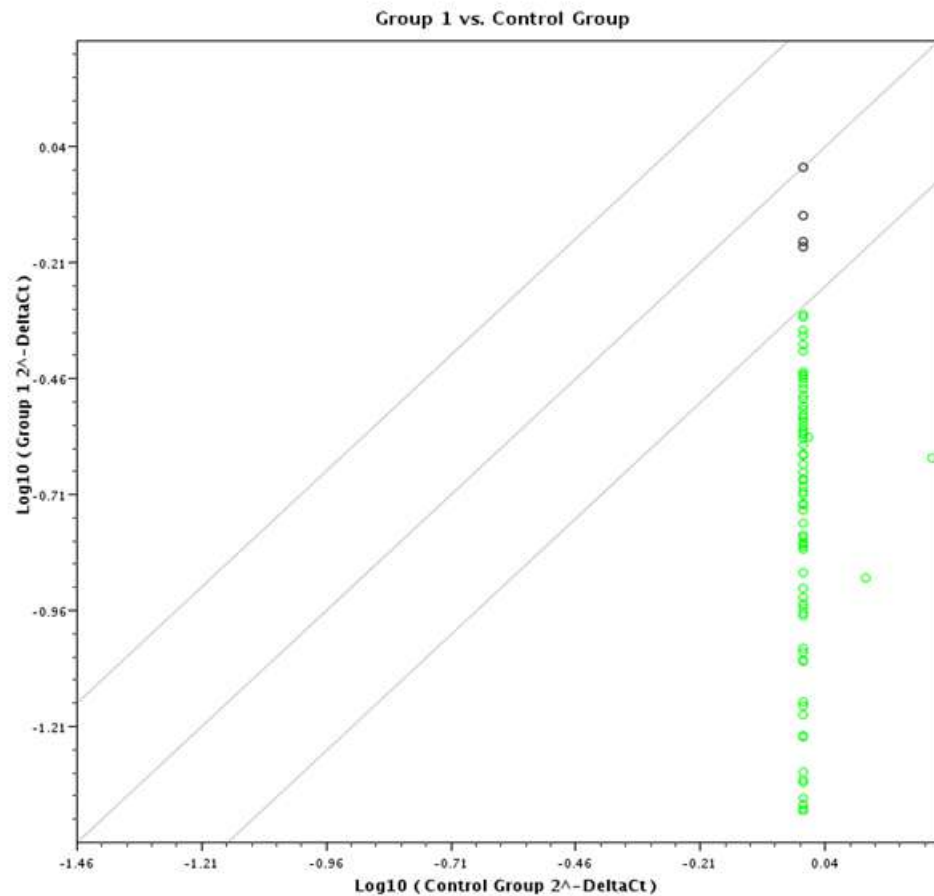


FIGURA 3. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa à comparação 1 entre GC+ versus GC-.

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 da Vitamina C no grupo controle, única diferença entre os dois grupos analisados].

1. GC+ versus GC-

Gene	Fold change (mudança de razão)
-	0

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

COMPARAÇÃO 2: GQ- VERSUS GC-

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

A Figura 4 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 2.

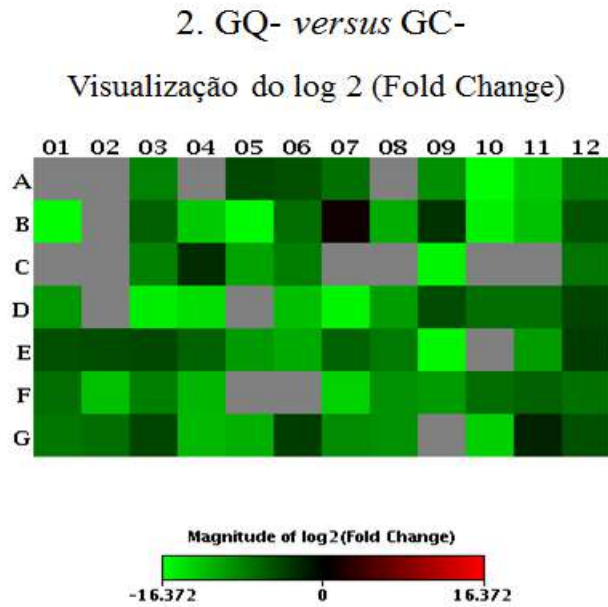


FIGURA 4. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa à comparação 2 entre GQ- versus GC-.

A Figura 5 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 2.

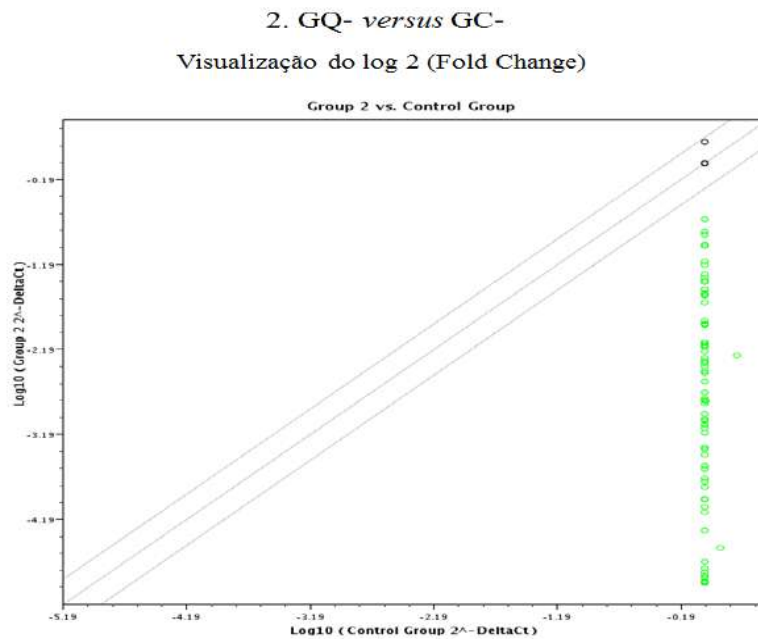


FIGURA 5. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa à comparação 2 entre GQ- versus GC-.

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 sem o uso de vitamina C, única diferença entre os dois grupos analisados].

2. GQ- versus GC-	
Gene	Fold change (mudança de razão)
AOX1	-368.38
ATOX1	-24.80
BNIP3	-34.93
CAT	-143.23
CCS	-581.79
CYBB	-83465.12
CYGB	-8954.63
DUOX1	-84720.73
DUSP1	-70.38
EPHX2	-8790.20
EPX	-73931.19
FOXM1	-129.88
GCLC	-2319.73
GCLM	-8.89
GPX1	-48525.21
GPX2	-6404.81
GPX3	-43.75
GPX6	-328.81
GPX7	-6.87
GSR	-1472.41
GSS	-279.99
GTF2I	-58183.54
KRT1	-191.47
LPO	-884.43
MBL2	-44069.07
MGST3	-20906.43
MPV17	-5028.64
MSRA	-64627.18
MT3	-1287.85
NCF1	-30.28
NCF2	-128.36
NOS2	-138.25
NOX4	-20.29
NOX5	-33.65
NQO1	-30.19
NUDT1	-23.84
OXR1	-78.65
OXSR1	-1069.06

Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
PDLIM1	-2203.57
PNKP	-77.03
PRDX1	-222.04
PRDX2	-69403.24
PRDX4	-1180.49
PRDX5	-14.37
PRDX6	-136.20
PREX1	-5513.16
PRNP	-289.26
PTGS1	-3604.75
RNF7	-12810.08
SCARA3	-638.31
VIMP	-1029.48
SEPP1	-136.97
SFTPD	-77.25
SIRT2	-161.07
SOD1	-208.10
SOD2	-128.38
SOD3	-21.88
SQSTM1	-3949.75
SRXN1	-2693.45
STK25	-15.41
TPO	-498.66
TTN	-659.81
TXNRD1	-10840.64
TXNRD2	-4.54
UCP2	-35.45

O resultado da comparação 2 (GQ- *versus* GC-) revela 65 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 77,4% dos genes, sendo todos (100%) hiporregulados. Os valores de *fold change* de vários genes aqui encontrados são extremamente elevados e não encontrados de rotina

COMPARAÇÃO 3: GQ+ *VERSUS* GC-

Grupo Queimadura com Vitamina C (GQ+) em análise *versus* Grupo Controle sem Vitamina C (GC-) referência

A Figura 6 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 3.

3. GQ+ versus GC-

Visualização do log₂ (Fold Change)

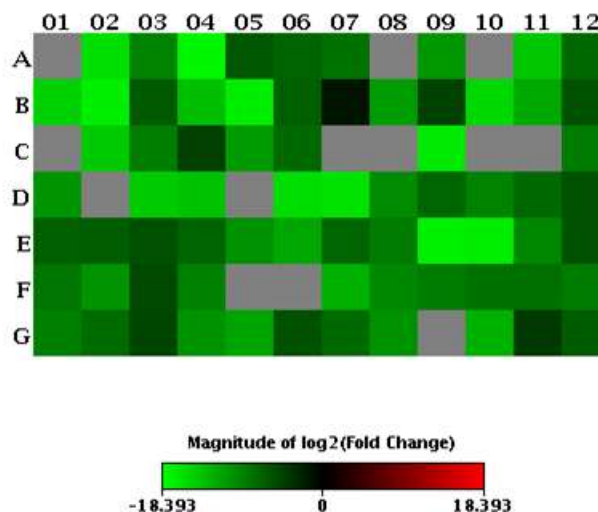


FIGURA 6. Heat Map, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ versus GC-.

A Figura 7 representa o Scatter Plot, ou gráfico de dispersão, da comparação 3.

3. GQ+ versus GC-

Visualização do log₂ (Fold Change)

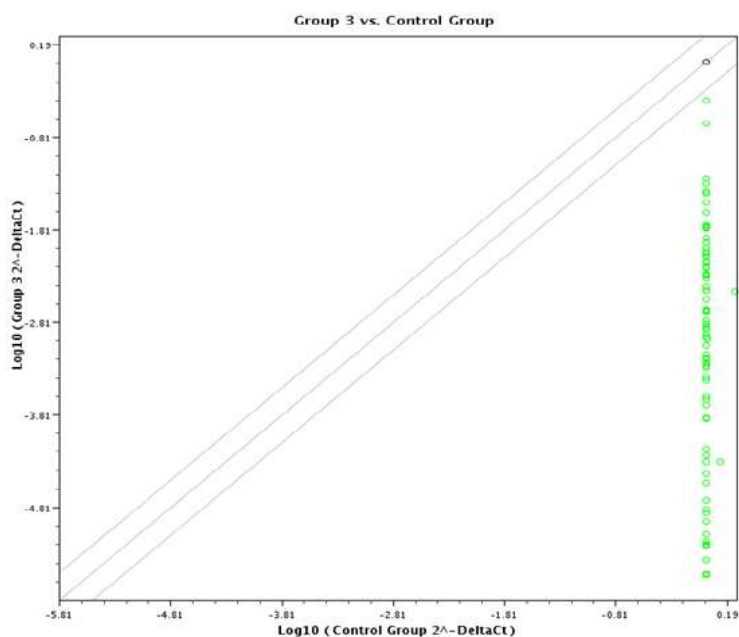


FIGURA 7. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 3 entre GQ+ *versus* GC-.

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 da Vitamina C e a queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

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

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

COMPARAÇÃO 4: GQ- *VERSUS* GC+

Grupo Queimadura sem Vitamina C (GQ-) em análise *versus* Grupo Controle com Vitamina C (GC+) referência.

A Figura 8 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 4.

4. GQ- *versus* GC+

Visualização do \log_2 (Fold Change)

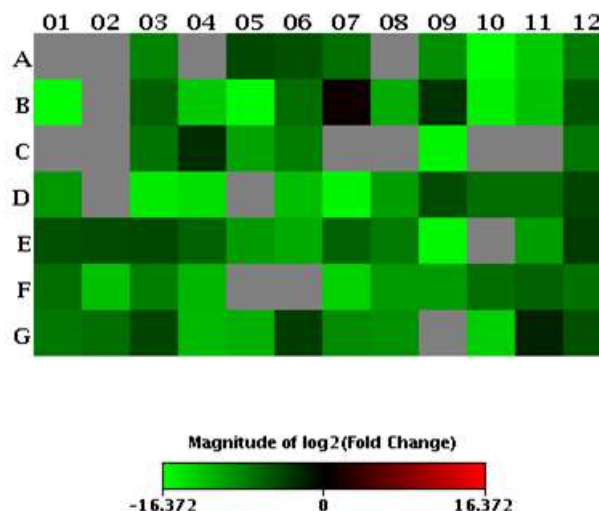


FIGURA 8. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ- versus GC+.

A Figura 9 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 4.

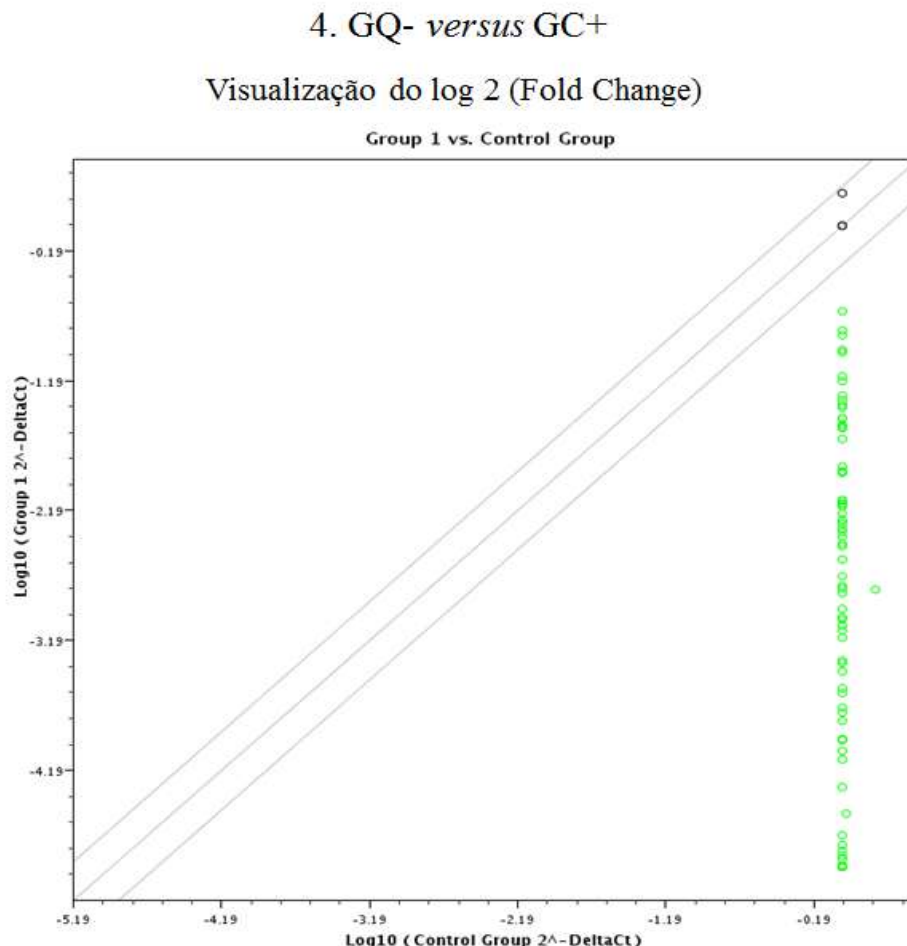


FIGURA 9. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 4 entre GQ- versus GC+.

TABELA 7. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 4 entre o GQ- versus GC+. [Quando foram analisados a ação da Vitamina C no grupo de referência ou controle, além da queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

4. GQ- versus GC+	
Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
AOX1	-368.38
ATOX1	-24.80
BNIP3	-34.93

Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
CAT	-143.23
CCS	-581.79
CYBB	-83465.12
CYGB	-8954.63
DHCR24	-242.48
DUOX1	-84720.73
DUSP1	-70.38
EPHX2	-8790.20
EPX	-73931.19
FOXM1	-129.88
GCLC	-2319.73
GCLM	-8.89
GPX1	-48525.21
GPX2	-6404.81
GPX3	-43.75
GPX6	-328.81
GPX7	-6.87
GSR	-1472.41
GSS	-279.99
GTF2I	-58183.54
KRT1	-191.47
LPO	-884.43
MBL2	-35019.90
MGST3	-20906.43
MPV17	-5028.64
MSRA	-64627.18
MT3	-1287.85
NCF1	-30.28
NCF2	-128.36
NOS2	-138.25
NOX4	-20.29
NOX5	-33.65
NQO1	-30.19
NUDT1	-23.84
OXR1	-78.65
OXS1	-1069.06
PDLIM1	-2203.57
PNKP	-77.03
PRDX1	-222.04
PRDX2	-69403.24
PRDX4	-1180.49
PRDX5	-14.37
PRDX6	-136.20
PREX1	-5513.16
PRNP	-289.26
PTGS1	-3604.75

Gene	Fold change (mudança de razão)
RNF7	-12810.08
VIMP	-1029.48
SEPP1	-136.97
SFTPD	-77.25
SIRT2	-161.07
SOD1	-208.10
SOD2	-128.38
SOD3	-21.88
SQSTM1	-3949.75
SRXN1	-2693.45
STK25	-15.41
TPO	-498.66
TTN	-659.81
TXNRD1	-10840.64
TXNRD2	-4.54
UCP2	-35.45

O resultado da comparação 4 (GQ- *versus* GC+) revela 65 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 77,4% dos genes, sendo todos (100%) hiporregulados.

COMPARAÇÃO 5: GQ+ *VERSUS* GC+

Grupo Queimadura com Vitamina C (GQ+) em análise *versus* Grupo Controle com Vitamina C (GC+) referência.

A Figura 10 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 5.

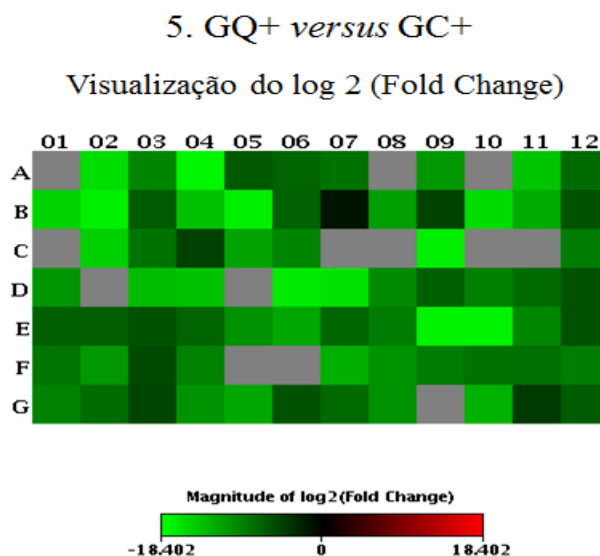


FIGURA 10. *Heat Map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.

A Figura 11 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 5.

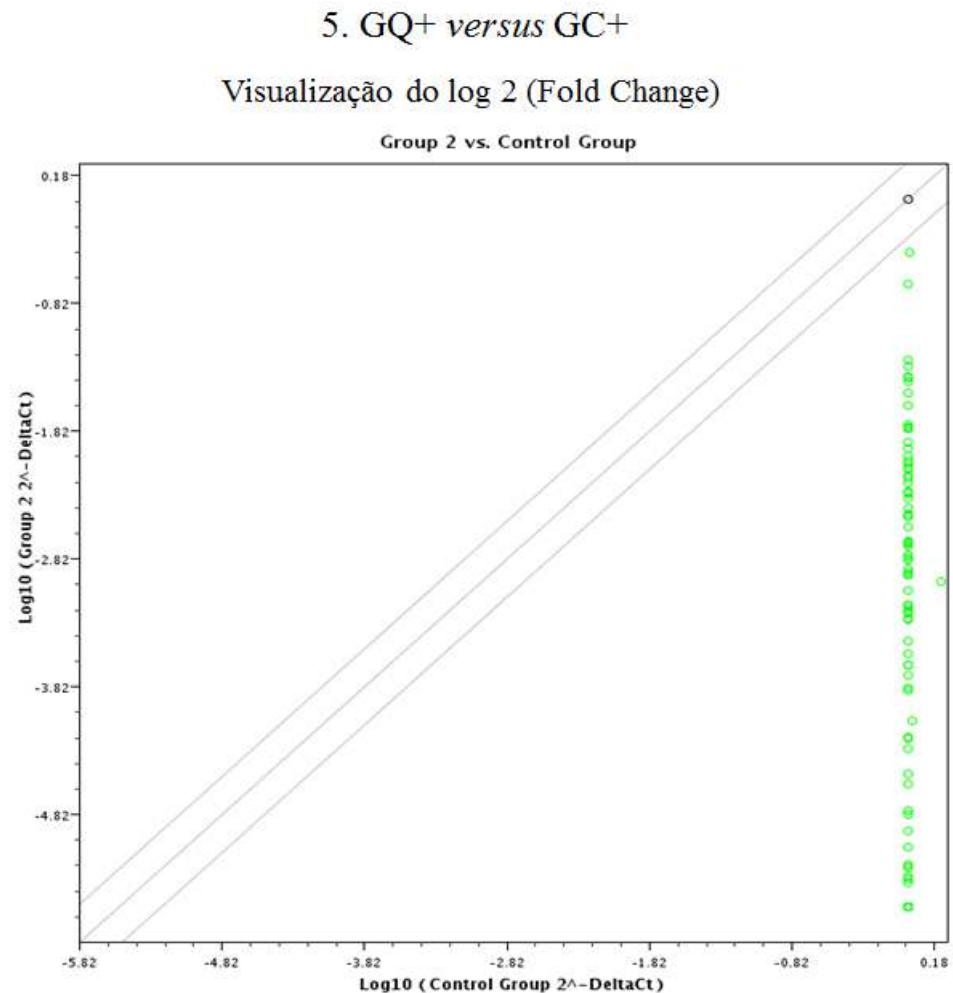


FIGURA 11. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 5 entre GQ+ versus GC+.

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 da Vitamina C e queimadura, duas diferenças entre os dois grupos analisados].

5. GQ+ versus GC+

Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
ALOX12	-65896.94
AOX1	-776.84
APOE	-224979.43
ATOX1	-80.64
BNIP3	-151.96
CAT	-294.76
CCS	-1936.98
CYGB	-19872.89
DHCR24	-196.78
DUOX1	-37974.68
DUOX2	-164865.73
DUSP1	-90.26
EPHX2	-16144.33
EPX	-171326.50
FOXM1	-129.02
FTH1	-2.66
GCLC	-2851.55
GCLM	-26.73
GPX1	-61476.28
GPX2	-5353.54
GPX3	-57.81
GPX5	-31465.14
GPX6	-307.64
GPX7	-24.87
GSR	-3619.22
GSS	-842.97
GTF2I	-163971.16
KRT1	-488.02
LPO	-1754.78
MBL2	-12823.84
MGST3	-16560.04
MPV17	-117960.24
MSRA	-88653.32
MT3	-1150.46
NCF1	-126.81
NCF2	-613.75
NOS2	-201.35
NOX4	-62.91
NOX5	-118.50
NQO1	-113.05
NUDT1	-62.49
OXR1	-144.07
OXS1	-1487.11
PDLIM1	-4397.06
PNKP	-165.72

Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)
PRDX1	-496.35
PRDX2	-208778.14
PRDX3	-200289.25
PRDX4	-877.22
PRDX5	-62.05
PRDX6	-367.04
PREX1	-1921.03
PRNP	-40.84
PTGS1	-665.27
RNF7	-6746.53
SCARA3	-1687.66
VIMP	-517.36
SEPP1	-294.00
SFTPD	-260.58
SIRT2	-472.92
SOD1	-636.27
SOD2	-218.28
SOD3	-33.05
SQSTM1	-1659.05
SRXN1	-4474.41
STK25	-60.60
TPO	-198.35
TTN	-1557.14
TXNRD1	-7061.89
TXNRD2	-18.34
UCP2	-101.70

O resultado da comparação 5 (GQ+ *versus* GC+) revela 71 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 84,5% dos genes, sendo todos (100%) hiporregulados.

COMPARAÇÃO 6: GQ+ *VERSUS* GQ-

Grupo Queimadura com Vitamina C (GQ+) em análise *versus* Grupo Queimadura sem Vitamina C (GQ-) referência.

A Figura 12 representa o *Heat Map* ou mapa de calor da comparação 6.

6. GQ+ versus GQ-

Visualização do log₂ (Fold Change)

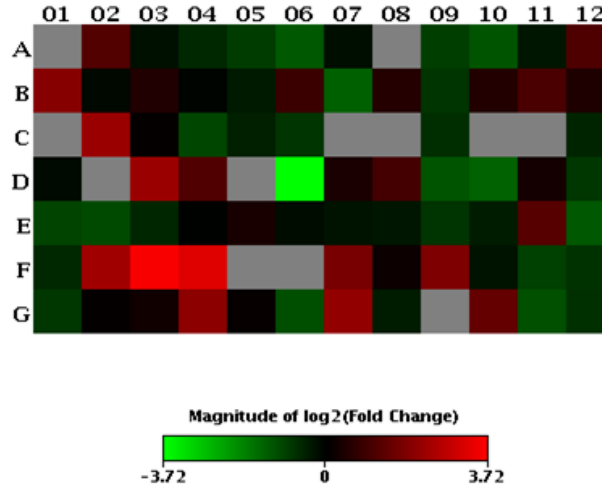


FIGURA 12. *Heat map*, ou mapa de calor, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ+ versus GQ-.

A Figura 13 representa o *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, da comparação 6.

6. GQ+ versus GQ-

Visualização do log₂ (Fold Change)

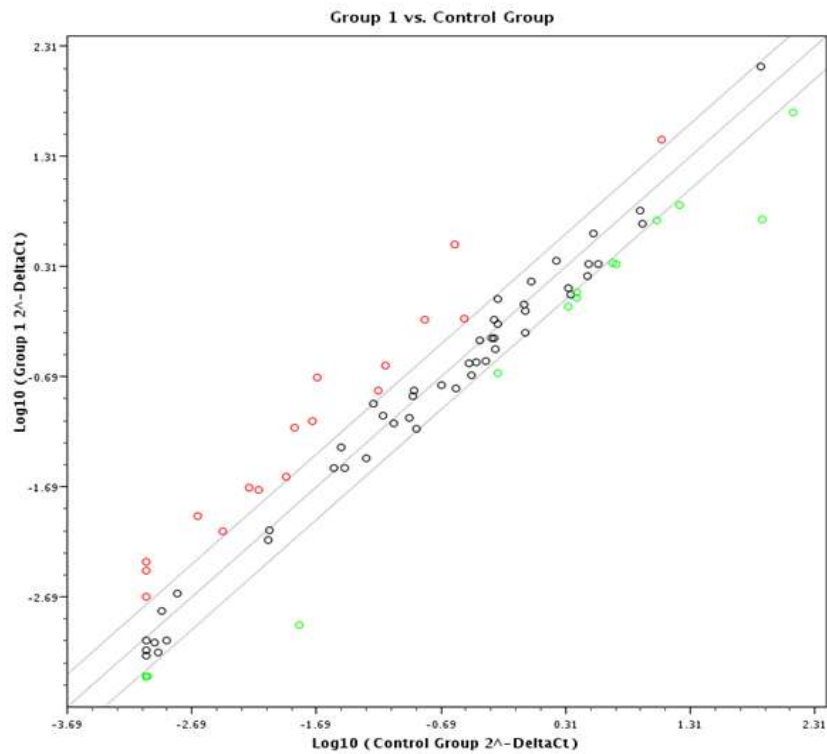


FIGURA 13. *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, com a expressão gênica relativa da comparação 6 entre GQ+ *versus* GQ-.

TABELA 9. Genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes da expressão gênica relativa da comparação 6 entre o GQ+ *versus* GQ-. [Quando foi analisado diretamente a ação da Vitamina C, única diferença entre os dois grupos analisados].

6. GQ+ <i>versus</i> GQ-		
Gene	<i>Fold change</i> (mudança de razão)	<i>p</i> (<0.05)
ALOX12	2.29	0.032276
DHCR24	2.19	0.045293
DUOX1	3.97	0.004838
GPX2	2.13	0.028172
GPX5	4.80	0.012511
MGST3	2.25	0.002105
PRDX4	2.40	0.037183
PREX1	5.11	0.041785
PTGS1	9.65	0.004439
RNF7	3.38	0.002670

O resultado da comparação 6 (GQ+ *versus* GQ-) revela 10 genes dos 84 diferencialmente expressos e estatisticamente significantes, representando 11,9% dos genes, sendo todos (100%) hiperregulados.

6. DISCUSSÃO

A queimadura é um trauma complexo e de difícil tratamento, com graves repercussões sociais econômicas e de saúde pública. Está entre as principais causas de morbidade e mortalidade (GAUGLITZ *et al.* 2008). Acometem simultaneamente diversas regiões, independentemente de sua causa e requerem constante atuação da equipe multidisciplinar (GRAGNANI *et al.*, 2010).

PADFIELD *et al.* (2006) identificaram que, em queimaduras, existe um perfil de transcrição de genes que iniciam e mantêm a inflamação sistêmica num ambiente de estresse oxidativo. A lesão térmica medeia uma resposta sistêmica comum, independente do local ou extensão da lesão, e também respostas específicas ao trauma local e distante. Genes relacionados ao estresse oxidativo estiveram expressos diferencialmente nos grupos de pacientes com queimadura (NGUYEN *et al.* 1996; JORDANA *et al.* 1994)

Além disso, reduções significativas na concentração de vitamina C têm sido relatados em pacientes com grandes queimaduras (TANAKA *et al.* 2000; JEWELL *et al.* 2012). A nutrição enteral tem sido a via alternativa para o fornecimento de toda ou uma parte das necessidades nutricionais de um paciente vítima de queimadura, porém pode não fornecer quantidades necessárias de vitaminas e nutrientes (BERTIN-MAGHIT *et al.*, 2000; BORRELLI *et al.*, 1996).

No presente estudo, os experimentos com Vitamina C em cultura de fibroblastos da pele ao redor da área de necrose em pacientes com queimadura em comparação com pacientes hígidos analisado por *PCRarray* para marcadores de estresse oxidativo é inovador, não havendo referências similares na literatura que pudesse servir de parâmetro para realizar-se discussão mais aprofundada sobre os resultados obtidos. Sendo original, é um primeiro perfil de expressão gênica que será publicado e será um parâmetro para novos estudos em projetos similares.

Os pacientes do grupo controle não apresentavam nenhuma alteração diagnosticada no momento da coleta (doenças, vícios ou alergias), sendo compatíveis aos critérios de inclusão em cirurgias estéticas (mamoplastias). Com esses parâmetros rígidos, foi delimitado um grupo controle de pele normal em paciente hígido para contrapor um paciente que havia sido vítima de grande queimadura. É sabido que a mesma determina um estado inflamatório intenso, um quadro de síndrome da resposta

inflamatória sistêmica. Inclusive, os pacientes do grupo controle não poderiam ser fumantes, mesmo porque as cirurgias estéticas no HU não são realizadas em fumantes, pois o fumo pode alterar a microcirculação. Houve um controle rigoroso para este estudo comparativo em relação aos pacientes com queimadura, estes que apresentam um grave e complexo trauma.

Foram realizadas 6 comparações entre os grupos, sendo elas, 1.) GC+ *versus* GC-, 2.) GQ- *versus* GC-, 3.) GQ+ *versus* GC-, 4.) GQ- *versus* GC+, 5.) GQ+ *versus* GC+ e 6.) GQ+ *versus* GQ-. Essa divisão e comparação é didática, facilita o planejamento da análise, mas clinicamente a comparação prioritária é a que compara o grupo queimado com a suplementação da vitamina C no meio de cultura de fibroblastos e o não uso, pois nessa comparação temos a análise específica de quais genes são diferencialmente expressos somente pela adição da vitamina C. As outras comparações, ou não produziram genes diferencialmente expressos ou produziram muitos genes diferencialmente alterados numa percentagem entre 77 a 84% dos genes totais, em número de 84, mas com valores extremamente discrepantes de resultados normais.

Essas comparações foram apresentadas para o melhor entendimento do que o próprio programa esta preparado para realizar, mas não serão analisadas no presente estudo, visto que não permitiu uma análise adequada do resultado obtido. Os resultados do *fold change* apresentado nas tabelas podem ser identificados como fora do normal para tais experimentos, por apresentarem números muitos elevados e, em outras comparações com zero gene diferencialmente expresso, assim como no gráfico de dispersão com uma distribuição dos genes numa linha não similar aos resultados normalmente obtidos.

A realização de novos experimentos para verificar esses resultados foi aventada, mas frente à importância clínica da comparação de suplementação ou não da vitamina C na cultura de fibroblastos de pacientes com grande queimadura e, de várias outras comparações, foi optado por mostrar esses resultados, mas somente discutir a última comparação, levando também em consideração o custo e o tempo.

A primeira comparação, grupo controle com Vitamina C em relação ao grupo controle sem Vitamina C, teve como objetivo avaliar unicamente a ação da Vitamina C nos fibroblastos de pacientes hígidos, portanto como o objetivo inicial era o uso clínico

como questão central no paciente com grande queimadura, não foi analisada no presente estudo. Como resultado, não obteve-se nenhum gene diferencialmente expresso pela ação da Vitamina C nas células do grupo controle. O resultado pode sugerir, nessa linha de pesquisa, que essa concentração de Vitamina C utilizada nesse modelo experimental poderia não ter ação em células híidas.

Na segunda comparação, confrontou-se o grupo queimadura sem Vitamina C com o grupo controle sem Vitamina C para definir quais genes estariam diferencialmente expressos em decorrência da queimadura. Nesse caso, a queimadura determinou a hiporregulação de 65 genes, variando de -6,87 a -84.720, uma variação muito grande e de difícil análise para tantos genes alterados (77% do total).

Na terceira comparação, analisou-se o grupo queimadura com Vitamina C em relação ao grupo controle sem Vitamina C, onde poderia ser verificada a ação da Vitamina C no grupo queimadura na expressão gênica relativa, sendo o GC- o grupo referencial, mas em termos de análise, por existem duas variáveis importantes, a queimadura e a suplementação da vitamina C, acabou dificultando a interpretação dos resultados obtidos. Entretanto, essa comparação não apresentou nenhum gene diferencialmente expresso.

Na quarta comparação, analisou-se o grupo queimadura sem Vitamina C em relação ao grupo controle com Vitamina C. Nessa comparação existem duas variáveis importantes, a queimadura e a suplementação da Vitamina C no meio de cultura de fibroblastos, onde foram encontrados 65 (77% do total) genes diferencialmente expressos e hiporregulados, e em grande parte desses genes foram similares à segunda comparação. Como afirmado na segunda comparação, por existirem duas variáveis importantes e pelo grande número de genes, com intervalo de variação de *fold change* com mesmos valores daquela comparação, mostra que não foi possível inicialmente, considerar o resultado para análise.

Na quinta comparação, analisou-se o grupo queimadura com Vitamina C em relação ao grupo controle com Vitamina C, resultando em 71 (84% do total) genes diferencialmente expressos e hiporregulados em relação ao grupo referencial, mostrando o mesmo padrão de resultados da comparação 2 e 4, portanto novamente, não podendo ser analisada.

Na sexta comparação, que foi realizada entre o grupo queimadura com Vitamina C e o grupo queimadura sem Vitamina C, grupo de maior relevância no resultado da expressão gênica relativa, pois nessa comparação avaliou-se diretamente a ação da Vitamina C em fibroblastos cultivados com a suplementação de vitamina C no meio de cultura de pacientes com queimadura, que representa o que é realizado na aplicação clínica e foco de nossa questão experimental. Nessa comparação, ao contrário das outras comparações sem genes resultantes (1 e 3) ou com a grande maioria dos genes extremamente alterados (2, 4 e 5), foram obtidos 10 genes diferencialmente expressos e se mostraram hiperregulados, e como pode ser analisado na distribuição uniforme, ao redor dos valores de referência, que nessa comparação são os de paciente queimado sem suplementação de vitamina C no meio de cultura de fibroblastos, mostra que existe um resultado adequado para análise.

Os 10 genes que se apresentaram hiperregulados na comparação 6 foram, arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12), 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24), dual oxidase 1 (DUOX1), glutathione peroxidase 2 (GPX2), glutathione peroxidase 5 (GPX5), microsomal glutathione S-transferase 3 (MGST3), peroxiredoxin 4 (PRDX4), phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1 (PREX1), prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1), ring finger protein 7 (RNF7). Dos dez genes, 4 encontram-se envolvidos com o estresse oxidativo e 6 com antioxidantes. Não foram encontrados estudos semelhantes na literatura, o que dificultou a comparação dos achados desde estudo com os da literatura.

O gene arachidonate 12-lipoxygenase (ALOX12) apresentou $p = 0,032276$ e *fold change* = 2,29. É uma lipoxigenase o que contribui para função da barreira epidérmica. Quando níveis intracelular do antioxidante glutathione encontram-se diminuídos, o ALOX12 torna-se neuro-tóxico amplificando o estresse oxidativo, atacando a mitocôndria e produzindo espécies reativas de oxigênio (PALLAST *et al.*, 2009).

O 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24) que apresentou $p = 0,045293$ e *fold change* = 2,19, é uma enzima multifuncional do retículo endoplasmático que possui atividades anti-apoptótica e de síntese de colesterol. Um estudo realizado por LU *et al.* (2008) verificou-se que DHCR24 exerceu efeitos citoprotetores no retículo endoplasmático induzido pelo estresse, eliminando ROS. Estes resultados demonstram

que DHCR24 podem eliminar diretamente H_2O_2 , protegendo deste modo, as células de apoptose induzida por estresse oxidativo.

A proteína codificada pelo gene dual oxidase 1 (DUOX1) que apresentou $p = 0,004838$ e $fold\ change = 3,97$, é uma glicoproteína e um membro da família da NADPH-oxidase. Caracteriza-se por gerar peróxido de hidrogênio. HIRAKAWA *et al.* (2011) demonstraram que, dos sete NOX / membros da família DUOX em queratinócitos epidérmicos humanos normais, IL-4 / IL-13 aumenta a expressão apenas do DUOX1. Esta expressão aumentada do DUOX1 foi acompanhada por um aumento da produção do H_2O_2 .

A NADPH-oxidase tem uma participação importante na resposta imune inata na infecção ou lesão. Uma característica dessa resposta é a produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, também participa nos mecanismos de sinalização celular autócrina e parácrina, que regulam respostas celular pró-inflamatórias e de cicatrização. Estudos recentes indicam que NOX/DUOX dependente de H_2O_2 podem ter sinalização parácrina, recrutando neutrófilos e macrófagos para o sítio da ferida. (HRISTOVA *et al.*, 2014).

O glutathione peroxidase 2 (GPX2) apresentou $p = 0,028172$ e $fold\ change = 2,13$. É membro da família de glutathione peroxidase e codifica uma enzima glutathione peroxidase dependente de selênio, que é uma das duas isoenzimas responsáveis pela maior parte da atividade de redução de peróxido de hidrogênio. SMIRNOV *et al.* (2016) relataram que a diminuição da expressão do FOXM1, um membro da superfamília de fatores de transcrição, é suficiente para induzir a senescência do queratinócito, acompanhado por um aumento da produção de ROS e uma inibição de genes ROS-scavenger (SOD2, CAT, GPX2, PRDX). A depleção do FOXM1 sensibiliza os queratinócitos normais à apoptose induzida por ROS. Juntos, estes dados identificam FOXM1 como um regulador chave de ROS nas células epiteliais normais em divisão.

O gene glutathione peroxidase 5 (GPX5) apresentou $p = 0,012511$ e $fold\ change = 4,80$. É pertencente à família das glutathione-peroxidases e expresso especificamente no epidídimo no trato reprodutivo masculino dos mamíferos, sendo regulado por androgênio. Foi estudado o estresse oxidativo em cultura de células de epidídimo em função da expressão gênica do GPX5 e relatou-se que a ação da proteína codificada por

GPX5 é protetora contra efeitos danosos dos peróxidos de hidrogênio a que os espermatozoides estão expostos (VERNET *et al.*, 1996).

O microsomal glutathione S-transferase 3 (MGST3) que apresentou $p = 0,002105$ e *fold change* = 2,25, codifica um membro da família de proteínas de membrana associadas no metabolismo da glutatona e eicosanóides (MAPEG). Os membros desta família estão envolvidos na produção de leucotrienos e prostaglandinas, mediadores importantes da inflamação. Esta enzima também demonstra uma atividade de peroxidase dependente de glutatona no sentido de hidroperóxidos de lípidos (NEBERT & VASILIOU, 2004).

A proteína codificada pelo gene peroxiredoxin 4 (PRDX4) que apresentou $p = 0,037183$ e *fold change* = 2,40, é uma enzima antioxidante. Peroxirredoxinas (PRDXs) formam uma família de enzimas que apresentam atividade de peroxidase usando elétrons de tioredoxina e outras moléculas doadoras. Muitas moléculas pequenas e proteínas, tais como glutatona e tioredoxina (Trx), estão envolvidas em reações redox. Como as funções de sinalização de peróxido de hidrogênio em resposta a estímulos extracelulares têm surgido, o envolvimento de PRDX na sinalização mediada por peróxido de hidrogênio tornou-se evidente. A regulação do sinal por espécies reativas de oxigênio, particularmente peróxido de hidrogênio, seria a função mais profunda da PRDX. Entre os seis membros PRDX, o PRDX4 possui exclusivamente um peptídeo de sinal hidrófobo no terminal amino, e portanto, é submetido a qualquer secreção ou retenção do retículo endoplasmático (RE). Um estudo recente utilizando sensores de peróxido de hidrogênio indicou que o RE é a organela que produz os mais elevados níveis de peróxido de hidrogênio, sendo este a principal fonte de ROS. (FUJII *et al.*, 2015).

O gene phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1 (PREX1) apresentou $p = 0,041785$ e *fold change* = 5,11. A proteína codificada por este gene atua como um fator de troca do nucleotídeo guanina pertencente a família Rho de pequenas proteínas de ligação ao RhoGTPase (GTP), denominadas proteínas Rac. É encontrada principalmente no citoplasma, é ativada por fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato e as subunidades beta-gama das proteínas G heterotriméricas. Dentre suas ações, há ativação endotelial levando ao aumento a produção de fatores oxidantes e assim,

aumentando a permeabilidade capilar que contribui para o edema tecidual, ações hemostáticas na agregação plaquetária, ativação de fatores de crescimento endotelial e angiogênese e função bactericida leucocitária (CARRETERO-ORTEGA *et al.*, 2009).

O gene da prostaglandina sintase endoperóxido 1 (PTGS1) apresentou $p = 0,004439$ e $fold\ change = 9,65$. Trata-se de um gene cuja expressão envolve enzimas catalisadoras da conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. A proteína por ele codificada regula a angiogênese em células endoteliais. Mais popularmente conhecido como Cicloxigenase 1 e 3 (COX-1, COX-3), participa da resposta inflamatória. Segundo TONIOLO *et al.* (2010), as funções da enzima desse gene foram reafirmadas demonstrando que o PTGS1 (COX-1) é a principal fonte de prostaciclina (PGI₂) endotelial, que é um vasodilatador, em células de cultura em condições de estresse oxidativo alterados. Estes resultados podem ser relevantes para a reavaliação do impacto dos inibidores da COX sobre a produção de PGI₂ vascular em pacientes submetidos a estresse oxidativo significativo.

Em relação ao RNF7, que apresentou $p = 0,002670$ e $fold\ change = 3,38$, a proteína codificada por este gene é uma proteína *really interesting new gene* (RING) *finger protein* altamente conservada. É uma subunidade essencial do SKP1-Cullin/CDC53-F, que são uma parte do mecanismo de degradação de proteínas importantes para a progressão do ciclo celular e da transdução de sinal. Foi demonstrado que essa proteína reage ao estresse oxidativo e protege as células de mamíferos contra apoptose por ser uma molécula antioxidante intracelular que pode atuar como um sensor redox para o aumento de estresse oxidativo induzido por danos (SWAROOP *et al.*, 1999).

A hipótese inicial de que a Vitamina C, que já demonstrou ser efetiva devido as suas propriedades tanto pró-oxidantes como antioxidantes em estudos com pacientes queimados, pudesse alterar a expressão de genes relacionados com o estresse oxidativo em fibroblastos dérmicos cultivados de pacientes com grande queimadura foi demonstrado, pois na comparação da suplementação com vitamina C ou não no meio de cultura resultou em 10 genes diferencialmente expressos e no caso hiperexpressos.

Na literatura, temos que a Vitamina C possui ação no estresse oxidativo, como na cicatrização, porém pouco se encontra sobre as dosagens utilizadas. Por isso, novos

estudos precisam ser realizados com o objetivo de atenuar o estresse oxidativo 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.

Como perspectivas, identificou-se também a necessidade de serem realizados novos projetos experimentais *in vitro*, para a definição de uma nova concentração da suplementação da Vitamina C ao meio de cultura, para correlacionar com os resultados obtidos no presente estudo, bem como a superdosagem na Vitamina C que também é utilizada em tratamentos de queimados, em especial nas primeiras 24 horas da fase aguda para diminuir o volume de rehidratação e do edema determinado pelo trauma, processo inflamatório e hidratação intensa administrada para o tratamento.

Além disso, novos projetos relacionados ao tempo de exposição da Vitamina C no meio de cultura precisam ser realizados para analisar a ação aguda e crônica na cultura de fibroblastos, contando também com um maior número de pacientes com queimadura envolvidos. Tais fatores também podem ser citados como as dificuldades encontradas no presente projeto, pois tanto a concentração da Vitamina C quanto o tempo de exposição à ela já foram mencionadas na literatura e possuem uma relação direta com os resultados na cicatrização de feridas, embora as concentrações encontradas na literatura variem muito.

O protocolo da suplementação utilizada no presente estudo foi baseada em projeto piloto, com foco inicialmente na manutenção do pH da cultura de fibroblastos, da manipulação da vitamina C para que não sofresse perda de função pois é fotossensível, e nas diferentes concentrações utilizadas nesse piloto até a definição da utilizada no presente estudo.

Os dados do presente trabalho são importantes, originais e determinam um painel inicial na literatura da ação da Vitamina C na cultura de fibroblastos de pacientes com queimadura grave.

Ressalta-se ainda, a importância da realização da expressão proteica para validar os genes encontrados e a realização de um novo estudo com base nos mesmos parâmetros utilizados. Assim, nos permitindo analisar os novos resultados obtidos e

reavaliando os genes e valores já encontrados, estimulando novos estudos por diferentes autores, pela falta de conhecimento no tema.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A ação da Vitamina C à cultura de fibroblastos da pele de pacientes com queimadura mostrou 10 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos, sendo os de maior interesse, DUOX1, GPX5, GPX2 e PTGS1.

8. REFERÊNCIAS

Bertin-Maghit M, Goudable J, Dalmas E, Steghens JP, Bouchard C, Gueugniaud PY, et al. Time course of oxidative stress after major burns. *Intens Care Med.* 2000;26:800–3.

Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J, et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med.* 1996;24:392–7.

Bustin SA. Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE. *Methods.* 2009;50(4):217-26.

Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255–66.

Carretero-Ortega J, Walsh CT, Hernández-García R, Reyes-Cruz G, Brown JH, Vázquez-Prado J. Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex-1), a guanine nucleotide exchange factor for Rac, mediates angiogenic responses to stromal cell-derived factor-1/chemokine stromal cell derived factor-1 (SDF-1/CXCL-12) linked to Rac activation, endothelial cell migration, and in vitro angiogenesis. *Mol Pharmacol.* 2010;77(3):435-42.

Cetinkale O, Senel O, Bulan R. The effect of antioxidant therapy on cell-mediated immunity following burn injury in an animal model. *Burns.* 1999;25:113–8.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Costantino G, Szabo A, Salzman AL, Caputi AP, et al. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br J Pharmacol.* 1997;121:1065–74.

Darr D, Combs S, Pinnell S. Ascorbic acid and collagen synthesis: rethinking a role for lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1993;307(2):331-5.

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.

Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(24):9748-52.

- Fujii J, Ikeda Y, Kurahashi T, Homma T. Physiological and pathological views of peroxiredoxin 4. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;83:373–9.
- Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral JM, Jeschke MG. Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock*. 2008;30(5):503-7.
- Gragnani A, Rossi MB, Albuquerque JC, Brito GS, Aloise AC, Ferreira LM. Keratinocyte growth factor protected cultured human keratinocytes exposed to oxidative stress. *Acta Cir Bras*. 2010;25(1):93-7.
- Greco 3rd 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.
- Gurbuz V, Corak A, Yegen BC, Kurtel H, Alican I. Oxidative organ damage in a rat model of thermal injury: the effect of cyclosporin A. *Burns*. 1997;23:37–42
- 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.
- Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemiareperfusion- induced microvascular injury. *Am J Physiol*. 1987;253:699–703.
- Hirakawa S, Saito R, Ohara H, Okuyama R, Aiba S. Dual oxidase 1 induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B in human epidermal keratinocytes. *J Immunol*. 2011;186(8):4762-70.
- Hosnuter M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*. 2004;30:121–5.
- Hristova M, Veith C, Habibovic A, Lam YW, Deng B, Geiszt M, Janssen-Heininger YM, van der Vliet A. Identification of DUOX1-dependent redox signaling through protein S-glutathionylation in airway epithelial cells. *Redox Biol*. 2014;15(2):436-46.

Jeschke MG, Mlcak RP, Finnerty CC, Norbury WB, Gauglitz GG, Kulp GA, Herndon DN. Burn size determines the inflammatory and hypermetabolic response. *Crit Care*. 2007;11(4):R90.

Jewo PI, Duru FI, Fadeyibi IO, Saalu LC, Noronha CC. The protective role of ascorbic acid in burn-induced testicular damage in rats. *Burns*. 2012 Feb;38(1):113-9.

Jordana M, Särnstrand B, Sime PJ, Ramis I. Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *Eur Respir J*. 1994;7(12):2212-22.

Kang ES, Iwata K, Ikami K, Ham SA, Kim HJ, Chang KC, Lee JH, Kim JH, Park SB, Kim JH, Yabe-Nishimura C, Seo HG. Aldose reductase in keratinocytes attenuates cellular apoptosis and senescence induced by UV radiation. *Free Radic Biol Med*. 2011;50(6):680-8.

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.

LaLonde C, Nayak U, Hennigan J, Demling RH. Excessive liver oxidant stress causes mortality in response to burn injury combined with endotoxin and is prevented with antioxidants. *J Burn Care Rehabil*. 1997;18:187-92.

Lu X, Kambe F, Cao X, Kozaki Y, Kaji T, Ishii T, Seo H. 3 β -Hydroxysteroid- Δ 24 Reductase Is a Hydrogen Peroxide Scavenger, Protecting Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Endocrinology*. 2008;149(7):3267-73.

Manuel J, Gragnani A, Ferreira LM. Ácido ascórbico intracelular diminui a indução à senescência celular, mas não a apoptose em fibroblastos expostos a concentrações subtóxicas de H₂O₂. *Rev Bras Queimaduras*. 2012;11(2):56-62.

Mock C, Peck M, Krug E, Haberal M. Confronting the global burden of burns: a WHO plan and a challenge. *Burns*. 2009;35(5):615-7.

Nebert DW & Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genetics*. 2004;1(6):460–4

Nguyen TT, Cox CS, Traber DL, Gasser H, Redl H, Schlag G, et al. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: the 1993 Moyer Award. *J Burn Care Rehabil*. 1993;14:602–9.

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

Padfield KE, Zhang Q, Gopalan S, Tzika AA, Mindrinos MN, Tompkins RG, Rahme LG. Local and distant burn injury alter immuno-inflammatory gene expression in skeletal muscle. *J Trauma*. 2006;61(2):280-92.

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;7(11):1383-93.

Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH, van Leyen K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem*. 2009;111(3):882-9.

Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008;34(1):6-17.

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLoS Genetics*. 2006;2(7):1084-96.

Saez JC, Ward PH, Gunther B, Vivaldi E. Superoxide radical involvement in the pathogenesis of burn shock. *Circ Shock*. 1984;12:229–39.

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.

Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *Journal of burn care & research*. 2010;31(6):849-73.

- Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg*. 1993;218:444–53.
- Smirnov A, Panatta E, Lena A, Castiglia D, Di Daniele N, Melino G, Candi E. FOXM1 regulates proliferation, senescence and oxidative stress in keratinocytes and cancer cells. *AGING*. 2016;8(7):1-13.
- Spanholtz TA, Theodorou P, Amini P, Spilker G. Severe burn injuries: acute and long-term treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(38):607-13.
- 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.
- Swaroop M, Bian J, Aviram M, Duan H, Bisgaier CL, Loo JA, Sun Y. Expression, purification, and biochemical characterization of SAG, a ring finger redox-sensitive protein. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):193-202.
- Tanaka H, Lund T, Wiig H, Reed RK, Yukioka T, Matsuda H, et al. High dose vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally injured rats. *Burns*. 1999;25:569–74.
- Tanaka H, Matsuda T, Miyagantani Y, Yukioka T, Matsuda H, Shimazaki S. Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration: a randomized, prospective study. *Arch Surg*. 2000;135(3):326-31.
- Tang A, Gilchrist BA. Regulation of keratinocyte growth factor gene expression in human skin fibroblasts. *Journal of dermatological science*. 1996;11(1):41-50.
- Till GO, Beauchamp C, Menapace D, Tourtellotte Jr W, Kunkel R, Johnson KJ, et al. Oxygen radical dependent lung damage following thermal injury of rat skin. *J Trauma*. 1983;23:269–77.
- Till GO, Hatherill JR, Tourtellotte WW, Lutz MJ, Ward PA. Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. Evidence of a role for hydroxyl radical. *Am J Pathol*. 1985;119:376–84.

- Toniolo A, Buccellati C, Pinna C, Gaion RM, Sala A, Bolego C. Cyclooxygenase-1 and prostacyclin production by endothelial cells in the presence of mild oxidative stress. *PLoS One*. 2013;8(2):1-6.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
- Vernet P, Rigaudière N, Ghyselinck N, Dufaure JP, Drevet JR. In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*. 1996;74(1):125-31.
- Ward PA, Till GO. Pathophysiologic events related to thermal injury of skin. *J Trauma*. 1990;30:S75-9.
- Wong T, McGrath JA, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1149-55.
- Zhou B, Xu W, Herndon D, Tompkins R, Davis R, Xiao W, et al. Analysis of factorial time-course microarrays with application to a clinical study of burn injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 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.icmje.org>

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: burn injury is a complex trauma with laborious treatment, serious economic and social repercussions mainly in public health. It is among the leading causes of morbidity and mortality. The thermal injury mediates a common systemic response, regardless of the location or extent of the injury, as well as specific responses adjacent or distant to trauma. Genes related to oxidative stress were differentially expressed in groups of patients with burns. Furthermore, significant reductions in the concentration of vitamin C have been reported in patients with major burns. Several studies have demonstrated the importance of Vitamin C in major trauma victims.

Objective: Evaluate the effect of Vitamin C in the expression of 84 oxidative stress genes in human fibroblasts cultured from patients with burn.

Methods: Skin fragments from ten burned patients (burn group) and eight healthy patients (control group). Were treated to culture of primary human fibroblasts conducted by explant method and distributed into 4 groups: GQ + (n = 10 - Burning fibroblasts treated with Vitamin C), GQ- (n = 10 - Burning fibroblasts without treatment), GC + (n = 8 - control fibroblasts treated with Vitamin C) and GC- (n = 8 - control fibroblasts without treatment). The gene expression analysis was done by qPCR Array, making six comparisons: 1) GC + versus GC-; 2) GQ- versus GC-; 3) GQ + versus GC-; 4) GQ- vs. GC + - 5) versus CG + versus GQ + and 6) GQ+ versus GQ-.

Results: Comparisons 1 and 3 showed no altered gene. Comparisons 2 and 4 showed the same sixty-five down-regulated genes. Comparison 5 had seventy-one down-regulated genes, with 64 were equal to 2 and 4. Comparison 6 showed 10 up-regulated genes.

Conclusion: Supplementation of Vitamin C in cultivated fibroblast cells from patients with burn injury showed alter the expression of ten genes related to oxidative stress, all showed hyper expressed, being those of greatest interest DUOX1, GPX5, GPX2 e PTGS1.

Keywords: 1. Burns; 2. Gene expression; 3. Oxidative Stress; 4. Ascorbic Acid; 5. Fibroblasts.

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

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

1 – Título do projeto: **“VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA”**.

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 de estresse oxidativo através de PCR Array em cultura de fibroblastos dérmicos 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: **“VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA”**.

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 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 – Grupos Queimados

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

1 – Título do projeto: **“VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA”**.

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 de estresse oxidativo através de PCR Array em cultura de fibroblastos dérmicos 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 com a mesma, e será enviada ao laboratório para cultivo.

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 entre o terceiro ou quarto dia após a queimadura, a pele normal ao redor da área da retirada do tecido morto será coletada e enviada 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 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, 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.

APÊNDICE 3

Descrição dos genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes presentes nas quatro comparações efetuadas entre GQ e GC.	
Genes	Informações
ALOX12	<p>Descrição: arachidonate 12-lipoxygenase, 12S Local: cromossomo 17 Categoria: Codificação de proteína Função: É uma lipoxigenase o que contribui para função da barreira epidérmica. Sinônimos: LOG12; 12-LOX; 12S-LOX Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/239</p>
DHCR24	<p>Descrição: 24-dehydrocholesterol reductase Local: cromossomo 1 Categoria: Codificação de proteína Função: Gene que codifica uma oxido-redutase dependente de flavina-adenina-dinucleótido (FAD), que catalisa a redução da ligação dupla dos intermediários de esterol delta-24 durante a biossíntese do colesterol. A proteína contém uma sequência líder que dirige-a para a membrana do retículo endoplasmático. Mutações neste gene têm sido associados com desmosterolose (<i>é uma doença autossômica recessiva caracterizada por múltiplas anormalidades congênitas e níveis elevados de um precursor do colesterol denominado DESMOSTEROL no sangue, tecidos e cultura celular</i>). Além disso, a expressão reduzida do gene ocorre no córtex temporal de pacientes com doença de Alzheimer e a sobre-expressão foi observada em células neoplásicas da glândula supra-renal . Sinônimos: DCE; SELADIN1; Nbla03646; seladin-1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1718</p>

DUOX1	<p>Descrição: dual oxidase 1 Local: cromossomo 15 Categoria: Codificação de proteína Função: A proteína codificada por este gene é uma glicoproteína e um membro da família da NADPH-oxidase. A síntese do hormônio tireóideano é catalisada por um complexo de proteínas localizado na membrana apical das células foliculares da tireóide. Este complexo contém um transportador de iodeto, tireoperoxidase, e um sistema gerador de peróxido que inclui proteínas codificadas por esse gene e o gene DUOX2 semelhante. Esta proteína é conhecida como <i>dupla oxidase</i> porque tem tanto um domínio de homologia com peroxidase e um domínio gp91phox. Caracteriza-se por gerar peróxido de hidrogénio e assim desempenha um papel na atividade da peroxidase da tireóide, a lactoperoxidase, e na defesa antimicrobiana mediada por lactoperoxidase nas superfícies mucosas. Duas variantes de transcritos de splicing alternativo que codifica a mesma proteína foram descritas para este gene. Sinônimos: LNOX1; THOX1; NOXEF1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53905</p>
GPX2	<p>Descrição: glutathione peroxidase 2 Local: cromossomo 14 Categoria: Codificação de proteína Função: Membro da família de glutathione peroxidase e codifica uma enzima glutathione peroxidase dependente de selênio que é uma das duas isoenzimas responsáveis pela maior parte da atividade de redução de peróxido de hidrogénio dependente da glutathione no epitélio do tracto gastrointestinal. A proteína codificada por este locus contém um resíduo de selenocisteína (Sec) codificada pelo códon UGA, que normalmente sinaliza terminação da sequência. Variantes de splicing alternativo de transcritos foram descritos . Sinônimos: GPRP; GPx-2; GI-GPx; GPRP-2; GPx-GI; GSHPx-2; GSHPX-GI Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2877</p>
GPX5	<p>Descrição: glutathione peroxidase 5 Local: cromossomo 6 Categoria: Codificação de proteína Função: Este gene pertence à família das glutathione-peroxidases. Ele é expresso especificamente no epidídimo no trato reprodutivo masculino dos mamíferos, e é regulado por androgênio. Ao contrário de outros mRNAs glutathione-peroxidases característicos, este mRNA não contém um códon de selenocisteína (UGA). Assim, a proteína codificada é independente de selênio, e tem sido proposto para desempenhar um papel na proteção das membranas dos espermatozoides dos efeitos nocivos da peroxidação de lípidos e/ou prevenir a reação prematura do acrossoma. Sinônimos: HEL-S-75p Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2880</p>

MGST3	<p>Descrição: microsomal glutathione S-transferase 3 Local: cromossomo 1 Categoria: Codificação de proteína Função: codifica um membro da família de proteínas de membrana associadas no metabolismo da glutathione e eicosanóides (MAPEG). Os membros desta família estão envolvidos na produção de leucotrienos e prostaglandinas, mediadores importantes da inflamação. Esta enzima também demonstra uma atividade de peroxidase dependente de glutathione no sentido de hidroperóxidos de lípidos. Sinônimos: GST-III Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4259</p>
PRDX4	<p>Descrição: peroxiredoxin 4 Local: cromossomo X Categoria: Codificação de proteína Função: A proteína codificada por este gene é uma enzima antioxidante e pertence à família peroxiredoxina e está localizada no citoplasma. As peroxidases da família peroxiredoxina reduzem o peróxido de hidrogênio e alquilo hidroperóxidos de água e álcool, com a utilização de equivalentes redutores derivados de moléculas doadoras contendo tiol. Esta proteína foi descrita como regulador na ativação do fator de transcrição NF-kappaB . Sinônimos: PRX-4; AOE372; AOE37-2; HEL-S-97n Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10549</p>
PREX1	<p>Descrição: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1 Local: cromossomo 20 Categoria: Codificação de proteína Função: A proteína codificada por este gene atua como um fator de troca do nucleotídeo guanina pertencente a família Rho de pequenas proteínas de ligação ao GTP (RhoGTPase), denominadas proteínas Rac. É encontrada principalmente no citoplasma, é ativada por fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato e as subunidades beta-gama das proteínas G heterotriméricas. Sinônimos: P-REX1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/57580</p>
PTGS1	<p>Descrição: prostaglandin-endoperoxide synthase 1 Local: cromossomo 9 Categoria: Codificação de proteína Função: Trata-se de um gene cuja expressão envolve enzimas catalizadoras da conversão do ácido araquidônico em prostaglandina. A proteína por ele codificada regula a angiogênese em células endoteliais e é inibida por medicamentos anti-inflamatórios não-hormonais, como a aspirina. Mais popularmente conhecido como Cicloxigenase 1 e 3 (COX1, COX3), participa da resposta inflamatória e na progressão/proliferação de tumores. Sinônimos: COX1; COX3; PHS1; PCOX1; PES-1; PGHS1; PTGHS; PGG/HS; PGHS-1 Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5742</p>

RNF7 Descrição: ring finger protein 7
Local: cromossomo 3
Categoria: Codificação de proteína
Função: A proteína codificada por este gene é uma proteína *RING* (*Really Interesting New Gene*) *finger protein* altamente conservada. É uma subunidade essencial do SKP1-Cullin/CDC53-F *box protein* ubiquitina ligases, que são uma parte do mecanismo de degradação de proteínas importantes para a progressão do ciclo celular e a transdução de sinal. Esta proteína interage com, e é um substrato de, caseína-quinase II (CSNK2A1/CKII). A fosforilação desta proteína por CSNK2A1 foi mostrado para promover a degradação de I κ B α (CHUK/IKK-alfa / IKBKA) e p27Kip1 (CDKN1B). Variantes de transcritos de splicing alternativo que codificam isoformas distintas têm sido relatados.
Sinônimos: SAG; ROC2; CKBBP1
Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9616>

ANEXO 1

PARECER DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VITAMINA C NA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS CULTIVADOS DE PACIENTES COM

Pesquisador: ALFREDO GRAGNANI FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14907613.1.0000.5505

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 269.015

Data da Relatoria: 10/05/2013

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO: Queimadura é um grande problema de saúde pública para o mundo. Ocorrem por ano, mais de 300.000 mortes causadas por acidentes com fogo, sem considerar as queimaduras por escaldamento, queimaduras elétricas, queimaduras químicas e outras formas que não têm suas estatísticas disponíveis em níveis globais. Durante uma queimadura, a nível molecular, tanto a ativação do sistema complemento como a estimulação de neutrófilos intravasculares resultam na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). A atividade aumentada de histamina, reforçada pelas propriedades catalíticas da xantina oxidase, provoca progressivos aumentos locais na permeabilidade vascular. Subprodutos tóxicos da xantina oxidase, incluindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH) parecem danificar diretamente estruturas dérmicas. A resposta inicial à queimadura é frequentemente associada com danos secundários a outros tecidos distantes do local lesado termicamente. Esta resposta parece ser mediada por EROs e neutrófilos ativados. A produção de EROs e ERNs em queimaduras pode ter implicações nas respostas mecânica, patológica e de sinalização celular em órgãos afetados, causando danos às células do sistema imunológico, atacando componentes celulares e prejudicando proteínas, lipídeos e DNA. Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido pelos radicais livres envolvem: (i) mecanismos de prevenção, (ii) mecanismos

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

Continuação do Parecer: 269.015

reparação, (iii) as defesas físicas e (iv) defesas antioxidantes. Defesas antioxidantes enzimáticas incluem a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT). Antioxidantes não enzimáticos são representadas por ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutatona (GSH), carotenóides, flavonóides, e outros antioxidantes (VALKO et al., 2007). A glutatona peroxidase é essencial para a conversão de glutatona em glutatona oxidada, quando o H₂O₂ é convertido em água. A vitamina C (ácido ascórbico) é um micronutriente solúvel em água, necessário para várias funções biológicas. Atua como cofator em reações enzimáticas, como na síntese de colágeno, e é um importante antioxidante no plasma humano, eliminando radicais livres e protegendo contra a peroxidação lipídica. Níveis plasmáticos reduzidos de vitamina C foram constatados em pacientes queimados que desenvolveram insuficiência múltipla de órgãos, em

comparação com níveis mais elevados em pacientes que não desenvolveram falência múltipla de órgãos.

MÉTODOS: O presente estudo possui um desenho de pesquisa experimental, in vitro, transversal, intervencional, analítico, controlado, realizado em centro único. Serão incluídos 3 pacientes com grande queimadura e 2 pacientes hígidos sem queimadura no grupo controle. Os grupos de estudo serão divididos em: Cultura de fibroblastos com ácido ascórbico de pacientes com queimadura; Cultura de fibroblastos com ácido ascórbico de pacientes sem queimadura; Cultura de fibroblastos sem ácido ascórbico de pacientes com queimadura; Cultura de fibroblastos sem ácido ascórbico de pacientes sem queimadura. A obtenção das amostras de pele necessárias para o desenvolvimento da pesquisa será realizada através do procedimento operatório padrão utilizado para o tratamento de queimados da Unidade de Terapia de Queimados -Disciplina de Cirurgia Plástica -UNIFESP-HU/HSP. A única diferença existente se dá em torno do destino da pele normal que é normalmente retirada durante o procedimento e descartada. Neste estudo, será utilizada essa pele normal que seria descartada, utilizando-a para a realização do experimento. A cultura será iniciada pelo método enzimático utilizando colagenase. Nos grupos de estudo que receberão suplementação com o antioxidante, será adicionado o Ascorbato de Sódio. As células serão homogeneizadas em reagente Trizol (Invitrogen). Após a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, a separação de fases será alcançada com clorofórmio e centrifugação. O precipitado de RNA a partir da fase aquosa será lavado com etanol 75%. O RNA será seco e dissolvido em água livre de RNase. O RNA total será purificado com Qiagen RNeasy Minikit de DNase e submetidos a tratamento. Será utilizado um volume de 750ng/mL de RNA de cada paciente para a síntese de cDNA por transcrição reversa. As amostras serão previamente tratadas com uma solução tampão do kit e, para as reações de transcrição reversa, serão tratadas

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

Continuação do Parecer: 269.015

com RT2 First Strand Kit da Superarray Bioscience, de acordo com o protocolo do fabricante. RT-PCR será realizado por meio do RT2 Profiler® PCR array da Superarray Bioscience. Para cada paciente, 84 genes marcadores de estresse oxidativo, do kit RT² Profiler₂ PCR Array Human Oxidative Stress serão analisados.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação da vitamina C na expressão de 84 genes relacionados com o estresse oxidativo em fibroblastos dérmicos cultivados da pele de pacientes com queimadura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As amostras de pele necessárias para o desenvolvimento da pesquisa serão obtidas através do procedimento operatório padrão utilizado para o tratamento de queimados da UTI-Disciplina de Cirurgia Plástica -UNIFESP-HU/HSP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Espera-se que as células dérmicas tratadas com o ácido ascórbico, provenientes de pacientes com queimadura, quando comparadas ao grupo controle, alterem o padrão de expressão dos 84 genes relacionados ao estresse oxidativo que serão analisados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados (FOLHA DE ROSTO, PROJETO DE PESQUISA E TCLE para o grupo estudo e controle)

Recomendações:

Ainda que o TCLE esteja compreensível, sugiro que o pesquisador simplifique-o um pouco mais, suprimindo trechos e trocando expressões técnicas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM INADEQUAÇÕES

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado pelo colegiado

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



Continuação do Parecer: 269.015

SAO PAULO, 10 de Maio 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.