

RAFAEL DE MORAES PETECOF

**EXPRESSÃO GÊNICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES
EM QUELOIDE**

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

SÃO PAULO

2016

RAFAEL DE MORAES PETECOF

**EXPRESSÃO GÊNICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES
EM QUELOIDE**

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

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO GRAGNANI FILHO

COORIENTADORES: PROFA. SILVANA A. A. CORREA

PROF. SAMUEL M. RIBEIRO DE NORONHA

SÃO PAULO

2016

Petecof, Rafael de Moraes

Expressão gênica de neurotrofinas e receptores em quelóide./ Rafael de Moraes Petecof. -- São Paulo, 2016.
xix, 86f.

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

Título em inglês: Gene expression of neurotrophins and receptors in keloid.

1. Quelóide; 2. Expressão Gênica; 3. Cicatrização; 4. Fator de crescimento neural.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À minha **FAMÍLIA**, pelo bom exemplo.

Aos meus **AMIGOS**, pelo companheirismo.

Ao **PROFESSOR DOUTOR BERNARDO HOCHMAN**, *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Ao **PROFESSOR DOUTOR BERNARDO HOCHMAN** (*in memoriam*), desbravador do tema cicatrização alterada e queiloide, pelo suporte inicial na discussão do projeto, e ao **Dr. FELIPE CONTOLI ISOLDI** e aos **MÉDICOS RESIDENTES** pelos atos operatórios na Casa da Cirurgia Plástica que tornaram possível a obtenção de amostras de queiloide para a realização do presente estudo.

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

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL** e à **CAPES** pela bolsa que me foi concedida.

Sumário

Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas e Quadros.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Símbolos e Unidades de Medida	xviii
RESUMO	xix
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA	8
4. MÉTODOS	28
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	66
8. REFERÊNCIAS	68
ABSTRACT.....	74
Apêndice 1	75
Apêndice 2	78
Apêndice 3	81
Apêndice 4	84

Lista de Figuras

Figura 1 - Queloides em lóbulo de orelha, área de coleta das amostras de queloides para o presente estudo.....	29
Figura 2 - Gráfico representando os 12 genes diferencialmente expressos, relacionados às neurotrofinas e receptores, no grupo queloides de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].....	42
Figura 3 - <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, representando a expressão dos genes relacionados às neurotrofinas e receptores no grupo queloides de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].....	43
Figura 4 - <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, representando a expressão dos genes relacionados às neurotrofinas e receptores do grupo queloides de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].....	44
Figura 5 - Análise por Metacore® de genes de queloides de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. <i>Network 01</i> (c-Jun, CREB1, NF-kB, c-Src, PSPN). Ontologias Gênicas relacionadas: via de sinalização do receptor Fc, via de sinalização da proteína do receptor ligado à enzima, a sinalização do receptor Fc-epsilon, a via de sinalização da proteína do receptor transmembranar da tirosina quinase, via de sinalização do receptor de superfície da resposta de imunoregulação celular.....	47
Figura 6 - Análise por Metacore® de genes de queloides de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. <i>Network 02</i> (c-Jun, Elk-1, c-Fos, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, NPY). Ontologias Gênicas relacionadas: resposta celular ao estímulo do fator de crescimento, a resposta ao fator de crescimento, desenvolvimento de projeções neuronais, regulação da herança de Golgi, a ativação da atividade de MAPK.....	48

Lista de Figuras

Figura 7 - Análise por Metacore® de genes de quelóide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network* 03 (PU.1, MIF, cPLA2, PREB, ABCA1). Ontologias Gênicas relacionadas: resposta ao composto que contém oxigênio, regulação positiva da fosforilação proteica, resposta ao composto organonitrogenados, regulação positiva de fosforilação e regulação positiva do processo metabólico do fósforo.....49

Figura 8 - Análise por Metacore® de genes de quelóide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network* 04 (c-Jun, Fyn, c-Fos, 4E-BP1, p70 S6 kinase1). Ontologias Gênicas relacionadas: via de sinalização da proteína do receptor ligado à enzima, via de sinalização da proteína transmembrana do receptor tirosina-quinase, resposta aos compostos organonitrogenados, resposta aos compostos nitrogenados, e resposta celular a substâncias orgânicas.....50

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1 - Dados de média de idade e gênero dos pacientes incluídos no estudo e que compõe o Banco de RNA e de fragmentos de queiloide.....	31
Tabela 2 - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo controle obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.....	32
Tabela 3 - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo queiloide obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.....	32
Quadro 1 - Painel de 84 genes humanos relacionados às neurotrofinas e receptores presentes na placa de PCR <i>Array</i> (PAHS-031Z).....	34
Tabela 4 - Genes diferencialmente expressos em relação às neurotrofinas e receptores de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n= 2].....	45

Lista de Abreviaturas

α -TuJ1: α - β -III-tubulin TuJ-1

α -NF-H: α -neurofilament-H

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone*)

ARTN: *artemin*

Array: ordem de arranjos de poços em uma placa de PCR

BALB/c: linhagem de camundongo para uso em experimentos

BAX: *BCL2 associated X*

BCL2: LLC das células-B / linfoma 2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*)

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic fator*)

BMP7: proteína morfogenética óssea-7 (*bone morphogenetic protein-7*)

BNP: peptídeo natriurético tipo B (*B-type natriuretic peptide*)

BrdU: bromodeoxiuridina (*bromodeoxyuridine*)

BSYQ: BuShenYiQi, composto de três ervas, *Radix Astragali, Herba Epimedii e Rehmanniae Radix*

CCKAR: receptor A de colecistoquinina (*cholecystokinin A receptor*)

CCKBR: receptor B de colecistocinina (*cholecystokinin B receptor*)

CD2AP: *CD2-associated protein*

CDKNIC: é uma proteína inibidora de quinase membro da família KIP

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa, da UNIFESP

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene related peptide*)

CGRP-CGRP1R: receptor de CGRP

CNS: sistema nervoso central (*central nervous system*)

CNTF: fator neurotrófico ciliar (*ciliary neurotrophic factor*)

CIN85: CBL-interacting protein 85 kDa

Cox-2: ciclooxigenase-2 (*cyclooxygenase-2*)

COL1A2: colágeno tipo 1 alfa 2 (*collagen type I alpha 2*)

Cq: limiares máximo e mínimo da fase exponencial do ciclo de reação (*quantification cycle*)

Ct: limiar do ciclo (*threshold cycle*)

CRH: hormônio liberador de corticotropina (*corticotropin releasing hormone*)

CRHR1: receptor 1 de liberação do hormônio corticotropina (*corticotropin releasing hormone receptor 1*)

CRHR2: receptor 2 de liberação do hormônio corticotropina (*corticotropin releasing hormone receptor 2*)

CRPS: Síndrome Dolorosa Regional Complexa (*Complex Regional Pain Syndrome*)

CYP11A1: enzima de clivagem da cadeia lateral, citocromo P450 membro 1 da família 11 subfamília A (*cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1*)

CYP11B1: 11-hidroxilase tipo 1, citocromo P450 membro 1 da família 11 subfamília B (*cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1*)

CYP17: 11 β -hidroxilase (*11 β -hydroxylase*)

CTGF: fator de crescimento do tecido conectivo (*connective tissue growth factor*)

DBH: dopamina beta-hidroxilase

DCP: Disciplina de Cirurgia Plástica

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNase: desoxirribonuclease, enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de ligações fosfodiéster da molécula de DNA

DRG: gânglios da raiz dorsal (Dorsal Root Ganglia)

EIA: imunoenensaio enzimático (*enzyme immunoassay*)

ELISA: ensaio imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*)

ELK1: ELK 1, fator de transcrição ETS (*ELK1, ETS transcription factor*)

EPM: Escola Paulista de Medicina

ErB2: receptor de tirosina-quinase

FBS: soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

FN1: fibronectina 1 (*fibronectin 1*)

FPCL(s): população de células aderidas em uma malha de colágeno 3D (*fibroblast-populated collagen lattices*)

FSR2 β : substrato 2 beta do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor receptor substrate 2 beta*)

FRS3: substrato 3 do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor receptor substrate 3*)

G361: linhagem celular de células de melanoma maligno humano

GALP: peptídeo semelhante à galanina (*galanin-like peptide*)

GALR2: subtipo 2 do receptor de galanina (*galanin receptor 2*)

GALR3: subtipo 3 do receptor de galanina (*galanin receptor 3*)

GDNF: fator neurotrófico de linhagem celular derivada da glia (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*)

GFR α 1: receptor alfa 1 da família GDNF (*GDNF family receptor alpha 1*)

GFL: família de ligantes de fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (*glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands*)

gp 130 = proteína gp130 que é expressa pelo gene IL6ST (IL6ST = GP130)

GRP: peptídeo de liberação da gastrina (*gastrin-releasing peptide*)

GRPR: receptor de peptídeo de liberação da gastrina (*gastrin-releasing peptide receptor*)

HNOKs: células de queratinócitos humanos normais (*human normal oral keratinocytes*)

HOX: genes que delimitam identidades posicionais distintas, de expressão sítio-específicas, na diferenciação celular e morfogênese tecidual durante a embriogênese

HPA: hipotalâmico pituitário-adrenal (*Hypotalâmico Pituitary-Adrenal*)

HSP(s): proteína(s) de choque térmico

hsp27 = HSPB1

HSPB1: proteína 1 de choque térmico 27 kDa (*heat shock 27 kDa protein 1*)

IFN- γ : interferon-gama

IgE: imunoglobulina IgE

IL-1 β : interleucina 1 beta (*interleukin 1 beta*)

IL-4: interleucina 4 (*interleukin 4*)

IL-5: interleucina 5 (*interleukin 5*)

IL-6: interleucina 6 (*interleukin 6*)

IL-6R α : receptor α da interleucina 6

IL6ST: interleucina 6 transdutora de sinal (*interleukin 6 signal transducer*)
iNOS: indução de síntese de NO (*inducible NO synthase*)
JAK1: Janus quinase 1 (*Janus kinase 1*)
KF: fibroblastos de queiloide (*keloid fibroblasts*)
LC-MS/MS: espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (*liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry*)
LED: emissão de luz por diodo (*Light Emitting Diode*)
LETO: ratos de linhagem Long-Evans Tokushima
LLLT: laser terapêutico de baixo nível energético (*Low Level Laser Therapy*)
LPS: lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide*)
LY303870: receptor seletivo de NK1
MADCAM1: molécula adressina vascular 1 de adesão celular da mucosa (*mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1*)
MAGED1: *MAGE family member D1*
MAP: proteína ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein*)
MC2R: hormônio adrenocorticotrópico, receptor de melanocortina 2 (*melanocortin 2 receptor*)
MCT: tomografia microcomputadorizada (*micro computed tomography*)
MEC: matriz extracelular
MMP-9: *matrix metalloproteinase 9*
MOR1D: isoforma do receptor μ -opioide (MOR)
Mrgpra3: GPR relacionado ao MAS, membro A3 (*MAS-related GPR*)
mRNA: RNA mensageiro
MT: metalotioneína (*metallothionein*)
MT-1A: metalotioneína 1A (*metallothionein 1A*)
MT-1E: metalotioneína 1E (*metallothionein 1E*)
MT-1F: metalotioneína 1F (*metallothionein 1F*)
MT-1X: metalotioneína 1X (*metallothionein 1X*)
MT-2A: metalotioneína 2A (*metallothionein 2A*)
MT3: metalotioneína 3 (*metallothionein 3*)

NF: fibroblastos de pele normal (*normal human dermal fibroblasts*)

NGF: fator de crescimento neural (*nerve growth factor*)

NK1: um dos receptores de SP

NMBR: receptor de neuromedina B

NO: óxido nítrico (*nitric oxide*)

NPRA: receptor A do peptídeo natriurético (*natriuretic peptide receptor A*)

NPY: neuropeptídeo Y

NPY2R: receptor Y2 do neuropeptídeo Y (*neuropeptide Y receptor Y2*)

NR3C1: receptor glucocorticoide, receptores nucleares da subfamília 3 membro do grupo C 1 (*nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*)

Nrf2: fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NRTN: neurturina (*neurturin*)

NSPC: células tronco/progenitoras neurais de camundongo (*mouse neural stem/progenitor cell*)

NT-3: *NT3 3'-nucleotidase*

OLETF: ratos de linhagem Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty

OVA-IgE: imunoglobulina IgE para ovalbumina

OSCC: carcinoma oral de células escamosas (*oral squamous cell carcinoma*)

PAHS-031Z: placa de 84 genes para neurotrofinas e receptores (*Human Neurotrophins & Receptors PCR Array*)

PAI-2: serpina inibidora de peptidase, clade B (ovalbumina), membro 2 [*serpinpeptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2*]

PARs: receptores ativados por protease (*protease-activated receptors*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

PCR Array: arronjo ordenado, em uma placa, de PCR

PGP 9.5: produto do gene da proteína 9.5

POMC: CRH/pró-opiomelanocortina (*CRH/proopiomelanocortin*)

POU1F1: é um fator de transcrição membro da família POU

PSPN: persefina (*persephin*)

qPCR: reação em cadeia da polimerase, quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*)

RAF1: Raf-1 proto-oncogene, serina / treonina cinase (*Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*)

RET: receptor da tirosiana cinase (*receptor tyrosine kinase*)

RNA: ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RT: transcrição reversa (*reverse transcription*)

RT²: amplificação em tempo real (*real time amplification*)

RT-qPCR: PCR quantitativa a partir de uma transcrição reversa (*quantitative reverse transcription PCR*)

siRNA(s): sequências curtas de RNA de interferência (*small interfering RNA*)

SNAI1: é um fator inibidor de transcrição membro da superfamília *snail*

SOM: somatostatina

SP: substância P

SP-NK1R: receptor de SP

SFXN1: *sideroflexin 1*

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)

SNS: linhagem de camundongo na qual falta o gene gp130 em neurônios sensoriais

STAT3: transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*)

T CD4+: linfócitos T com glicoproteínas de membrana CD4

TGF-β: fator de transformação do crescimento beta (*transforming growth factor beta*)

TLRs: receptores toll-like (*toll-like receptors*)

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa (*TNF tumor necrosis factor alpha*)

TRPA1: receptor de potencial transitório da subfamília A1 (*transient receptor potential subfamily A1*)

TRPV1: receptor de potencial transitório da subfamília vaniloide 1 (*transient receptor potential subfamily vanilloid 1*)

UNIFESP: Universidade Federal de São Paulo

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial (*vascular endothelial growth factor*)

WST-1: um kit de reagentes para verificar a proliferação de células, da empresa Roche

Lista de Símbolos e Unidades de Medida

%: por cento

>: sinal de maior que

<: sinal de menor que

°C: graus Celsius

g: grama

kDa: kilodaltons

kg: quilograma

mg: miligrama

ml: mililitro

ng/ml: nanogramas por mililitro

nmol: nanomol

pg/ml: picograma por mililitro

pmol: picomol

µg: micrograma

RESUMO

Introdução: A fibrose resultante do processo de cicatrização pode ser mais acentuada que o normal formando cicatriz hiperproliferativa na pele, tal como cicatriz hipertrófica e queiloide, das quais esta última é exclusiva dos seres humanos. Ambas as cicatrizes apresentam maior número de fibras nervosas, se comparadas à pele normal, sugerindo que neurotrofinas e neuropeptídeos estariam envolvidos na origem, manutenção e recidiva pós-operatória dessas cicatrizes. **Objetivo:** Avaliar a expressão de 84 genes relacionados às neurotrofinas e receptores em queiloide. **Métodos:** Foram coletadas doze (12) amostras de queiloide no grupo queiloide e doze (12) amostras de pele normal no grupo controle. O RNA total foi purificado com *Qiagen RNeasy Minikit de DNase* e a quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria. O mRNA foi usado para a síntese de cDNA. As reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT² First Strand Kit da Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante e a RT-qPCR foi realizada usando o *RT² Profiler® PCR array da Superarray Bioscience*, onde foram analisados 84 genes humanos relevantes envolvidos na síntese de neurotrofinas e seus respectivos receptores – *Human Neurotrophins & Receptors PCR Array (PAHS-031Z)*. **Resultados:** Doze (12/84 ou 14%) genes - HSPB1, GRPR, CRHR2, NPY2R, 1L6ST, NGF, MT3, BCL2, CCKAR, PSPN, GALR2 e FRS3 foram diferencialmente expressos no queiloide. **Conclusão:** Os genes diferencialmente expressos, 100% hipoexpressos, em queiloide comparado à pele normal, e os genes prioritários são HSPB1, GRPR, CRHR2, NGF, MT3 e BCL2.

Palavras-chave: 1. Queiloide; 2. Expressão Gênica; 3. Cicatrização; 4. Fator de crescimento neural.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Traumas complexos como a queimadura podem determinar sequelas estéticas e funcionais, em especial, cicatriz de pele com intensa fibrose, podendo ser diagnosticada como cicatriz hipertrófica ou quelóide (CAMPANER *et al.*, 2006). O quelóide é uma lesão fibrosa que cresce além da margem da cicatriz original, por um longo período, geralmente não regride espontaneamente e pode apresentar recidiva após o tratamento (FERREIRA *et al.*, 2009; RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA, 2009; FURTADO *et al.*, 2012). A recidiva do quelóide é frequente após tratamento, necessitando que se desenvolvam novas tecnologias com resultados efetivos (UMEMURA *et al.*, 2011).

O quelóide apresenta um número de fibras nervosas por unidade de área maior que a pele normal (HOCHMAN *et al.*, 2008). A cicatrização é passível de complicações funcionais por deposição excessiva de colágeno decorrente de eventual desequilíbrio de neuropeptídeos na pele (FERREIRA *et al.*, 2009). Neuropeptídeos podem atuar como neurotransmissores ou ter função neuromoduladora como se fossem hormônios ou fatores de crescimento. Existem mais de 50 neuropeptídeos liberados por células nervosas e células do sistema imunológico (LOTTI, HAUTMANN, PANCONESI, 1995). Estímulos na pele podem alterar seu sistema nervoso. Sob estresse mecânico a pele pode elevar a produção da substância P (SP), do produto de gene da proteína 9.5 (PGP 9.5), de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e de fator de crescimento neural (NGF) pelas fibras nervosas (YAMAOKA *et al.*, 2007).

Comparada à cicatriz normal, a cicatriz hipertrófica apresenta maior concentração de fibras nervosas. As fibras nervosas nociceptivas estariam envolvidas com a formação da cicatriz hipertrófica, sugerindo que moléculas antagonistas de SP teriam potencial no desenvolvimento de futuros tratamentos (PARKHOUSE *et al.*, 1992). O quelóide deve ser diferenciado da cicatriz hipertrófica pelas suas características clínicas, no entanto, a distinção molecular entre eles ainda gera controvérsias, e ainda não existe um tratamento apropriado para o quelóide (DE FELICE *et al.*, 2009).

O quelóide é uma cicatriz anormal exclusiva de humanos, em indivíduos com

predisposição genética, que pode se desenvolver após queimadura, cirurgia ou após inflamação ocasionada por acne (BOCK *et al.*, 2005). O quelóide é caracterizado pela proliferação dos fibroblastos, apresenta um incremento do acúmulo de matriz extracelular (MEC) e excesso de tecido fibroso fora dos limites da ferida. Considera-se que a formação do quelóide seria resultado de alterações na expressão gênica de fibroblastos, pois com um experimento de microarranjos de DNA foi constatado que fibroblastos de tecido de quelóide, diferentemente do que ocorre com tecido normal, expressavam genes marcadores de condrócitos e osteócitos (NAITOH *et al.*, 2005).

Estudos apontam que neurotrofinas e neuropeptídeos intermedeiam a ação do sistema nervoso central sobre tecidos periféricos durante estresse tanto quanto os hormônios clássicos do estresse, assim como, maiores concentrações de neuropeptídeos promovem o desenvolvimento de neurônios na pele que geram maior produção de SP e CGRP, neurotransmissores responsáveis pela inflamação neurogênica (JOAQUIM *et al.*, 2007). Com níveis normais de SP ocorre a resposta neuroinflamatória que promove a cicatrização, porém, caso a resposta neuroinflamatória seja excessiva haverá promoção de mitose por maior período de tempo, assim como, maior produção de citocinas, de fatores de crescimento e de matriz extracelular resultando em hiperemia e prurido (SCOTT, MUANGMAN, GIBRAN, 2007).

A incidência na formação do quelóide varia entre os diferentes fototipos cutâneos, o que é um indicio de que fatores neuromelanogênicos, como a radiação ultravioleta, interfeririam na formação desta cicatriz fibroproliferativa (HOCHMAN *et al.*, 2012). Estímulos de diferentes origens, como física, química ou psicofisiológica podem sinalizar positivamente a atividade neurosecretória de nociceptores na pele podendo dar início à inflamação neurogênica. A inflamação neurogênica aumenta o fluxo sanguíneo e promove o edema na pele, um dos vasodilatadores mais eficientes nesse processo é a substância P, que também estimula as células endoteliais a liberar óxido nítrico, enquanto que o CGRP tem ação pró-inflamatória ativando células como macrófagos, fibroblastos, melanócitos, queratinócitos, células dendríticas e linfócitos B e T, e estas promovem o edema através da liberação de IL-1 e IL-8 que apresentam quimiotaxia para neutrófilos. Células do sistema imune podem ser ativadas por processos como edema, eritema, hipertermia e prurido, e então estas células liberam

prostaglandinas, histamina, citocinas, proteases e imunoglobulinas na pele (FREITAS *et al.*, 2015).

No presente estudo, tem-se como hipótese que a expressão diferenciada de neurotrofinas e receptores poderia determinar essa proliferação de terminações nervosas encontrada na pele que resultaria na formação de quelóide. A análise dos genes diferenciados, que podem ser futuros marcadores da formação de quelóide, permitiria o uso de substâncias inibitórias, assim como de substâncias que promovam o aumento da expressão gênica, para o tratamento definitivo do quelóide.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar a expressão de 84 genes relacionados às neurotrofinas e receptores em queiloide.

LITERATURA

3. LITERATURA

HOCHMAN *et al.* (2005) utilizaram seis grupos de três animais cada, da espécie *Mesocricetus auratus*, ou hamster, nos quais foram cirurgicamente enxertados fragmentos de queiloide, provenientes de uma paciente não branca de 27 anos, entre as camadas epiteliais nas bolsas das bochechas. Após a realização dos enxertos, um enxerto em cada bochecha de cada animal, os grupos foram divididos de acordo com os dias nos quais os animais seriam sacrificados: grupo A, 5 dias; grupo B, 12 dias; grupo C, 21 dias; grupo D, 42 dias; grupo E, 84 dias; grupo F, 168 dias. Nos grupos D, E e F, ao serem observados os fragmentos de queiloide ao microscópio, foram encontrados melanócitos e formações císticas com secreção de queratina no epitélio. Embora a origem do queiloide seja controversa, a presença de melanócitos sugere a participação do sistema nervoso na formação desta cicatriz.

RINN *et al.* (2006) investigaram os padrões de diferenciação celular de tecidos adultos em diferentes regiões do corpo. Para isto analisaram o padrão de expressão gênica global de 47 populações de fibroblastos, propagadas em cultura primária sob as mesmas condições até a quinta passagem, de 43 áreas diferentes do corpo humano. Foram utilizados fibroblastos cultivados que expressavam marcador mesenquimal específico, chamado vimentina, e que ao mesmo tempo não expressassem marcadores específicos de linhagem de outras células, como células epiteliais, células musculares, células endoteliais, células neurais e macrófagos. As regiões do corpo abrangeram diversas estruturas anatômicas, como braços, mãos, pernas, pés e órgãos internos, havia amostras de muitas partes do corpo de um mesmo doador e das mesmas partes do corpo de diferentes doadores. O perfil de expressão gênica global de cada uma das populações de fibroblastos foi avaliada por hibridização de RNA mensageiro previamente marcado com microarranjos de cDNA contendo 41.121 elementos, representando 24.421 genes únicos. Os pesquisadores focaram em genes que pudessem ser mensurados em 70% das amostras e dos quais a variação da expressão fosse de pelo menos 3 vezes ao da média entre todas as amostras em 5 ou mais amostras e 7.580 genes passaram neste critério. As amostras e os genes foram agrupados aleatoriamente para examinar a relação entre eles, das 47 amostras foram analisados 7.580 genes, e 35 das 47 amostras foram agrupadas em aglomerados nos quais as populações de fibroblastos eram originárias da mesma

região anatômica. Com estes dados foi possível desenvolver um modelo global e identificar genes específicos que prediziam a origem anatômica dos fibroblastos. Este padrão formado pelas interações locais evidenciou que os perfis de similaridade da expressão genética das células são inversamente proporcionais às distâncias entre os locais anatômicos de onde estas células provêm. Quanto maior a distância entre as células maior é a complexidade nas diferenças encontradas na expressão gênica entre os diferentes grupos de genes diferencialmente expressos, porém a posição relativa no eixo anatômico seria mais importante do que apenas as distâncias entre as células, revelando diferenças regionais de expressão diferencial entre os grupos de genes. Segundo os pesquisadores, os fibroblastos de tecidos adultos poderiam ser essenciais na referência de posição no corpo possibilitando o desenvolvimento e a fisiologia próprios de cada tecido. Constatou-se que o padrão na expressão gênica global dos fibroblastos de cultura apresentava uma variação mais expressiva dentre os agrupamentos por origem anatômica dos fibroblastos do que dentre os diferentes doadores. Os perfis de expressão gênica dos diferentes agrupamentos de fibroblastos dividem o corpo humano em duas regiões principais, anterior e posterior, por exemplo, no tronco acima da cicatriz umbilical existe um padrão de expressão gênica enquanto abaixo da cicatriz umbilical existe outro padrão, e também foram notados perfis de expressão gênica específicos para os membros superiores e para os membros inferiores. Outro perfil de expressão gênica diferenciado encontrado distingue grupos de fibroblastos dérmicos e fibroblastos de órgãos internos. Os grupos de fibroblastos da região distal de membros superiores, membros inferiores e pênis apresentavam padrão de expressão gênica com grande similitude. Os pesquisadores constataram que os fibroblastos também mantêm características, *in vitro* e *in vivo*, do código HOX, código no qual as expressões de diferentes genes específicos em posições específicas do corpo durante a diferenciação celular da morfogênese tecidual na embriogênese, sugerindo que os fibroblastos mantêm a sua identidade posicional desde o desenvolvimento embrionário. O padrão transcricional nos fibroblastos se manteve *in vitro* até a quinta passagem sugerindo que os fibroblastos diferenciados possuem mecanismos eficientes na manutenção da estabilidade da informação epigenética necessária para a diferenciação anatômica específica.

MICERA *et al.* (2006) estudaram os efeitos do NGF, em cultura primária de

fibroblastos e de queratinócitos, na diferenciação celular, migração, proliferação e produção de matriz extracelular. Foram investigados, com técnicas bioquímicas e moleculares, os efeitos do NGF nas funções de fibroblastos e queratinócitos humanos. Na presença de NGF não houve alterações na frequência de mitoses e na concentração de colágeno, porém os fibroblastos e os queratinócitos se diferenciaram em miofibroblastos e estes últimos passaram a expressar metaloproteinases do tipo MMP-9. Os autores propuseram que onde o NGF se ligou foram nos receptores trkANGFR e p75NTR de fibroblastos e de queratinócitos.

SCHMIDHUBER *et al.* (2007) foram os primeiros a investigar se o peptídeo semelhante à galanina, *galanin-like peptide* (GALP), estaria envolvido na modulação inflamatória do edema periférico. Eles observaram que o extravasamento plasmático na pele é estimulado ao injetar a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), em pele de camundongos. O cDNA foi obtido a partir do mRNA isolado da pele dorsal de camundongos e de linhagens de células. O mRNA do subtipo 1 do receptor de galanina não foi expresso, o receptor GALR3 teve pouca expressão de mRNA e o GALR2 foi o mais expresso. Em outro experimento com células humanas, endotelial microvascular dermal e de músculo liso de artéria de cordão umbilical, não foram expressos receptores de galanina subtipo 1, GALR 2 e GALR3. A galanina, a 1 pmol, extinguiu o edema do mesmo modo que a endotelina. Foi observado que a galanina age de modo dose-dependente na inibição da formação do edema e quanto maior a dose menor o efeito. Também foi constatado que a galanina pode inibir a formação de edema não neurogênico provocado por CGRP. Segundo os pesquisadores duas podem ser as formas de atuação de peptídeos de galanina na modulação do edema: inibindo a permeabilidade microvascular e reduzindo o fluxo sanguíneo da pele. A galanina poderia ter uma ação vasoconstritora ou de interferência na sinalização de SP e CGRP, partindo desta hipótese, os pesquisadores investigaram a atuação pós-sináptica da galanina e do GALP no extravasamento de plasma, acompanhados das moléculas SP e CGRP, e a hipótese foi comprovada experimentalmente. Segundo os pesquisadores a galanina e o GALP tem potencial no controle terapêutico da inflamação e apresentam a propriedade de diminuir o edema inflamatório devido à diminuição do fluxo sanguíneo microvascular e vasoconstrição na pele.

GHAZIZADEH *et al.* (2007) investigaram a função que a interleucina 6,

interleukin 6 (IL-6), e seu receptor IL-6R α desempenhariam na expressão gênica de matriz extracelular e síntese de colágeno na patogênese do quelóide. Ao adicionarem IL-6 em meio de cultura de fibroblastos dérmicos humanos normais (NF) verificaram que houve aumento na expressão de mRNAs de COL1A2 e FN1, enquanto que a inibição de IL-6 e IL-6R α , por seus respectivos anticorpos adicionados à cultura de fibroblastos de quelóide (KF), resultou em diminuição dose-dependente de mRNAs de COL1A2 e FN1. No experimento ao qual se utilizou anticorpos para neutralizar IL-6R α foi verificado que a taxa de crescimento de KF declinou até ficar próxima à taxa de crescimento observada em NF. Pela técnica da PCR semiquantitativa foi verificado que os genes IL-6, IL-6R e IL6ST estavam hiperexpressos em KF comparados com NF e que os mRNAs de JAK, STAT3, RAF1 e ELK1 também estavam hiperexpressos em KF comparados com NF. Por meio da técnica de ELISA foi demonstrado que havia maior concentração de IL-6 no meio de cultura de células KF comparado ao meio de cultura de células NF. Embora a diferença não tenha sido significativa, foi observado que a partir de 4 dias em cultura os KF apresentam taxa de crescimento maior que a de NF. Em teste imunohistoquímico realizado em 10 quelóides, congelados ou fixados em formalina, foi detectada hiperexpressão de IL-6, IL-6R α e ELK1 em 8 quelóides, IL6ST e RAF1 em 6 quelóides e STAT3 em 7 quelóides. Diante dos resultados do estudo os autores concluíram que a citocina inflamatória IL-6 e sua via de sinalização devem estar envolvidas com a patogênese do quelóide, desde a proliferação dos fibroblastos até o aumento de colágeno.

HOCHMAN *et al.* (2008) compararam as fibras nervosas de amostras de quelóide com pele normal. As amostras foram obtidas de pacientes que passaram por cirurgia para remoção de quelóide, foram selecionadas vinte e sete mulheres não caucasianas, entre 15 e 55 anos, com quelóide de pelo menos um ano de evolução, da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo. Amostras de cinco milímetros foram coradas com hematoxilina e eosina, também foram submetidas à análise imunohistoquímica com o anticorpo para a proteína S100, posteriormente os cortes histológicos foram analisados por software *Image Tool*. Foi observado que as fibras nervosas em quelóide além de mais finas e mais numerosas se apresentaram mais alongadas que as fibras nervosas de pele normal. E, além disso, no quelóide as fibras nervosas se apresentaram mais comprimidas entre a matriz extracelular quando

comparadas às fibras nervosas de pele normal.

AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU (2008) propuseram a hipótese da inflamação neurogênica. Esta hipótese postula que o estresse mecânico estimularia a liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas sensoriais da pele. Dentre os neuropeptídeos estariam SP e CGRP que se ligariam aos receptores SP-NK1R e CGRP-CGRP1R presentes em queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e mastócitos. Com maior concentração dos peptídeos SP e CGRP mais receptores SP-NK1R e CGRP-CGRP1R seriam ocupados e ativados em muitos tipos celulares na pele. Queloide e cicatriz hipertrófica teriam suas origens na inflamação neurogênica, e neuropeptídeos e neurotrofinas teriam efeitos na cicatrização, assim como o aumento na concentração de fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Estímulos mecânicos na pele promoveriam maior produção e liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas que aumentariam a concentração de TGF- β e NGF, sempre presentes em cicatrizes. As cicatrizes fibroproliferativas apresentam maior fluxo sanguíneo devido ao aumento de neuropeptídeos e a inflamação neurogênica induzida por estresse mecânico seria uma causa de queloide.

OGAWA (2008) propôs que cicatriz hipertrófica e queloide são o resultado de alterações na resposta mecanoreceptiva ou mecanosensitiva de fibras nervosas sensoriais da pele. As fibras nervosas da pele quando estimuladas liberam, dentre outros neuropeptídeos, SP e CGRP que se ligam a dois receptores comuns em diversas células, respectivamente, SP-NK1R e CGRP-CGRP1R. Conseqüentemente, os mastócitos liberam mais histamina e diversas células produzem mais citocinas, como TGF- β e NGF. No final do processo o resultado é um maior acúmulo de fibras de colágeno na pele.

WALBURN *et al.* (2009) propuseram que até mesmo fatores psicológicos, como estresse, tem potencial para desencadear alterações na cicatrização. Os autores apontaram que até o ano de 2009 os dados a respeito dos mecanismos mediadores da interferência do estresse sobre a cicatrização eram insuficientes, contudo, uma ampla diversidade de pesquisas científicas deixa evidente que o estresse é um fator que dificulta a regeneração. Consideraram que além da pesquisa clínica a pesquisa translacional experimental aumenta as perspectivas futuras no campo da regeneração.

ALLER, ARIAS, ARIAS (2010) citaram que a resposta inflamatória pós-traumática tem três fases: aguda, subaguda e crônica. Na fase aguda ocorre infiltração molecular no líquido intersticial. Na fase subaguda ocorre infiltração de células sanguíneas no líquido intersticial e os leucócitos realizam digestão enzimática de estruturas ou fragmentos resultantes da lesão. A fase crônica é a que representa o estágio final da regeneração quando as fases molecular e celular da inflamação diminuem e cessam. Frequentemente as inflamações pós-traumáticas anormais surgem em estruturas vasculares e nervosas. A regeneração pode ser interpretada como uma habilidade que algumas células possuem de se programar para voltarem a se comportar de maneira semelhante às células no estágio da gastrulação, um dos estágios do início de desenvolvimento do organismo. Durante a inflamação pós-traumática, o comportamento das células mesenquimais se assemelha ao das células em estágio de gastrulação e estas células mesenquimais, através das células tronco, induzem a expressão gênica neuromuscular de substâncias inflamatórias de atuação sistêmica e na pele lesada.

TOH *et al.* (2010) observaram amostras de pele ao microscópio, e constataram que na pele normal os queratinócitos encontravam-se organizados em camadas na epiderme e os fibroblastos organizados em camadas na derme, diferentemente das amostras de queiloide onde a derme apresentava-se com excesso de colágeno. Observações ao microscópio com a técnica de imunohistoquímica revelaram que metalotioneínas (MT) estavam presentes em fibroblastos e queratinócitos nas amostras de pele normal, porém nas amostras de queiloide somente os queratinócitos mostravam presença de proteínas MT enquanto que estas estavam ausentes nos fibroblastos. Então os pesquisadores realizaram experimentos com cultura de KF e de NF suplementada com soro fetal bovino (FBS) para simular um ambiente de ferida para as células, posteriormente foi extraído o RNA das células em cultura, de NF e de KF, suplementadas com 5% e 10% de FBS e após a PCR foi constatado que a expressão gênica de MT-1A, MT-1E, MT-1F, MT-1X e MT-2A, totalizando 5 isoformas de MT, mostravam-se hipoexpressas na cultura de células KF comparado com a cultura de células NF. Em cultura sem suplementação a expressão das isoformas de MT em NF já é maior que a encontrada em KF, porém estes resultados não foram estatisticamente significantes, e a isoforma MT-1G foi expressa em NF, mas não foi expressa em KF. A adição de FBS ao meio de cultura das células KF promoveu a proliferação destas

células, porém a diferença não foi significativa entre a suplementação de 5% de FBS e 10% de FBS por 5 dias. Após 5 dias de exposição ao FBS havia maior deposição de colágeno na matriz extracelular de KF do que na cultura de células NF. Na comparação da expressão de isoformas de proteínas MT em cultura suplementada com FBS por 1, 3 e 5 dias e cultura controle sem suplementação com FBS constatou-se que as isoformas das proteínas MT sofreram hiporregulação na sua expressão de modo tempo-dependente porém sem diferenças quanto à concentração de FBS a que foram expostas. As proteínas MT-1A, MT-1E, MT-1F, MT-1X e MT-2A também foram hiporreguladas na cultura de células NF suplementada com 10% de FBS. Dentre as MT hiporreguladas de modo tempo-dependente a MT-2A e a MT-1G foram as isoformas que apresentaram maior hipoexpressão após suplementação com 10% de FBS por 5 dias, enquanto que no mesmo período na suplementação por 5% de FBS a MT-2A foi a isoforma mais hipoexpressa. No experimento com cultura de KF suplementada com TGF- β 1 foi encontrado aumento de expressão gênica de colágeno 1A e colágeno 3A e diminuição significativa na expressão de MT-2A. Em experimento no qual o gene MT-2A foi silenciado o silenciamento do gene MT-2A, na cultura de células NF e KF, resultou na promoção da proliferação das células e esta proliferação foi inversamente proporcional à hiporregulação do gene MT-2A, sem alterar a expressão gênica de colágeno 1A e de colágeno 3A. Os pesquisadores sugerem que a diminuição da expressão de proteínas MT em queiloide reduz a ativação da colagenase, que consequentemente reduz a degradação do colágeno, e que a isoforma MT-2A, quando hiporregulada, poderia estar envolvida na formação do queiloide.

TOTAN, ECHO, YUKSEL (2011) lançaram a hipótese de que a hiperexpressão de proteínas de choque térmico (HSPs) no tecido poderia ser o responsável por prolongar eventos inflamatórios extensivos que levariam a uma síntese descontrolada de colágeno. As condições do ambiente gerado em feridas, estressantes para as células envolvidas na reparação tecidual, após traumas e inflamação podem gerar desarranjo de proteínas durante o processo de cicatrização resultando na formação do queiloide. A expressão de HSPs em tecidos feridos proporciona melhora no processo de reparação tecidual, porém a alteração na expressão de HSP poderia resultar na formação do queiloide. Os autores compararam a expressão de HSPs de queiloide e de tecido de pele normal adjacente, utilizaram amostras provenientes de 24 pacientes, que após obtidas

foram divididas em 25 amostras. Para verificar a expressão proteica de hsp27, hsp47, hsp60, hsp70 e hsp90, de queiloide e de pele normal, foram realizados testes de *Western blotting* e ensaio imunoenzimático, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Os pesquisadores também realizaram testes histológicos, com hematoxilina e eosina, e testes imunofluorescentes para hsp47, hsp60, hsp70 e hsp90. A imunofluorescência mostrou que no queiloide havia fortes marcações do *Texas Red* com os anticorpos anti-hsp27, anti-hsp47 e anti-hsp70. Também houve detecção de hsp27, hsp47 e hsp70 expressos em tecido de normal, porém a expressão destas proteínas foi significativamente menor que a detectada nas amostras de queiloide. A expressão de hsp60 e hsp90 foi equivalente nos dois tecidos, queiloide e pele normal. Os autores demonstraram que a expressão de hsp27, hsp47 e hsp70 tiveram aumentos respectivos de 10 vezes, 16 vezes e 3 vezes em tecido de queiloide comparado à pele normal. As observações dos autores por microscopia imunofluorescente foram suportadas pelas análises de *Western blotting* e ELISA que demonstraram que houve hiperexpressão de hsp27, hsp47 e hsp70 em queiloide comparado à pele normal. Nos testes de ELISA e *Western blotting* a expressão de hsp60 e hsp90 foi equivalente nos dois tipos de tecidos, pele normal e queiloide. Os autores demonstraram que as HSPs foram diferencialmente expressas em amostras de queiloide comparadas ao controle, com hiperexpressão de hsp27, hsp47 e hsp70, o que está coerente com a patofisiologia do queiloide com aumento de colágeno e inflamação.

JEFFRY, KIM, CHEN (2011) concluíram numa revisão bibliográfica que a injeção intratecal de antagonista de GRPR inibe o comportamento de coceira induzido por prurítogênicos ou por injeção intratecal de GRP, e que camundongos mutantes para GRPR apresentam sensibilidade para estímulos térmicos, mecânicos e químicos sem alteração. Segundo os autores a ativação da sinalização do GRPR é funcional em transmissões pruriceptivas não histaminérgicas, não sendo funcional em prurido histaminérgico. As observações em que a diminuição do comportamento de coceira, em camundongos mutantes para GRPR, não cessam completamente seria um indício de que o GRPR não é o único receptor de prurido na medula espinal. Neste último exemplo os autores sugerem que uma possível explicação seria a existência de outro receptor homólogo de bombesina, por exemplo, o receptor de neuromedina B (NMBR), que poderia contrabalançar a ausência de GRPR na coluna espinal em certos estímulos

pruritogênicos. Para os autores o GRPR seria essencial para a transmissão de sinal de prurido do sistema nervoso periférico para o cérebro.

YAGMUR *et al.* (2011) estudaram os efeitos da denervação de fibras sensoriais sobre cicatriz hiperproliferativa. Durante a fase proliferativa da regeneração ocorrem a epitelização, angiogênese, formação de tecido granuloso e deposição de colágeno. Nem sempre a cicatriz formada se restringe à sua extensão original, podendo ser expandida quando na última fase da regeneração, a maturação, ocorre um remodelamento da matriz extracelular previamente sintetizada na fase proliferativa, trazendo impactos funcionais e estéticos. Fibroblastos, macrófagos e neutrófilos são exemplos de células que são muito estudadas no processo regenerativo, outro grupo de células que merecem atenção neste estudo são as células neuronais de fibras nervosas da pele. Em experimentos com coelhos foi demonstrado que nas orelhas denervadas havia um menor desenvolvimento de cicatriz hipertrófica. A regressão da cicatriz excessiva em pele denervada indica um caminho para as futuras pesquisas e potenciais tratamentos a serem desenvolvidos. Os autores concluíram que, apesar dos seus experimentos em pele denervada de orelha em coelhos, ainda havia uma carência de conhecimento a respeito do complexo envolvimento dos mediadores neurais de fibras nervosas sensoriais na cicatrização cutânea.

O'REILLY *et al.* (2012) referiram em sua revisão que a esclerose sistêmica é uma doença autoimune que causa fibrose na pele e outros órgãos e a origem molecular de seu desenvolvimento é desconhecida. Uma molécula que foi candidata a fazer parte do desenvolvimento desta doença é a IL-6, pois se sabe que é uma molécula importante no desenvolvimento de fibroses. Em processos que envolvem a resposta imune a IL-6 é a principal molécula que aciona a IL6ST, e para que o receptor de IL-6 (IL-6R) desempenhe alguma resposta após ser acionado pela IL-6 é necessário que a molécula IL6ST transfira este sinal para outras moléculas. Diferentes tipos celulares podem expressar receptores IL-6R frente a diferentes estímulos. Quando há maior homodimerização de IL6ST ocorre diminuição da sinalização e da expressão gênica, isto se deve ao fato de que a trans-sinalização acontece quando é formado um complexo molecular de IL-6 e IL-6R com a IL6ST. A apoptose endotelial inicia a inflamação que recruta e retém células mononucleares, posteriormente leucócitos sofrem apoptose e liberam o IL-6R que mantinham na membrana celular (sIL-6R), o sIL-6R liga-se ao IL-

6 e estes ligam-se à IL6ST, e o conjunto formado na membrana celular dos monócitos ativa os monócitos. O polimorfismo genético do promotor de IL-6 poderia ser o responsável pelos níveis elevados de IL-6 encontrados em pacientes. Os autores especularam que a neutralização da IL-6 poderia ser uma estratégia para interromper o processo que inicia a fibrose.

FURTADO *et al.* (2012) analisaram o estresse psicológico no surgimento de quelóide. Um total de 25 pacientes foi submetido à cirurgia para retirada de quelóide. A cicatriz retornou em 15 pacientes no terceiro mês e em três pacientes em seis meses. Os restantes, sete pacientes, não tiveram recorrência em 12 meses após a cirurgia. Antes da cirurgia os pacientes responderam um questionário sobre qualidade de vida, estresse percebido, ansiedade e depressão, para indicar o parâmetro de estresse psicológico. Foi obtida, por higrômetro termo digital, a resposta galvânica da pele após ambientação dos pacientes por vinte minutos em temperatura ambiente e umidade controlada. Os resultados da resposta galvânica da pele dos pacientes com quelóide recorrente mostraram valores mínimos e máximos mais elevados, portanto, com menor limiar de ativação do sistema nervoso simpático. Ficou demonstrado, por meio da resposta galvânica da pele dos pacientes com reincidência de quelóide após a cirurgia, que o estresse psicológico propicia a recorrência do quelóide.

WEI *et al.* (2012) desenvolveram um modelo experimental animal para a síndrome dolorosa regional complexa, *Complex Regional Pain Syndrome* (CRPS). Neste modelo, que utiliza fratura tibial distal em ratos, a inflamação obtida no experimento se assemelha à da CRPS, sugerindo que a produção local de mediadores da inflamação seria responsável por esta enfermidade. O SP e o CGRP seriam mediadores intermediários durante o desenvolvimento da dor inflamatória juntamente com citocinas e NGF. Aos ratos foi administrada injeção intraplantar de SP para determinar o tempo em que o SP induz à dor e à inflamação. Na pele dorsal da pata traseira foi mensurado o nível das proteínas TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e NGF pela técnica de imunoenensaio enzimático, *enzyme immunoassay* (EIA). Neste experimento havia dois grupos: o que recebeu antagonista do receptor NK1 (LY303870) e o controle que recebeu placebo (veículo). A proliferação de queratinócitos foi avaliada por imunohistoquímica com bromodeoxiuridina (BrdU). O LY303870 reverteu o aumento de células positivas para BrdU na epiderme da pata fraturada, portanto a fratura induz ao espessamento da

epiderme enquanto que o LY303870 elimina esse espessamento. Houve aumento nos níveis proteicos de TNF-alfa em 1593%, IL-1beta em 176%, IL-6 em 33,9% e NGF em 495% após 4 semanas da fratura. O tempo necessário para a sensibilização nociceptiva mediada pela SP coincide com o tempo para a produção de NGF depois de aplicada a injeção intradérmica, e a estimulação dos queratinócitos pela SP levou-os a produzir NGF. Na imunohistoquímica para NGF foi detectado aumento nos níveis de NGF nos queratinócitos após a injeção de SP. Os resultados sugerem que a sinalização pela SP na pele contribui para a manutenção da dor após a fratura.

LEE *et al.* (2012) sugeriram que as células endoteliais são necessárias para a angiogênese em condições fisiológicas e patológicas, como na reparação tecidual e no câncer. Os pesquisadores observaram que em cultura de células endoteliais junto com células tumorais houve diminuição da secreção de HSPB1 nas células endoteliais, sugerindo que a inibição da secreção de HSPB1 permite ao VEGF promover a angiogênese. Foi observado também que a fosforilação mediada por VEGF de HSPB1 intracelular inibiu a secreção de HSPB1, em células endoteliais, e inibiu seu funcionamento normal. Os pesquisadores demonstraram que o HSPB1 extracelular regula o VEGF solúvel, mantendo o balanço angiogênico, e que o HSPB1 pode evitar a angiogênese ao se ligar com o VEGF. Como o HSPB1 extracelular inibe a angiogênese mediada por VEGF os pesquisadores tinham a hipótese de que a neutralização de HSPB1 poderia promover o processo de regeneração regulada por VEGF *in vivo*. Foram administrados anticorpos, para neutralizar HSPB1, por via intravenosa em camundongos com ferida abrangendo toda a espessura da pele dorsal. Os camundongos tratados com anticorpos que neutralizam HSPB1 demonstraram fechamento, dérmico e epidérmico, acelerado da ferida comparados aos controles. Os autores observaram que o HSPB1 foi secretado por células endoteliais, mas não por células musculares, epiteliais, hepatócitos ou células de câncer. Devido aos seus resultados os autores sugeriram que a neutralização do HSPB1 promove a regeneração através do aumento da angiogênese pela mediação de VEGF que ativa o VEGFR.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.* (2012) sugeriram que os neurônios do gânglio da raiz dorsal afetam a homeostase epitelial. Em ratos a capsaicina inviabilizou fibras peptidérgicas e fibras não peptidérgicas da pele. Provavelmente a inervação sensorial regula a proliferação de células tronco no epitélio da pele, uma vez que, a capsaicina

reduz a inervação cutânea e afeta a migração de células tronco da protuberância do folículo piloso. Utilizando-se de anticorpos para neuropeptídeos descobriram que na pele as terminações nervosas sensoriais estão em posições específicas. A epiderme e os folículos pilosos possuem principalmente os sensores neurais de fibras C desmielinizadas, que liberam CGRP e SP dentre outros neuromediadores, com poucas fibras nervosas mielinizadas. Os resultados experimentais demonstraram que a inervação está envolvida na ativação de células progenitoras da epiderme em torno da ferida, mas não em células progenitoras dos folículos pilosos, e foram encontrados receptores para neuropeptídeos em células tronco, sugerindo que nervos sensoriais auxiliam a reepitelização. Possivelmente, os nervos sensoriais estão envolvidos na locomoção de células estaminais para a epiderme e a inervação sensorial parece atuar com especificidade própria para cada população de progenitores epiteliais. Além disto, provavelmente as fibras sensoriais auxiliam na sobrevivência de células amplificadoras em transito. Concluiu-se que os neurônios do gânglio da raiz dorsal atuam na cicatrização e que a comunicação entre as terminações nervosas e o epitélio da pele seria essencial para a migração de células foliculares e a ativação epidérmica.

LIU & JI (2013) revisaram os mecanismos de transmissão do sinal de dor e prurido. Segundo os autores, dor e prurido são distintos em condições agudas, mas em condições crônicas estes dois fenômenos apresentam mecanismos correlatos, tanto que a plasticidade neuronal, em certas doenças, permite que o estímulo de dor aumente o estímulo de prurido. Estímulos de qualquer natureza em uma pequena população de neurônios relacionados ao prurido tem o potencial de resultar na efetivação do prurido. Quando ocorre a ativação aferente desse estímulo, a liberação de neurotransmissores no cordão espinhal resulta na liberação de peptídeos opióides e de GRP, e estes ligam-se à receptores GRPR e MOR1D de neurônios relacionados ao prurido. É plausível, segundo os autores, que o glutamato, que aciona a transmissão de dor, estaria envolvido na ativação de neurônios que inibiriam o prurido. Neurônios sensoriais que expressam MrgprA3 e GRPR, na superfície do cordão espinhal, estariam envolvidos em um circuito neural específico para prurido. Em condições patológicas e fisiológicas a comunicação entre as vias de sinais de dor e prurido se dão de modos distintos, porém, o estímulo agudo de prurido é passível de ser inibido através de estímulos de dor ou pelo ato de coçar o local. Dor e prurido compartilham de muitos receptores como

TRPV1, TRPA1, TLRs e PARs. É comum o uso de modelos animais em que é induzido o prurido, no que estes modelos animais falham é em recriar as condições para a formação de prurido crônico decorrente de doenças sistêmicas, no entanto, técnicas de imagem cerebral e protocolos psicofísicos, desenvolvidos para estudar prurido em humanos, têm maior potencial para elucidar os mecanismos do prurido crônico e suas interações com sinais de dor no cérebro humano e, para os autores, estas técnicas seriam melhores para a compreensão dos mecanismos do prurido e permitiria o desenvolvimento de tratamentos mais específicos para o prurido.

BENECKE, LOTTIS, STÄNDER (2013) sugeriram que fatores neurais e cutâneos relacionados às doenças inflamatórias de pele e prurido crônico resultam na liberação de neurotransmissores e citocinas que se ligam a receptores específicos, um exemplo é a histamina que é uma substância da gênese do prurido, produzida por queratinócitos e mastócitos, que ao se ligar em receptores específicos em terminações nervosas periféricas da pele faz com que liberem a SP. A citocina neurotrófica NGF, que promove o crescimento, a manutenção e a sobrevivência de neurônios sensoriais, também tem a função de mediador inflamatório, sabe-se que concentrações elevadas de NGF alteram a sensibilidade da pele com dermatite atópica e, é plausível que, concentrações elevadas de NGF direcionem o desenvolvimento e formação dos nervos sensoriais favorecendo a formação de prurido. A SP e o peptídeo relacionado à gastrina (GRP), assim como seus receptores NK-1R (na coluna espinal) e GRPR (na pele), são considerados alvos importantes na pesquisa contra o prurido crônico.

BLAIS *et al.* (2013) lançaram a hipótese de que outros fatores neurotróficos, além do NGF, como GDNF, BDNF e NT-3 também seriam fatores angiogênicos. A angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros vasos precedentes e o NGF, secretado por queratinócitos, promove a angiogênese em processos de reparação da pele e processos patológicos, além de estar envolvido na migração e manutenção de fibras nervosas sensoriais. Os pesquisadores isolaram células de fragmentos de pele humana após cirurgia de redução mamária e realizaram uma cultura tridimensional com células endoteliais e fibroblastos dérmicos humanos cultivados em uma esponja de colágeno. Na cultura tridimensional foi observado que, comparadas aos controles, cada colônia de células expostas a um dos fatores neurotróficos apresentou número maior de estruturas semelhantes a capilares. Também

foi observado que as estruturas semelhantes aos capilares migraram para dentro do modelo de cultura em todas as colônias expostas a fatores neurotróficos. Os fatores neurotróficos NGF, GDNF e NT-3 proporcionaram a cada colônia celular exposta um aumento entre 40% e 80% no número das estruturas semelhantes aos capilares, estas estruturas aumentaram seu número em 80% na cultura exposta ao BDNF, o que representou um acréscimo maior que os dos outros fatores neurotróficos, já que foi adicionado 0.1ng/mL de BDNF na cultura, enquanto que foram adicionados 10ng/mL de NGF, 15ng/mL de NT-3 e 50ng/mL de GDNF em cultura. Estes resultados foram melhores que os do VEGF, os pesquisadores observaram que no modelo de cultura utilizado em seus experimentos o VEGF proporcionou um aumento de até 20% das estruturas semelhantes aos capilares. Os resultados permitiram aos pesquisadores sugerir que os fatores neurotróficos induzem a tubulogênese, a migração e a proliferação de células endoteliais. Os resultados mostraram que os fatores neurotróficos participam da regulação da microvasculatura da pele através da liberação pela epiderme de NGF, BDNF, NT-3 e GDNF.

SUKHTANKAR & KO (2013) demonstraram que os receptores GRPR e NMBR intermedeiam o sinal de prurido, os pesquisadores caracterizaram farmacologicamente as curvas de dose-resposta e a duração do comportamento de prurido induzido por administração intratecal de bombesina, GRP e NMB. Os receptores GRPR e NMBR do sistema nervoso central de roedores podem regular o prurido, de forma independente, em regiões da medula espinal e supra-espinal. Quando o antagonista de GRPR, RC-3095, foi administrado em alta dose, acima de 0,3 nmol, ocorreu atenuação de prurido induzido por NMB e bombesina. Na dose de 0,3 nmol o RC-3095 suprimiu a indução de prurido por GRP, que segundo os autores, poderia regular alguns tipos de prurido. Os pesquisadores avaliaram a administração intratecal de peptídeos relacionados à bombesina, comparado com morfina, em camundongos com comportamento de prurido, e verificaram que antagonistas de GRPR podem bloquear seletivamente o comportamento de prurido induzido por GRP, porém em altas doses os antagonistas de GRPR poderiam suprimir esse comportamento induzido por diferentes receptores.

SUAREZ *et al.* (2014) desenvolveram um modelo 3D que imita a tensão sofrida pelas células *in vivo*. Os autores do estudo selecionaram três genes (hsp27, $\alpha 2\beta 1$ integrina e PAI-2) de um estudo prévio feito pelo mesmo grupo e silenciaram

temporariamente os genes *hsp27*, $\alpha2\beta1$ integrina e PAI-2, por meio de sequências curtas de RNA de interferência, *small interfering RNA* (siRNA), para verificar a influência destes genes no comportamento dos NF e KF ao serem expostos à tensão mecânica. Os fibroblastos NK e NF foram semeados em gel com uma malha de colágeno 3D, *fibroblast-populated collagen lattices* (FPCL). Após a aplicação da tensão o efeito da expressão gênica de *hsp27*, PAI-2, e $\alpha2\beta1$ integrina, foi avaliado por PCR. No modelo de cultura 3D os dois grupos de fibroblastos apresentaram indução à proliferação após serem expostos à tensão e quanto maior o tempo de exposição à tensão maior foi a expressão gênica e esta tendência, mais evidente em fibroblastos de queiloide, foi observada nos três genes alvo. Dentre os três genes o *hsp27* foi o que apresentou maior hiperexpressão em todos os intervalos de tempo e nos dois grupos de fibroblastos. A expressão gênica dos três genes aumentou em todos os fibroblastos expostos à tensão, porém foi sempre maior nos KF quando comparados aos NF expostos pelo mesmo intervalo de tempo, e os KF apresentavam maior ativação celular, proliferação, expressão de genes relacionados à tensão e espalhamento do que os NF. Dentre as células transfectadas o silenciamento dos genes *hsp27*, PAI-2 e $\alpha2\beta1$ integrina resultou em menor proliferação dos fibroblastos expostos à tensão mecânica e a população de NF foi a que apresentou hiporregulação mais intensa, os NF apresentaram a menor taxa de proliferação após 48 horas de silenciamento dos genes *hsp27* ou $\alpha2\beta1$ integrina. Após o silenciamento do gene PAI-2 não foi encontrada qualquer alteração na morfologia das células, enquanto que as células que sofreram o silenciamento do gene *hsp27* ou do gene $\alpha2\beta1$ passaram a apresentar um aspecto arredondado, o que seria um indício de que estes genes estariam envolvidos com a habilidade da célula se estender quando submetida à tensão mecânica. Portanto, *hsp27* e $\alpha2\beta1$ integrina estariam envolvidas na regulação do rearranjo de actina sob tensão e a tensão mecânica exerceria modificação na expressão de proteínas relacionadas à tensão, à matriz extracelular, ao estiramento e à proliferação celular.

JURZAK *et al.* (2014) investigaram o potencial da genisteína como moduladora dos genes: fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Também investigaram a ação da genisteína sobre a expressão dos genes p53, p21, BCL2 e BAX de fibroblastos de queiloide e de pele normal provenientes de cultura. Cada cultura consistia de fibroblastos NF ou de fibroblastos KF. As células NF controle

apresentaram expressão de mRNAs de CTGF, TGF- β 1 e TGF- β 3 menor do que a encontrada nas células KF controle, enquanto que a expressão de mRNA de TGF- β 2 não teve diferença nas duas linhagens controle e a expressão proteica de CTGF foi cinco vezes menor nas células NF controle quando comparadas às células KF. Nas duas linhagens celulares usadas como controle, a expressão de mRNAs de p21, BCL2 e BAX foi hiporexpressa nos fibroblastos de quelóide comparados aos fibroblastos normais. As células NF e KF tratadas com genisteína, comparadas às células controle, apresentaram hiporregulação do mRNA de CTGF e hiporregulação da expressão proteica de CTGF, também tiveram hiporexpressão do mRNA de p53, enquanto que seus respectivos controles não apresentaram diferenças significativas na expressão de p53. Como a genisteína não induziu à expressão gênica de p53 e p21, causando hiporregulação da expressão dos mRNAs de p53 e p21, os autores concluíram que esta substância não leva as células a sofrer apoptose em cultura de fibroblastos de quelóide. A razão de mRNAs BAX/BCL2 se encontrava aumentada nos fibroblastos controles de quelóide em comparação aos fibroblastos dérmicos humanos normais controle, e também foi observado nas duas linhagens tratadas que houve diminuição da razão BAX/BCL2. Com isso os autores concluíram que, por ter hiperregulado o mRNA de BCL2, a genisteína teria propriedade citoprotetora nos fibroblastos provenientes de quelóide.

HOCHMAN *et al.* (2014) analisaram a influência, na produção de SP e CGRP em pele saudável de ratos, de dois tipos de fototerapias: com laser terapêutico de baixo nível energético (LLLT) e com emissão de luz por diodo (LED). A análise quantitativa de SP e CGRP foi realizada por meio da técnica *Western blotting*. Foi verificado que, dentre LED azul, LED vermelho, laser vermelho e laser infravermelho, com comprimento de ondas de 808nm, apenas com este último foi possível, em quantidade significativa, aumentar a produção do neuropeptídeo SP em segmentos de pele expostos.

HOCHMAN *et al.* (2015) compararam a posição de quelóide na orelha com seus respectivos brincos e outras joias de diferentes materiais. Na amostragem havia 100 pacientes, entre 11 e 56 anos, dos quais 56% eram mulheres e 79% eram não brancos. Nestes 100 pacientes havia 141 quelóides, dos quais 41% surgiram em um ano após a lesão, 31% surgiram seis meses após a lesão e 28% surgiram antes de seis meses depois da lesão. Quanto à localização do quelóide na orelha, 82% estavam no lóbulo e 18% estavam na cartilagem. Especificamente quanto aos quelóides localizados no lóbulo da

orelha, 61% estavam na superfície posterior, 30% estavam na superfície anterior e 15% estavam em ambos os lados do lóbulo. Tanto os queloides de superfície anterior quanto de superfície posterior do lóbulo surgiram em 75% dos casos em que o brinco tinha fixador na região posterior, enquanto que nos casos de queloide em ambos os lados do lóbulo 100% dos casos são provenientes de brincos ou joias com fixador na região posterior, assim como foi 100% nos casos de queloides de regiões cartilaginosas da orelha. No que se refere à composição dos brincos ou joias, 84% eram de prata, 9% eram de ouro e 7% de aço inoxidável. Todos estes dados permitiram sugerir que o fixador metálico de brincos seria o responsável pela maior incidência de queloide na região posterior da orelha, através de estímulos bioelétricos e alterações neurosecretórias que iniciariam a inflamação neurogênica.

FREITAS *et al.* (2015) investigaram se a injeção subdermal de dexametasona, antes de feridas de incisão, inibiria a resposta da inflamação neurogênica ou se influiria na liberação de SP e CGRP por terminações nociceptivas na pele de ratos. Foram utilizados 27 ratos adultos machos, da linhagem Wistar, com 260 a 300 gramas de peso e oito semanas de idade, e estes foram divididos em três grupos de nove indivíduos. Um grupo recebeu injeção de solução salina a 0,9% enquanto os outros dois grupos receberam a dexametasona. Em um grupo a dose aplicada de dexametasona foi de 1.0 mg/kg enquanto no outro grupo a dose aplicada foi de 10.0 mg/kg. Em todos os grupos a injeção foi aplicada 30 minutos antes do procedimento cirúrgico e da coleta dos fragmentos de pele para quantificar a SP, o CGRP (5 kDa) e o pro-CGRP (15 kDa). Os fragmentos de pele, retirados de um diâmetro de 8 mm do ponto central da incisão, foram estocados em microtubos, na temperatura de -2°C a -6°C, até serem processados e analisados por *Western blotting* no laboratório. Nos resultados do *Western blotting* foi constatado que em todos os grupos foram liberados SP, CGRP e pro-CGRP, porém não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos. Portanto a dexametasona não age na sinalização neurosecretória local de SP e CGRP que são liberados por fibras nervosas sensoriais do tipo A- δ e C.

LEE *et al.* (2015) foram os primeiros a investigar quais seriam os efeitos da expressão da proteína Nrf2 em queloide, eles compararam a expressão proteica de Nrf2 em pele normal e em queloide, através das técnicas de *Western blotting* e imunohistoquímica, para verificar a função destes em fibroblastos humanos

transfectados com siRNA específico para Nrf2. Foi realizada cultura de fibroblastos e de linhagem celular G361, células de linhagem G361 de melanoma maligno humano, que serviram de controle positivo para a expressão de Nrf2 e BCL2. Foi realizada a técnica de *immunoblotting* para a proteína 2,4 dinitrofenilhidrazina. Os anticorpos primários utilizados para o *Western blotting* foram anti-Nrf2, anti-Keap-1 e anti-BCL2. A análise pelo *OxyBlot* mostrou que no queuloide havia um aumento de estresse oxidativo comparado com a pele normal. Através do *Western blotting* foi constatado que a proteína Nrf2 foi hiporregulada no queuloide comparada à pele normal. Por imunohistoquímica também foi constatado que a proteína Nrf2 foi hiporregulada no queuloide comparada à pele normal. Segundo os pesquisadores, os resultados obtidos indicavam que a hiporregulação de Nrf2, encontrada em queuloide, induziria os fibroblastos à apoptose devido ao aumento de danos por oxidação. Foi observada uma diminuição na expressão do BCL2 em queuloide, que levou os pesquisadores a sugerir que a hiporregulação do Nrf2, observada no queuloide, resultaria na hiporregulação do BCL2. A hiporregulação de Nrf2 por siRNAs específicos foi confirmado por *Western blotting* tanto em 48 horas quanto em 72 horas após a transfecção e os fibroblastos normais com o Nrf2 silenciado por siRNA tiveram inibição de crescimento e ativação de apoptose. Os pesquisadores não investigaram uma possível interação entre o Nrf2 e o BCL2, mas sugeriram que a hiporregulação do BCL2 estaria envolvida no aumento da apoptose observado no queuloide. Eles concluíram que o aumento da apoptose seria essencial para o desenvolvimento do queuloide e sugeriram que a proteína Nrf2 seria uma das principais envolvidas nesse processo.

ZHANG *et al.* (2015) referiram que a periostina seria importante na angiogênese em queuloide, por isso verificaram a expressão de periostina no queuloide comparada com a sua densidade de vasos sanguíneos, tendo como referência tecido de pele normal. Foram utilizadas amostras provenientes de 15 queloides, obtidos de lesões primárias não tratadas, e de 11 fragmentos de pele normal que seriam descartados após procedimentos cirúrgicos. Por imuno-histoquímica foi constatado que a periostina encontrava-se em níveis mais elevados em queuloide e que essa elevação era acompanhada de um aumento da densidade de vasos sanguíneos, estes detectados através das proteínas CD31 e CD105, comparados à pele normal. Eles também verificaram se a periostina expressa em fibroblastos de queuloide teria algum efeito na

migração de células endoteliais *in vitro*. Foi observado em cultura de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), que quando estas eram tratadas com meio de cultura previamente exposto aos fibroblastos provenientes de quelóide ocorria aumento de migração e de formações tubulares por estas células. Os pesquisadores utilizaram inibidores para FAK ou para ERK e constaram que houve diminuição da migração e da formação tubular induzidos pela periostina, o que sugere que estas proteínas estejam envolvidas como intermediárias na angiogênese. Também observaram que a periostina promovia a expressão de angiopoietina-1 (Angi-1) nos fibroblastos de quelóide, a Ang-1 auxilia o VEGF em sua atuação em células endoteliais, portanto a periostina atuaria na angiogênese através do estímulo à expressão de VEGF e Ang-1. Os autores concluíram que em quelóide a expressão de periostina encontrava-se mais elevada, comparada à pele normal, com correspondente elevação de vasos sanguíneos e a hiperexpressão da periostina acelera a angiogênese através da via de sinalização ativada por ERK1/2 e FAK que induzem ao aumento da secreção de VEGF e da Ang-1. Logo a angiogênese induzida pela periostina seria um mecanismo responsável pela formação do quelóide e a progressão ou regressão do quelóide estaria diretamente relacionada aos níveis de periostina presentes neste.

KIGUCHI *et al.* (2016) estudaram as funções dos sistemas BNP-NPRA, peptídeo natriurético tipo B, *B-type natriuretic peptide* (BNP) - receptor A do peptídeo natriurético, *natriuretic peptide receptor A* (NPRA), e GRP-GRPR na atividade de prurido em camundongos por abordagens imuno-histoquímicas e farmacológicas. Os autores descobriram que a administração intratecal de BNP promoveu resposta de prurido e esta podia ser bloqueada com o antagonista de NPRA. O sistema BNP-NPRA pode opor-se ao sistema GRP-GRPR na regulação do prurido na coluna espinal de camundongos. Portanto, o uso de antagonistas para os receptores NPRA e GRPR poderiam ter eficácia contra o prurido no sistema nervoso central e não no periférico.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Delineamento da Pesquisa

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa observacional, transversal, experimental, analítica, controlada e realizada em centro único. Foram coletadas amostras de queiloide de doze (12) pacientes portadores de queiloide no grupo estudo e de pele normal de doze (12) pacientes sem doenças no grupo controle.

Os pacientes do grupo estudo, com queiloide, foram atendidos no Setor de Cicatrização da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e submetidos a atos operatórios na Casa da Cirurgia Plástica.

Os pacientes do grupo controle foram atendidos na Disciplina de Cirurgia Plástica (DCP) da Escola Paulista de Medicina (EPM – Federal de São Paulo) no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP). Esses pacientes sem queiloide e com indicação de procedimentos operatórios estéticos, mamoplastia, doaram pele normal, que seria descartada durante o procedimento padrão, para o presente estudo. O procedimento operatório desses pacientes foi realizado no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP).

A fase laboratorial foi realizada no Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica, localizado no Edifício Acadêmico Prof. Dr. Horácio Kneese de Mello (Edifício de Pesquisa I), na Rua Pedro de Toledo, 781 – 4º andar – Vila Clementino – São Paulo-SP.

Os pacientes foram incluídos neste estudo após lerem e assinarem o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndices 1 e 2). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP sob o número 820.141 (Apêndice 3).

Critérios de Inclusão

Os critérios de inclusão foram de pacientes de ambos os sexos, com queiloide de lóbulo de orelha (Figura 1), sem tratamento anterior para o queiloide, com idade de 18 a 45 anos, ter indicação de tratamento cirúrgico para retirada do queiloide na Casa da Cirurgia Plástica da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, e concordar em participar da pesquisa após ser convidado e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Critérios de Não Inclusão

Os critérios de não inclusão foram não concordar em participar da pesquisa, ter doença prévia de pele ou lesão superficial, ter doenças clínicas (como diabetes, hipertensão arterial, entre outras) que interferem diretamente com o processo inflamatório e com o processo de cicatrização de feridas. No grupo controle as pacientes fumantes não foram incluídas.

Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão foram quantidade insuficiente de RNA extraído que impedisse a avaliação ou perda do material extraído.

Procedimento Operatório

Os pacientes foram selecionados no ambulatório da Casa da Cirurgia Plástica da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.



Figura 1 - Queiloide em lóbulo de orelha, área de coleta das amostras de queiloide para o presente estudo.

Obtenção das amostras de tecidos

Os pacientes foram operados sob anestesia local, utilizando-se lidocaína a 2%, com adrenalina em solução a uma concentração de 1/200.000. O queuloide foi excisado no plano do tecido subcutâneo, por incisão fusiforme justalesional, com bisturi de lâmina número 15, incluindo nas extremidades um fragmento de pele normal, correspondente à retirada do excedente cutâneo necessário para uma adequada coaptação da sutura nas extremidades.

O fragmento de queuloide retirado foi dividido ao meio pelo cirurgião, sendo que metade foi destinada ao exame microscópico no laboratório de anatomia patológica, para definir o diagnóstico, que no queuloide é principalmente clínico pelo aspecto da lesão e pela história clínica, mas também confirmado pela anatomia patológica. A outra metade do queuloide seguiu para o laboratório para a presente pesquisa.

Os pacientes do grupo controle foram operados no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP) sob anestesia geral, segundo a técnica padrão utilizada na Disciplina de Cirurgia Plástica para mamoplastia. Pele excedente normal, que normalmente seria descartada no procedimento, foi enviada ao laboratório, após o consentimento livre da paciente.

Os fragmentos de queuloide obtidos foram armazenados em tubo de ensaio e enviados ao laboratório imediatamente após a sua retirada em recipiente de isopor com gelo para manter o fragmento resfriado. Estes fragmentos foram submetidos inicialmente à divisão em duas partes, sendo uma delas disponibilizada para a análise de produção proteica e a outra para a extração do RNA e análise por PCR. A digestão do fragmento não foi realizada de imediato, o mesmo foi dividido em pedaços menores para armazenamento em temperatura de -80 para melhor conservação. O manuseio dessas amostras foi realizado com o uso de luvas para que as amostras não entrassem em contato com nucleases liberadas pelas mãos dos pesquisadores.

No grupo controle foram coletadas amostras de 12 pacientes, dentre as quais todas eram mulheres e com média de idade de 36,75 anos. No grupo queuloide, a média de idade dos pacientes era de 25,5 anos, sendo que dentre os 12 pacientes 7 eram mulheres e 5 eram homens (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados de média de idade e gênero dos pacientes incluídos no estudo e que compõe o Banco de RNA e de fragmentos de queuloide.

Grupos/Dados	N	Média de Idade	Gênero
Grupo Controle	12	36,75 anos	12 F
Grupo Queuloide	12	25,5 anos	5M 7F

n=número; F=feminino; M=masculino

Extração de RNA das amostras de tecidos

Quantidades da amostra, entre 200 mg e 1,0 g, foram adicionadas a uma solução-tampão de digestão, na proporção de 1,2 ml de tampão para cada 100 mg de tecido, e colocadas em banho-maria em temperatura próxima a 50°C, para que ocorra a digestão. O tempo de incubação foi de doze horas, ou até que a amostra se apresentasse totalmente digerida, ou seja, apresentasse um aspecto viscoso.

A amostra digerida foi homogeneizada em reagente Trizol (*Invitrogen, CA, EUA*). Após a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, a separação de fases foi alcançada com clorofórmio e centrifugação. O precipitado de RNA a partir da fase aquosa foi lavado com etanol 75%. O RNA foi seco e dissolvido em água livre de RNase. O RNA total foi purificado com *Qiagen RNeasy Minikit de DNase* e submetidos ao tratamento.

RT-qPCR Array

O RNA total foi primariamente isolado usando-se o reagente Trizol (*Invitrogen, CA, EUA*), seguido pelo *kit* de membrana de sílica da *Super Array Bioscience (Array Grade® Total RNA Isolation Kit)*. Não ocorreu nenhuma perda de RNA dos pacientes selecionados para o presente estudo. O RNA total foi purificado com *Qiagen RNeasy Minikit de DNase* e submetidos a tratamento.

A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria utilizando o *NanoVue Plus GE (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA)*. O RNA obtido de todos pacientes apresentava índice de pureza suficiente para

que a transcrição reversa fosse realizada, pois as amostras de RNA extraído do grupo controle (Tabela 2) e do grupo queloide (Tabela 3) apresentaram medidas da razão de absorvância entre os comprimentos de ondas de 260 nanômetros por 280 nanômetros com valores que variaram ao redor de 2.

Tabela 2 - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo controle obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.

AMOSTRA	CONC (ug/ul)	RAZÃO 260/280
<u>Paciente 1 Grupo Controle</u>	62,6	1,9
<u>Paciente 2 Grupo Controle</u>	145,6	1,9
<u>Paciente 3 Grupo Controle</u>	181,2	1,8
<u>Paciente 4 Grupo Controle</u>	112,8	1,9
<u>Paciente 5 Grupo Controle</u>	198	1,9
<u>Paciente 6 Grupo Controle</u>	162,4	1,8
<u>Paciente 7 Grupo Controle</u>	126	1,8
<u>Paciente 8 Grupo Controle</u>	64	1,9
<u>Paciente 9 Grupo Controle</u>	128,4	1,9
<u>Paciente 10 Grupo Controle</u>	198,8	1,9
<u>Paciente 11 Grupo Controle</u>	86,4	1,9
<u>Paciente 12 Grupo Controle</u>	76,4	1,9

Conc=Concentração; ug/ul=micrograma/microlitro

Tabela 3 - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo queloide obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.

AMOSTRA	CONC (ug/ul)	RAZÃO 260/280
<u>Paciente 1 Grupo Queloide</u>	247,6	2
<u>Paciente 2 Grupo Queloide</u>	68,4	2
<u>Paciente 3 Grupo Queloide</u>	56	2
<u>Paciente 4 Grupo Queloide</u>	34	2,1
<u>Paciente 5 Grupo Queloide</u>	68	2
<u>Paciente 6 Grupo Queloide</u>	73,2	2
<u>Paciente 7 Grupo Queloide</u>	432	2
<u>Paciente 8 Grupo Queloide</u>	566,8	2
<u>Paciente 9 Grupo Queloide</u>	112,8	1,9
<u>Paciente 10 Grupo Queloide</u>	208,4	2
<u>Paciente 11 Grupo Queloide</u>	417,2	2
<u>Paciente 12 Grupo Queloide</u>	77,6	2

Conc=Concentração; ug/ul=micrograma/microlitro

O volume final de RNA de cada paciente de 1,0 mg foi usado para a síntese de cDNA. Amostras foram tratadas com tampão oriundo do *kit*, e reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT² First Strand Kit* da *Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante. RT-qPCR foram realizadas usando-se o *RT² Profiler® PCR array* da *Superarray Bioscience* (<http://www.sabiosciences.com/howpcrarrayworks.php>).

Para o estudo, 84 genes foram analisados para genes humanos relevantes envolvidos na síntese de neurotrofinas e receptores – *Human Neurotrophins & Receptors PCR Array* (PAHS-031Z) (Quadro 1). A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas foram realizadas em um *ABI Prism 7500 SequenceDetection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) utilizando a metodologia *RT² SYBR® Green qPCR Mastermix*.

Quadro 1 – Paineis de 84 genes humanos relacionados às neurotrofinas e receptores presentes na placa de PCR Array (PAHS-031Z).

<p>RT² Profiler™ PCR Array System Human Neurotrophins & Receptors (Qiagen, Valencia, EUA) (nº no catálogo: PAHS-031Z)</p>
<p>Neurotrophins and Receptors: ADCYAP1R1, ARTN, BDNF, CD40 (TNFRSF5), CNTF, CNTFR, CRHBP, CRHR1, CRHR2, FRS2, FRS3, FUS, GDNF, GFRA1, GFRA2, GFRA3, GMFB, GMFG, MAGED1, MT3, NF1, NGF, NGFR, NGFRAP1, NR1I2, NRG1, NRG2, NTF3, NTF4, NTRK1, NTRK2, PSPN, PTGER2, TFG, TRO, VGF.</p>
<p>Neuropeptides and Receptors: <i>Neuropeptide Hormone:</i> CRH, NPFF, NPY, PNOC, UCN. <i>Bombesin Receptors:</i> GRPR. <i>Cholecystokinin Receptors:</i> CCKAR. <i>Galanin Receptors:</i> GALR1, GALR2. <i>Neuropeptide Y Receptors:</i> NPY1R, NPY2R, NPY4R. <i>Neurotensin Receptors:</i> NTSR1. <i>Tachykinin and Receptors:</i> TACR1. <i>Other Neuropeptides and Receptors:</i> NPFFR2 (GPR74), HCRT, MC2R.</p>
<p>Neurogenesis: <i>Central Nervous System Development:</i> PSPN. <i>Peripheral Nervous System Development:</i> GFRA3. <i>Negative Regulation of Neurogenesis:</i> MT3. <i>Other Neurogenesis Related Genes:</i> ARTN, BDNF, CBLN1, CNTF, CNTFR, FGF2, GDNF, MEF2C, NELL1, NGFR, NRG1, NTF3, NTRK1, NTRK2, STAT3, TFG. <i>Transmission of Nerve Impulse:</i> CBLN1, CNTF, CRH, GALR1, GALR2, HCRT, NPFF, NPY, NTSR1, PNOC.</p>
<p>Cell Growth and Differentiation: <i>Growth Factors and Receptors:</i> ARTN, BDNF, CNTF, FGF2, FGF9, FGFR1, FRS2, FRS3, GDNF, GMFB, GMFG, IL10, IL1B, IL6, LIF, NGF, NRG1, NRG2, NRG4, NTF3, NTF4, PSPN, TGFA, TGFB1, VGF. <i>Cell Cycle:</i> BAX, BCL2, FGF2, FGF9, IL1B, MYC, NF1, STAT1, TGFA, TGFB1, TP53. <i>Cell Proliferation:</i> BCL2, FGF2, FGF9, GRPR, IL10, IL1B, IL6, IL6R, LIF, MT3, MYC, NF1, NPY, TGFA, TGFB1, TP53. <i>Cell Differentiation:</i> FGF9, IL10, NRG1, TP53. <i>Cytokines and Receptors:</i> CNTFR, CX3CR1, CXCR4, IL10, IL10RA, IL1B, IL1R1, IL6, IL6R, IL6ST, LIF, LIFR.</p>
<p>Apoptosis: <i>Anti-Apoptosis:</i> BCL2, FAS (TNFRSF6), GDNF, IL10, NRG2, NTF3, TGFB1. <i>Caspase Activation:</i> STAT1, TP53. <i>Induction of Apoptosis:</i> BAX, FAS (TNFRSF6), TP53. <i>Other Genes Related to Apoptosis:</i> CD40 (TNFRSF5), HSPB1, IL1B, NGFR, NGFRAP1.</p>
<p>Immune Response: <i>Acute-Phase Response:</i> IL6, STAT3. <i>Humoral Immune Response:</i> BCL2, CD40 (TNFRSF5), IL10, IL1B, IL6. <i>Inflammatory Response:</i> CD40 (TNFRSF5), FOS, IL10, IL1B, IL1R1, TACR1. <i>Other Immune Response Genes:</i> FAS (TNFRSF6), CRH, CRHR1, CX3CR1, IL6R, IL6ST, LIF.</p>
<p>Transcription Factors and Regulators: <i>RNA Polymerase II Transcription Factors:</i> FOS, MEF2C. <i>Transcription Coactivators:</i> MEF2C, NR1I2. <i>Transcription Factors:</i> MEF2C, MYC, NR1I2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, TP53.</p>

O equipamento para a qPCR *Array* possui um sistema óptico para excitar a fluorescência e detectar a emissão de fótons, os dados adquiridos são enviados a um computador que os analisa com um *software*. Os limiares máximo e mínimo da fase exponencial do ciclo de reação são denominados *quantification cycle* (Cq) e as médias de Cq geram, com uma equação matemática, a taxa de expressão relativa fornecendo o *fold change*, ou mudança de razão, entre a amostra e o controle. O controle interno é feito com genes endógenos de referência para identificar variações dos resultados obtidos e a 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). Os testes estatísticos utilizados em RT-qPCR permitem fazer comparações entre dois grupos de amostras (PAGE & STROMBERG, 2011).

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 de 96 poços, com 84 genes diferentes, dentre os quais há genes para neurotrofinas e seus receptores e mais 12 poços, dentre esses 5 poços para genes endógenos de referência, 1 poço para controle de amplificação do DNA genômico, 3 poços para o controle da transcrição reversa e 3 poços para o controle positivo da PCR (PAHS-031Z), para a análise global e relativa da qPCR *Array*. As condições dos ciclos térmicos foram: 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. As reações foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística. Também foi optado por realizar a análise em *pool*, após a extração, purificação e análise do RNA, o material de cada paciente foi colocado junto para realizar a análise do conjunto dos pacientes, sendo portanto o resultado a expressão de todos os pacientes do grupo e não a análise individual de cada paciente. 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 do grupo de interesse, o grupo queleide, versus o grupo referencial ou controle. Por isso a

expressão gênica analisada dessa maneira é dita expressão gênica relativa.

O próprio programa apresenta os resultados de duas formas, num mapa de calor ou *heat map* e num gráfico de dispersão ou *scatter plot*. No mapa de calor temos a apresentação dos resultados de cada poço que representa cada gene analisado, em cores diferentes, vermelho representa gene hiperregulado ou hiperexpresso e verde revela gene hiporregulado ou hipoexpresso, preto e tons de cinza para genes sem diferença de expressão relativa. No gráfico de dispersão a linha central representa a expressão gênica do grupo de referência ou controle para o experimento, os pontos revelam valores do *fold change* ou a diferença de expressão, ou mudança de razão, do grupo em análise. As outras linhas, acima e abaixo da linha central, delimitam esse *fold change*, ou mudança de razão, igual a dois, sendo que pontos que ultrapassam a linha superior, que aparecem em vermelho, representam genes hiperregulados ou hiperexpressos e pontos que ultrapassam a linha inferior, que aparecem em verde, revelam genes hiporregulados ou hipoexpressos. 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.

Em cada curva, cada gene foi checado para eficiência, limiar máximo e mínimo e curva de padrão. Para garantir comparações entre curvas, o mesmo limiar foi estabelecido para todos os genes. Cinco genes endógenos de referência foram usados como controle interno e a média do valor Cq foi usado para padronizar a expressão gênica e determinou a diferença entre os grupos. A expressão gênica foi considerada regulada para cima ou regulada para baixo quando a diferença for maior que dois.

Metacore®

O Metacore® é um programa de computador que utiliza um banco de dados que foi acumulado manualmente. Este programa foi configurado para analisar itens (Apêndice 4), uma lista de genes que são trabalhados em um fluxo de rede que os conecta, construindo redes e estatísticas de cada item, através de algoritmos de análise de redes (PITTERI *et al.*, 2009).

O programa Metacore® (Thomson Reuters) foi utilizado *online* no site: <http://thomsonreuters.com/en/products-services/pharma-life-sciences/pharmaceutical-research/metacore.html>

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 significativo o valor $p < 0,05$ nos dois testes estatísticos adotados pelo programa: o teste não paramétrico de Wilcoxon para análises pareadas e teste não paramétrico de Friedman para análises múltiplas.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Na análise do perfil de expressão gênica de pacientes com queiloide de lóbulo de orelha obteve-se que os genes diferencialmente expressos com significância foram: proteína 1 de choque térmico (HSPB1), receptor de peptídeo de liberação da gastrina (GRPR), receptor 2 de liberação do hormônio corticotropina (CRHR2), receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY2R), interleucina 6 transdutora de sinal (IL6ST), fator de crescimento neural (NGF), metalotioneína 3 (MT3), leucemia linfóide crônica das células-B / linfoma 2 (BCL2), receptor A de colecistoquinina (CCKAR), persefina (PSPN), receptor da galanina 2 (GALR2) e substrato 3 do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FRS3).

O gene HSPB1 apresentou um *fold change* de -30,95 com $p=0,000281$, portanto hipoexpresso no queiloide. O gene HSPB1 codifica a proteína 1 de choque térmico com tamanho de 27 kDa, que é codificada durante estresse ambiental e processos ontogênicos, e também está envolvida na resistência a forças de tensão mecânica e na reorganização estrutural da actina no citoesqueleto.

O gene GRPR apresentou um *fold change* de -11,16 com $p=0,000047$, portanto hipoexpresso no queiloide. O gene GRPR codifica a proteína que forma o receptor do peptídeo de liberação da gastrina (GRP), este peptídeo atua na regulação de muitas funções no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central. Também atua na proliferação de células epiteliais e, em tecidos neoplásicos, pode ser um forte agente mitogênico. Este receptor sofre alteração importante na sua expressão em muitos tipos de câncer. Trata-se de um receptor glicosilado, transmembranar, acoplado à proteína G e que ativa a via de sinalização da fosforilipase C.

O gene CRHR2 apresentou um *fold change* de -9,35 com $p=0,000002$, portanto hipoexpresso no queiloide. O gene CRHR2 codifica a proteína que forma o receptor do hormônio corticotropina (CRH). O CRH, sintetizado no hipotálamo, atua na coordenação do sistema endócrino, do sistema imunológico e das respostas comportamentais frente ao estresse.

O gene NPY2R apresentou um *fold change* de -9,13 com $p=0,000386$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene NPY2R codifica a proteína que forma o receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY), expresso principalmente em células nervosas, é amplamente presente no sistema nervoso central e é muito abundante no hipotálamo tendo funções na regulação do apetite. Os receptores de NPY estão envolvidos em muitas funções biológicas, como na transmissão de sinal de dor, na modulação do ritmo cardíaco e no controle da liberação do hormônio pituitário.

O gene IL6ST apresentou um *fold change* de -8,93 com $p=0,000923$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene IL6ST codifica a proteína interleucina 6 transdutora de sinal, esta proteína faz parte do complexo proteico do receptor de citocina que pode ser acionado por interleucina 6 (IL6), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF) e oncostatina M (OSM).

O gene NGF apresentou um *fold change* de -7,14 com $p=0,000106$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene NGF codifica a proteína fator de crescimento neural, quando secretada, homodimeriza e forma um complexo proteico maior que regula o crescimento e a diferenciação de neurônios.

O gene MT3 apresentou um *fold change* de -6,57 com $p=0,002915$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene MT3 codifica a proteína metalotioneína 3, esta proteína se liga a íons de zinco e cádmio e conseqüentemente afeta a viabilidade celular, atua na homeostase do sistema nervoso central e tem efeito protetor contra danos no DNA em resposta a espécies reativas de oxigênio.

O gene BCL2 apresentou um *fold change* de -4,38 com $p=0,000009$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene BCL2 codifica a proteína leucemia linfóide crônica das células-B / linfoma 2 (Bcl-2), este gene codifica uma proteína que integra a membrana externa da mitocôndria e pode interromper a apoptose em algumas células, como nos linfócitos.

O gene CCKAR apresentou um *fold change* de -2,9 com $p=0,002353$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene codifica a proteína que forma o receptor A de colecistoquinina, este receptor é um mediador fisiológico da secreção de enzimas

pancreáticas e da contração do músculo liso do estômago e da vesícula biliar.

O gene PSPN apresentou um *fold change* de -2,57 com $p=0,000029$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene PSPN codifica a proteína persefina, um fator neurotrófico, que promove a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral em cultura.

O gene GALP2 apresentou um *fold change* de -2,16 com $p=0,000835$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene GALP2 codifica a proteína que forma o receptor 2 da galanina. A galanina é um neuromodulador encontrado no cérebro, no sistema gastrointestinal e no eixo hipotalamicopituitário.

O gene FRS3 apresentou um *fold change* de -2,02 com $p=0,011067$, portanto hipoexpresso no queloide. O gene FRS3 codifica a proteína que forma o substrato ligado ao receptor do fator de crescimento de fibroblasto. A proteína codificada é encontrada na membrana plasmática periférica e hiporregula a quinase 2 de regulação extracelular por ligação direta.

Os genes citados (Apêndice 4) foram consultados no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (13/07/2016) e <https://www.wikigenes.org> (13/07/2016).

Em resumo, dos 84 genes analisados no presente estudo, 12 (14%) apresentaram expressão gênica diferencial, sendo que desses 100% apresentaram-se hipoexpressos no queiloide comparados à pele do grupo controle, como mostra a figura 2.

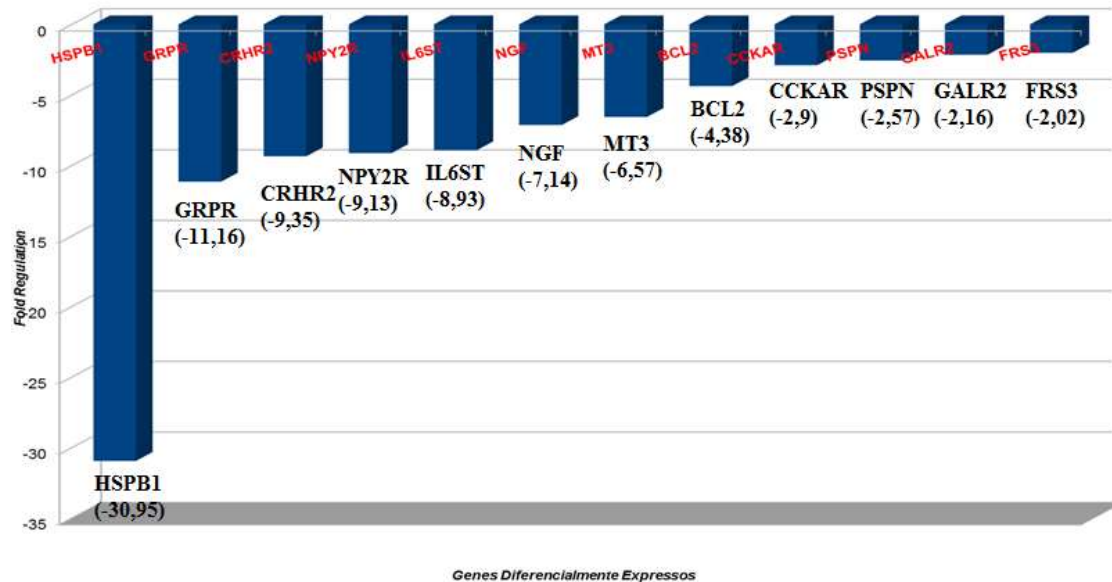


Figura 2 - Gráfico representando os 12 genes diferencialmente expressos, relacionados às neurotrofinas e receptores, no grupo queiloide de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].

A figura 3 representa o mapa de calor, ou *heat map*, com a representação em cores dos genes. Cada quadrado do gráfico representa um poço da placa do kit de genes, sendo que os quadrados verdes representam genes hiporregulados do grupo queloide em relação ao grupo controle (*fold change* ou mudança de razão menor que -2), o quadrado vermelho representa gene hiperregulado no queloide em relação ao grupo controle (*fold change* ou mudança de razão maior que 2), os quadrados na cor preta representam genes sem diferença significativa na expressão gênica entre os dois grupos (*fold change* ou mudança de razão entre 2 e -2) e os quadrados na cor cinza representam genes que não foram expressos.

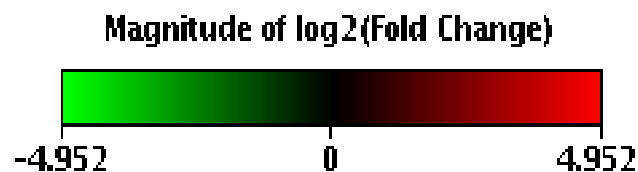
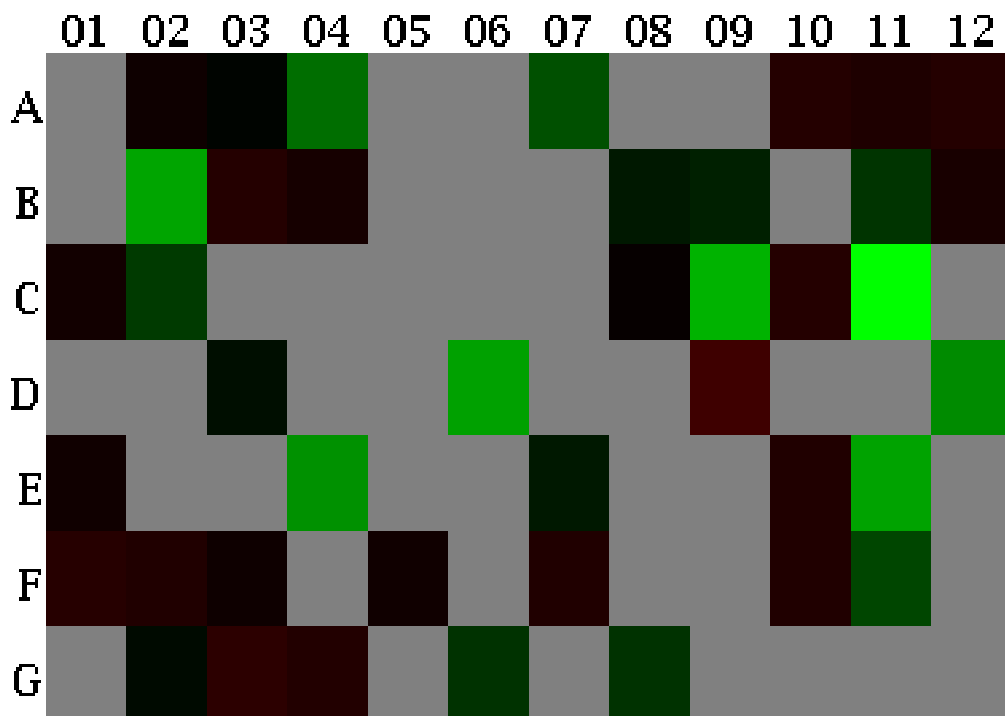


Figura 3 - *Heat Map*, ou mapa de calor, representando a expressão dos genes relacionados às neurotrofinas e receptores no grupo queloide de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].

A figura 4 representa o gráfico de dispersão, ou *scatter plot*, onde os resultados da expressão dos genes diferencialmente expressos aparecem como pontos de diferentes cores, vermelho mostra hiperexpressão, verde hipoexpressão e preto sem diferença significativa de expressão entre 2 e menos 2 no gráfico. Os pontos representam o grupo queiloide em relação ao grupo controle representado pela diagonal. Na expressão gênica do grupo queiloide em comparação ao grupo controle somente aparece um ponto vermelho no gráfico que representa o gene MAGED1 que apresentou $p=0,072544$, não sendo, portanto, significativo.

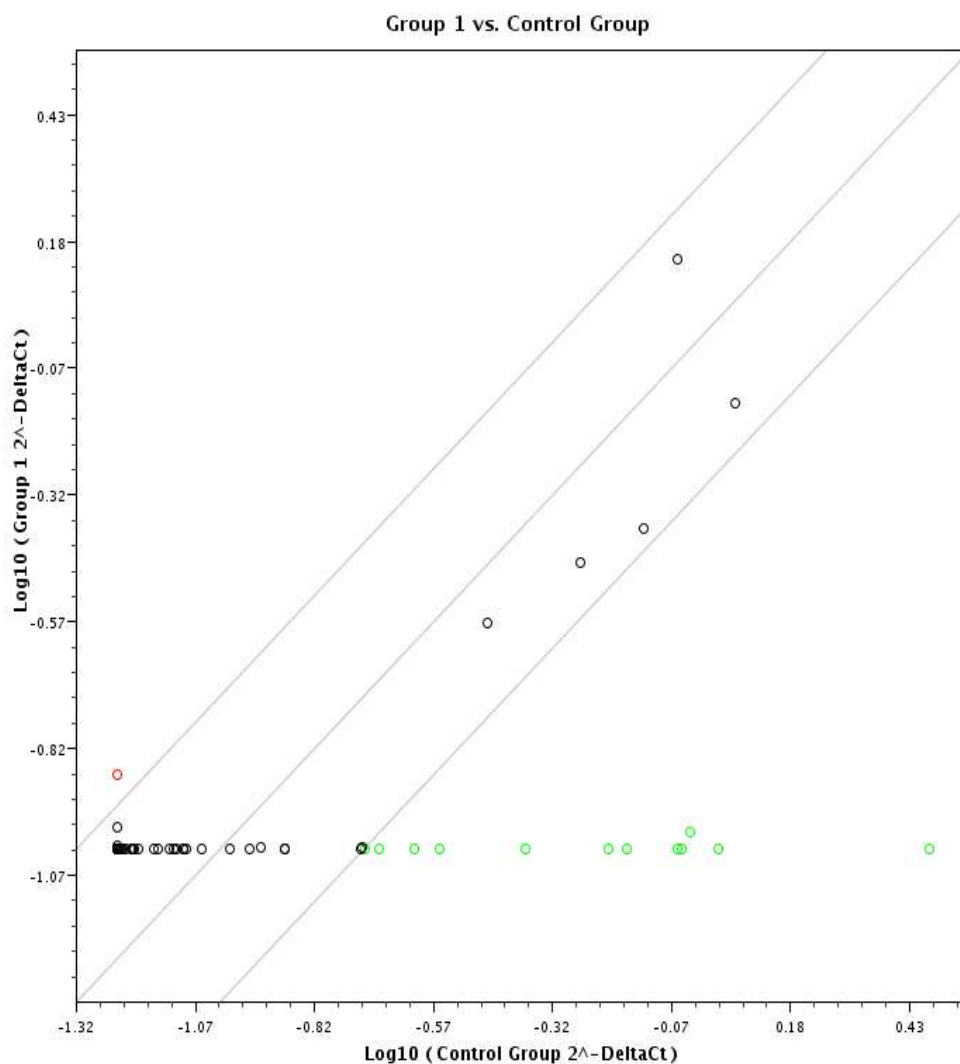


Figura 4 - *Scatter plot*, ou gráfico de dispersão, representando a expressão dos genes relacionados às neurotrofinas e receptores do grupo queiloide de lóbulo de orelha [n= 12] comparado ao grupo controle [n= 12].

A partir do programa Metacore® foram construídas redes selecionadas a partir de experimentos de expressão gênica obtidos por meio de ensaios de PCR Arrays. O conteúdo gênico dos arquivos enviados, em formato *excell 97-2003*, que continha uma lista de genes com os respectivos nomes e valores de Cq, foi usado para a geração de redes biológicas usando modelos de caminhos canônicos para o seu algoritmo de conjunto de dados com as configurações padrão.

Estes dados experimentais (Tabela 4) foram carregados na página inicial do programa Metacore®. Em seguida, as redes foram construídas em tempo real e é única para os dados enviados. Neste fluxo de trabalho as redes são priorizadas com base no número de fragmentos de vias canônicas na rede. Esta é uma variante do algoritmo mais curto com caminhos principais cujos parâmetros são o enriquecimento relativo com os dados enviados e a saturação relativa de redes com vias canônicas.

Tabela 4 - Genes diferencialmente expressos relacionados às neurotrofinas e receptores de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n= 12].

GENE	FOLD CHANGE	p
HSPB1	-30,95	0,000281
GRPR	-11,16	0,000047
CRHR2	-9,35	0,000002
NPY2R	-9,13	0,000386
IL6ST	-8,93	0,000923
NGF	-7,14	0,000106
MT3	-6,57	0,002915
BCL2	-4,38	0,000009
CCKAR	-2,9	0,002353
PSPN	-2,57	0,000029
GALR2	-2,16	0,000835
FRS3	-2,02	0,011067

p=significância estatística

Por meio do programa Metacore® foram construídas as vias canônicas para os genes relacionados às neurotrofinas e receptores. Nas Figuras de 5 a 8 são mostrados os quatro networks com maior detalhe acerca das vias intracelulares relacionadas a estes genes que se apresentaram diferencialmente expressos.

As vias canônicas dos genes relacionados às neurotrofinas e receptores, estabelecidas por meio do programa Metacore®, dos genes hiperregulados de queiloide do lóbulo de orelha em relação aos controles, mostram 4 networks relevantes, a saber: no network 01 (Figura 5) a persifina (PSPN) encontra-se presente com atuação mais intensa do que a do fator de crescimento neural (NGF), neste network uma das vias está envolvida com a sinalização de superfície celular da resposta de imunização; no network 02 (Figura 6) se destaca a ação do neuropeptídeo Y e uma das vias deste network está envolvida com o desenvolvimento de projeções neurais; no network 03 (Figura 7) encontra-se uma via relacionada com a regulação positiva da fosforilação proteica, respostas aos compostos de oxigênio e organonitrogenados e regulação positiva do processo metabólico do fósforo, neste network surge uma contribuição positiva moderada do NGF em uma mesma via em que a proteína gp130, expressa pelo gene IL6ST, sofre uma ação positiva; e no network 04 (Figura 8), que envolve a resposta celular a substâncias orgânicas, o receptor CCKAR contribui positivamente ativando proteínas G.

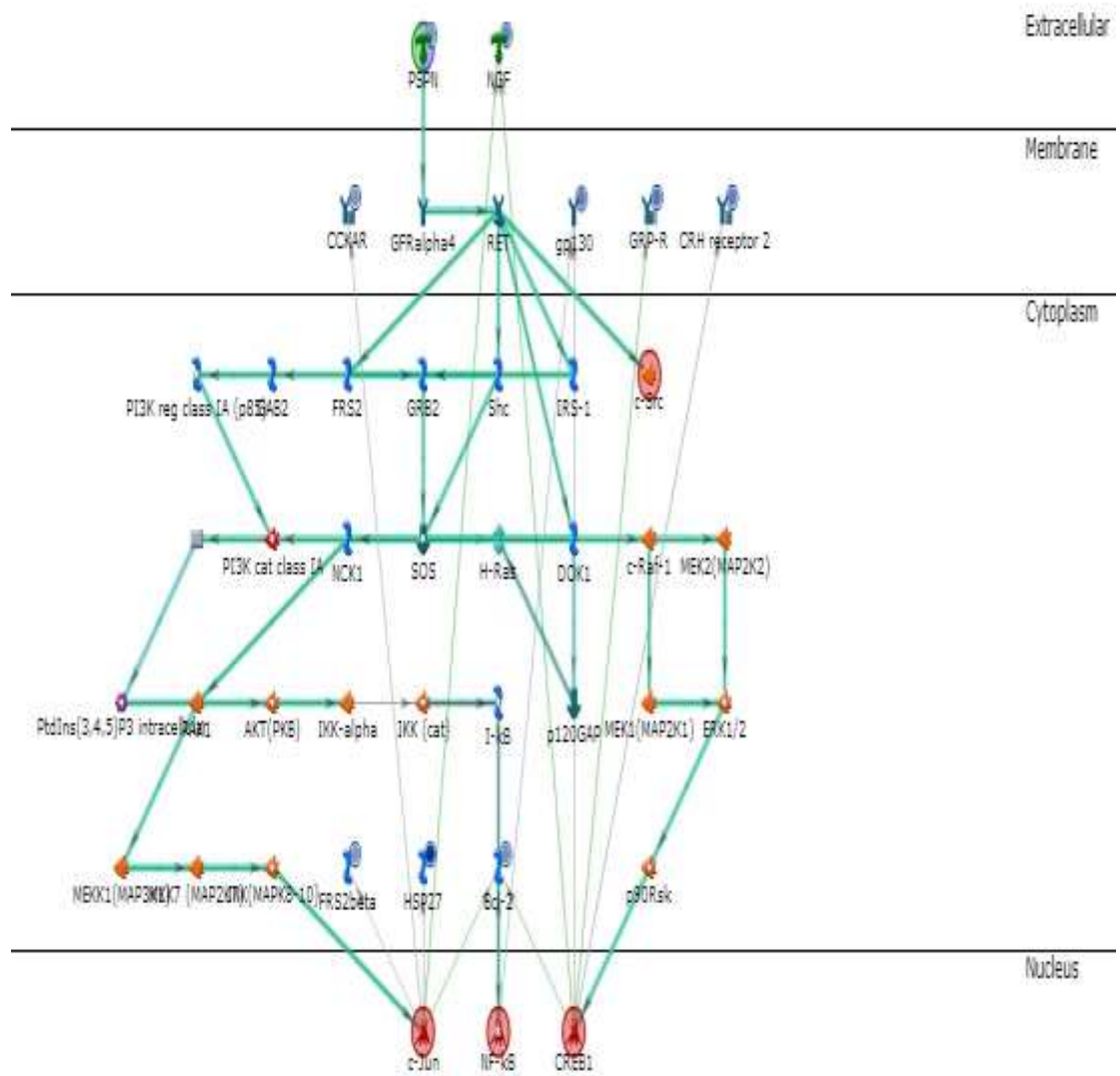


Figura 5 - Análise por Metacore® de genes de queiloide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network 01* (c-Jun, CREB1, NF-kB, c-Src, PSPN). Ontologias Gênicas relacionadas: via de sinalização do receptor Fc, via de sinalização da proteína do receptor ligado à enzima, a sinalização do receptor Fc-epsilon, a via de sinalização da proteína do receptor transmembranar da tirosina quinase, via de sinalização do receptor de superfície da resposta de imunoregulação celular.

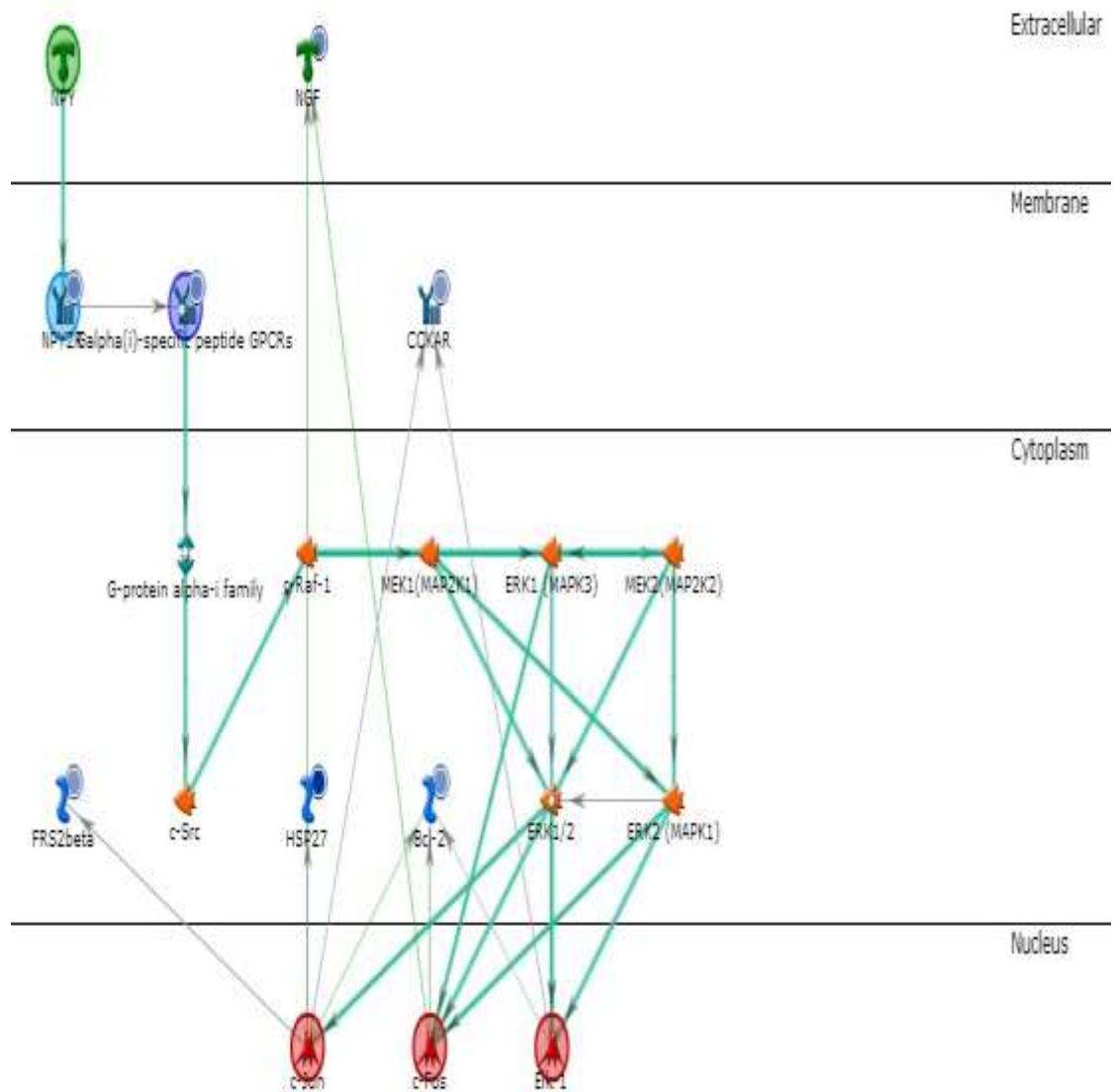


Figura 6 - Análise por Metacore® de genes de queleide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network 02* (c-Jun, Elk-1, c-Fos, Galpha(i)-specific peptide GPCRs, NPY). Ontologias Gênicas relacionadas: resposta celular ao estímulo do fator de crescimento, a resposta ao fator de crescimento, desenvolvimento de projeções neuronais, regulação da herança de Golgi, a ativação da atividade de MAPK.

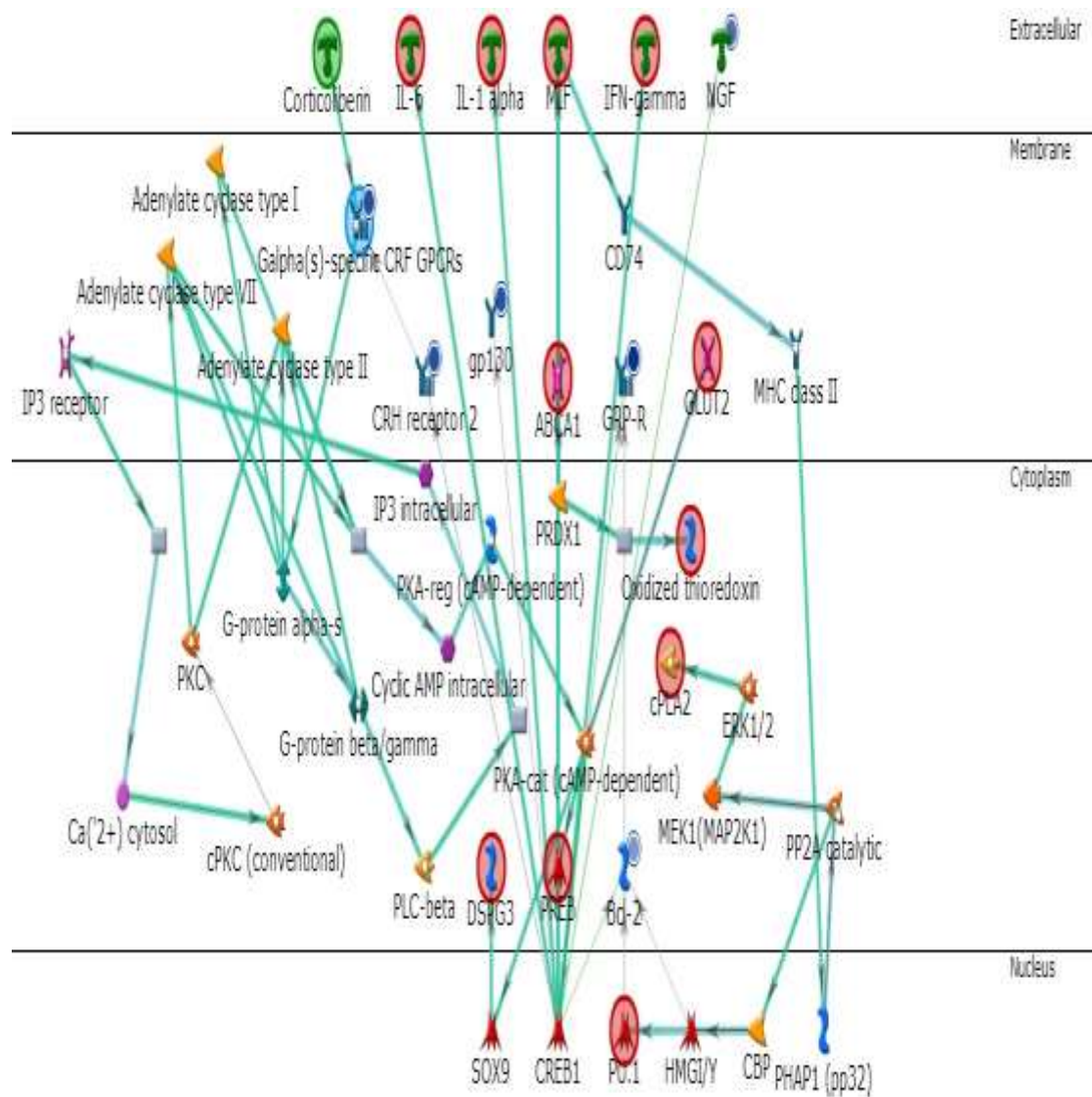


Figura 7 - Análise por Metacore® de genes de queleide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network 03* (PU.1, MIF, cPLA2, PREB, ABCA1). Ontologias Gênicas relacionadas: resposta ao composto que contém oxigênio, regulação positiva da fosforilação proteica, resposta ao composto organonitrogenados, regulação positiva de fosforilação e regulação positiva do processo metabólico do fósforo.

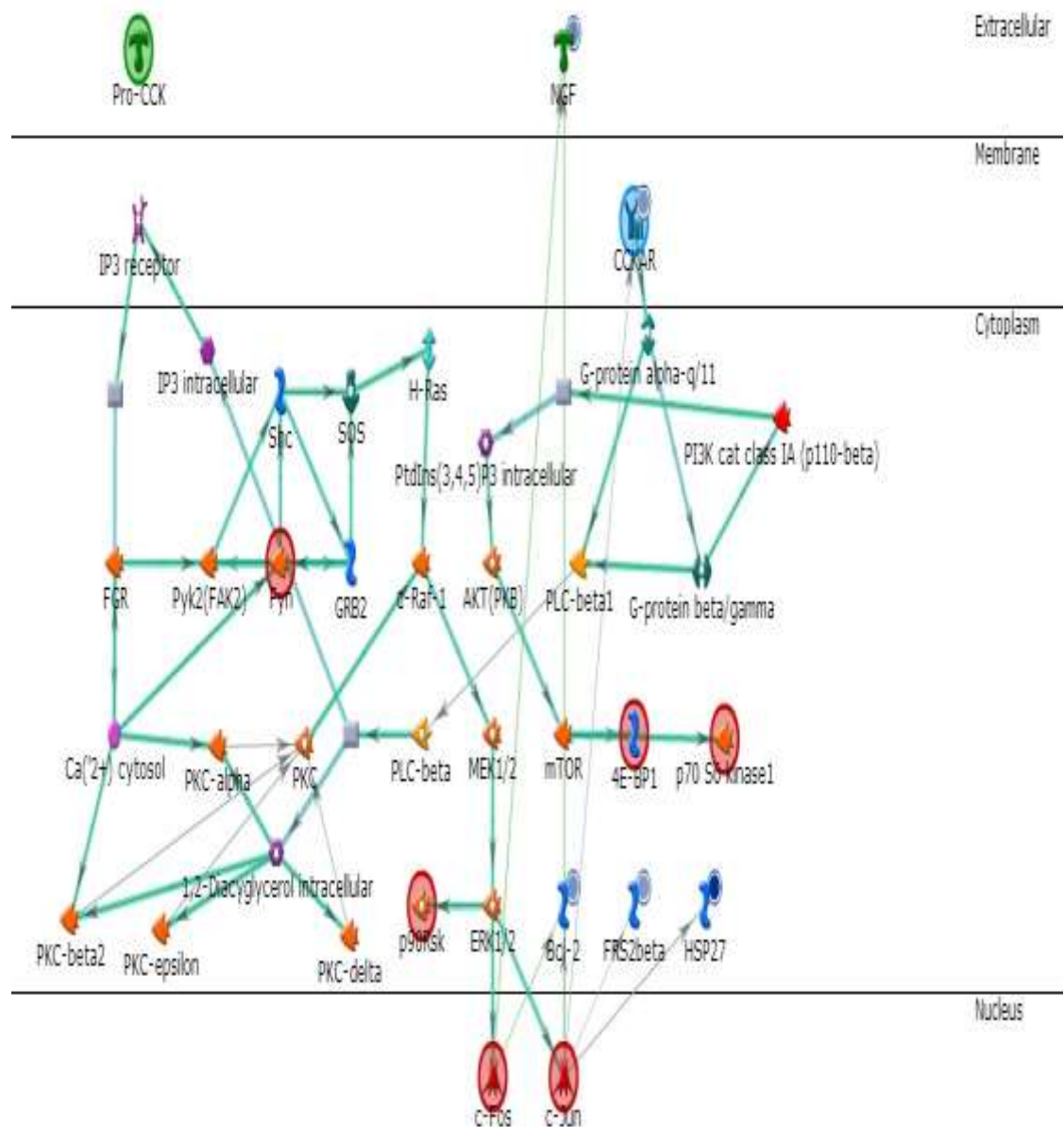


Figura 8 - Análise por Metacore® de genes de queuloide de lóbulo de orelha [n= 12] vs controles [n=12]. *Network 04* (c-Jun, Fyn, c-Fos, 4E-BP1, p70 S6 kinase1). Ontologias Gênicas relacionadas: via de sinalização da proteína do receptor ligado à enzima, via de sinalização da proteína transmembrana do receptor tirosina-quinase, resposta aos compostos organonitrogenados, resposta aos compostos nitrogenados, e resposta celular a substâncias orgânicas.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O estudo do perfil da expressão gênica de neurotrofinas e receptores no queiloide é original e torna-se essencial para o maior entendimento da fisiopatogenia de uma alteração cicatricial tão frequente, com várias hipóteses de desenvolvimento, portanto, sem apresentar um tratamento definitivo e ideal para o sofrimento desses pacientes. Assim, foi realizada essa análise resultando em 12 (14%) genes diferencialmente expressos, 100% hipoexpressos, e associadamente realizada a análise das vias e processos celulares dos quais esses genes participam. A integração desses resultados trouxe conhecimentos essenciais à literatura, com respeito em especial aos genes HSPB1, GRPR e NGF no queiloide.

O estudo incluiu pacientes sem tratamento prévio para o queiloide, em número de 12, mostrando a característica população acometida, que é da faixa etária de 25 anos e apresenta prevalência semelhante em relação ao gênero, foram 5 homens e 7 mulheres. E no grupo controle a faixa etária foi de 36 anos, pois são pacientes com indicação de cirurgia estética, mamoplastia, que tendem a procurar a cirurgia após gestações, e foram todas do sexo feminino. A mamoplastia foi escolhida, pois ao lado da abdominoplastia, são procedimentos operatórios onde existe a retirada de grande extensão de pele excedente, que normalmente é desprezada, e no caso do presente estudo foi utilizada como parâmetro de ausência de doenças e vícios que são os critérios para indicação cirúrgica e no caso do estudo representa paciente hígida sem histórico de alterações de qualquer natureza.

Quanto à escolha da área anatômica para o grupo controle, mama, não ter sido a mesma área onde foi coletado o queiloide, do lóbulo de orelha, pela pequena extensão da região e pela escassez de procedimentos operatórios nessa área que possibilitem a retirada sem deformação estética do lóbulo para a realização do estudo. Sabe-se que a expressão gênica das células, fibroblastos, muda em diferentes áreas anatômicas do corpo, portanto, procurou-se a literatura específica para definir essas diferenças e possíveis similaridades.

Rinn *et al.* (2006) descreveram que as células em diferentes localizações no corpo apresentam expressão similar com um padrão utilizando um sistema de código de genes, na forma de variação de expressão gênica, através do qual os fibroblastos reconhecem a sua região de origem com função semelhante. A maior parte da variação de expressão gênica relativa encontrada pelos pesquisadores divide o corpo em três divisões anatômicas: anterior e posterior no tronco, proximal e distal nos membros, dérmico e de órgãos internos. O padrão binário encontrado nas três divisões anatômicas é eixo central do modelo de identidade posicional dos fibroblastos em que o padrão espacial de diferenciação dos fibroblastos seria definido pela sua posição mais do que simplesmente pela sua origem. Portanto, este modelo confere suporte teórico para a escolha das amostras utilizadas no presente estudo, visto que o lóbulo de orelha, para as amostras do queiloide, e as mamas, para a pele controle, estão localizados na região anterior do tronco, acima da cicatriz umbilical, apresentando similaridades de expressão gênica.

Os genes diferencialmente expressos e hipoexpressos no presente estudo foram a proteína β 1 de choque térmico (HSPB1) [-31], receptor de peptídeo de liberação da gastrina (GRPR) [-11], receptor 2 de liberação do hormônio corticotropina (CRHR2) [-9], receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY2R) [9], interleucina 6 transdutora de sinal (IL6ST) [-9], fator de crescimento neural (NGF) [-7], metalotioneína 3 (MT3) [-6,5], leucemia linfóide crônica das células-B / linfoma 2 (BCL2) [-4,3], receptor A de colecistoquinina (CCKAR) [-2,9], persefina (PSPN) [-2,5], receptor da galanina 2 (GALR2) [-2] e substrato 3 do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (FRS3) [-2].

Quanto ao gene HSPB1 com *fold change* de -30,95 ($p=0,000281$), sendo portanto um gene hipoexpresso no grupo queiloide, codifica a proteína β 1 de choque térmico 27 (hsp27), também é conhecido pelas siglas HSPB1, CMT2F, HMN2B, HSP27, HSP28, Hsp25, SRP27, HS.76067 e HEL-S-102. A proteína codificada por esse gene está envolvida na resistência às forças de tensão mecânica e na reorganização estrutural da actina no citoesqueleto da célula e também é uma proteína codificada durante estresse ambiental e processos ontogênicos. No estudo de SUAREZ *et al.* (2014), que envolveu cultura 3D de fibroblastos de queiloide e de pele normal, foi

observado que após a exposição da cultura à tensão além de os fibroblastos dos dois grupos passarem a proliferar mais também passaram a expressar mais o gene HSPB1. Embora nos dois grupos tenha ocorrido aumento de proliferação e de expressão de HSPB1, no grupo quelóide estes dois eventos foram mais acentuados. Os pesquisadores também constataram que ao silenciar a expressão do gene HSPB1 os fibroblastos passavam a apresentar um aspecto mais arredondado, o que seria uma evidência de que este gene estaria envolvido com a capacidade da célula de se estender e resistir às forças de tensão. Naquele estudo os pesquisadores concluíram que a tensão mecânica exerce modificação na expressão de proteínas relacionadas à tensão, à matriz extracelular, ao estiramento e à proliferação celular.

TOTAN, ECHO, YUKSEL (2011) ao avaliarem a expressão de proteínas do choque térmico em amostras de quelóide e pele normal constataram, por *Western blotting*, ensaio imunoenzimático e microscopia imunofluorescente, que a proteína hsp27, expressa pelo gene HSPB1, estava mais expressa nas amostras de quelóide comparado às amostras de pele normal. O resultado obtido para a proteína hsp27 e para outras proteínas de choque térmico investigadas naquele estudo levou os autores a concluir que seus resultados estavam condizentes com a fisiopatologia do quelóide. LEE *et al.* (2012) observaram que em cultura de células endoteliais cultivadas junto com células tumorais houve diminuição da secreção de HSPB1. Também demonstraram que o HSPB1 extracelular regula o VEGF solúvel. Os autores concluíram que o HSPB1 se ligaria ao VEGF e então impediria a angiogênese, portanto a inibição da secreção de HSPB1 permitiria ao VEGF promover a angiogênese e, conseqüentemente, a regeneração.

A hipoeexpressão de HSPB1 encontrada no presente estudo demonstra-se coerente com a conclusão de LEE *et al.* (2012) de que a inibição de HSPB1 promoveria a angiogênese. Porém o resultado no presente estudo para a expressão do gene HSPB1 foi discrepante comparado com o resultado para a proteína hsp27 obtido por TOTAN, ECHO, YUKSEL (2011), em que esta proteína estava mais expressa em amostras de quelóide, e também para os resultados do estudo de SUAREZ *et al.* (2014), já que no presente estudo foi constatado que o gene HSPB1 esteve hipoeexpresso no grupo quelóide, enquanto que no estudo de SUAREZ *et al.* (2014) a cultura de fibroblastos

provenientes de queloides passaram a expressar mais o gene HSPB1.

Quanto ao gene GRPR com *fold change* de -11,16 ($p=0,000047$), sendo, portanto, um gene hipoexpresso no grupo queloides, e que codifica a proteína do receptor de peptídeo de liberação da gastrina, também é conhecido pela sigla BB2. A proteína codificada por esse gene está envolvida na regulação de diversas funções no trato gastrointestinal e no sistema nervoso central, atuando também na proliferação de células epiteliais e tem o potencial de ser um agente mitogênico potente em tecidos neoplásicos. JEFFRY, KIM, CHEN (2011) consideraram o receptor GRPR essencial para a transmissão de sinal de prurido do sistema nervoso periférico até o cérebro, embora estes mesmos autores tenham sugerido que este receptor não seja o único a estimular neurônios a gerar o prurido. Posteriormente, BENECKE, LOTT, STÄNDER (2013) mencionaram que o GRPR é um alvo importante a ser investigado na pele nas pesquisas contra o prurido crônico.

SUKHTANKAR & KO (2013) verificaram que o GRPR pode regular o prurido, independentemente da atuação de outros receptores para o mesmo propósito, em regiões da medula espinal e supra-espinal de camundongos, porém observaram que se antagonistas do GRPR forem administrados em altas doses podem suprimir outros receptores além do GRPR. Segundo LIU & JI (2013) o receptor CGRP, em células neurais sensoriais, estaria envolvido com o sinal de prurido gerado e enviado por neurônios até o cérebro. Ao serem acionados, os receptores do tipo CGRP, estimulam as populações de células neurais que tem o potencial de efetivamente gerar o prurido e, ainda segundo os autores, os estímulos de dor eventualmente aumentariam o estímulo de prurido gerado por estes neurônios. Recentemente KIGUCHI *et al.* (2016) demonstraram que o sistema GRP-GRPR não é o único a atuar na regulação do prurido e que formas de atuar contra o prurido podem ter eficácia se administradas no sistema nervoso central e não no sistema nervoso periférico.

No presente estudo o gene GRPR mostrou-se hipoexpresso, achado este que vai contra a importância do receptor GRPR nos estudos anteriores, como apontam os autores supracitados. O GRPR é necessário para a transmissão de sinal de prurido e como mencionam BENECKE, LOTT, STÄNDER (2013), o GRPR é um alvo importante a ser investigado em pesquisas contra o prurido crônico. Porém como

apontam os estudos de SUKHTANKAR & KO (2013) e KIGUCHI *et al.* (2016) o GRPR não é o único receptor envolvido na sinalização do prurido, o que permitiria supor que outros receptores poderiam estar envolvidos com o prurido relatado por diversos pacientes com queiloide. O gene GRPR é importante na regulação da transmissão de sinal de prurido, sendo essa queixa frequente dos pacientes com queiloide. Como na literatura não existe estudo que relacione diretamente o gene GRPR ao queiloide fica do presente estudo a contribuição ao conhecimento científico da hiporregulação deste em queiloide de orelha não tratado comparado à pele hígida de mama.

Quanto ao gene CRHR2 com *fold change* de -9,35 ($p=0,000002$), hipoexpresso no queiloide, este gene codifica a proteína do receptor 2 de liberação do hormônio corticotropina, também conhecido pelas siglas CRF2, CRFR2, CRF-RB e HM-CRF. A proteína codificada por esse gene está envolvida na coordenação do sistema endócrino, do sistema imunológico e das respostas comportamentais frente ao estresse. Não foi encontrada literatura com este gene referente ao queiloide.

Quanto ao gene NPY2R com *fold change* de -9,13 ($p=0,000386$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína do receptor Y2 do neuropeptídeo Y, também é conhecido pela sigla NPY2R. Este receptor, expresso principalmente em células nervosas, é amplamente presente no sistema nervoso central e é muito abundante no hipotálamo tendo funções na regulação do apetite. Os receptores de NPY estão envolvidos em muitas funções biológicas, como na transmissão de sinal de dor, na modulação do ritmo cardíaco e no controle da liberação do hormônio pituitário. No estudo de KLOSTER *et al.* (2014) ficou evidenciado que mutações no gene NPY2R estariam envolvidas com a idade de início de manifestação da doença de Huntington, doença que acomete células nervosas, em uma das duas variantes de polimorfismo de nucleotídeo único houve maior expressão do receptor NPY2R e, comparado com o outro polimorfismo, houve atraso na idade de início da doença de Huntington.

Embora no estudo de KLOSTER *et al.* (2014) o enfoque esteja em uma doença neurodegenerativa os resultados obtidos para o gene do NPY2R são sugestivos, fazendo um paralelo para o estudo atual do queiloide onde há muitas fibras nervosas, pois as alterações gênicas pontuais no NPY2R puderam ser associadas à doença de Huntington

com o porém de que na mutação onde o gene RPY2R foi mais expresso a manifestação daquela doença foi mais tardia que na outra mutação, evidenciando que possivelmente a maior expressão de uma mutação, e de sua correspondente proteína RPY2R, resultaria em uma compensação em que a perda parcial de função do receptor com a mutação seria compensada pelo seu maior número nas fibras nervosas. Os resultados daquele estudo indicam que as mutações pontuais no RPY2R resultariam em uma diminuição da função deste receptor assim como a quantidade de receptor também influiria no momento de manifestação da doença estudada, o que é um indício favorável à constatação no presente estudo de que o NPY2R esteve hipoexpresso no grupo queiloide, este resultado seria um indício de que a hipoexpressão do NPY2R poderia influenciar no surgimento e na manutenção do queiloide.

Quanto ao gene IL6ST com *fold change* de -8,93 ($p=0,000923$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína interleucina 6 transdutora de sinal, também é conhecido pelas siglas CD130, GP130, CDW130 e IL-6RB. A proteína codificada por esse gene faz parte do complexo proteico do receptor de citocina que pode ser acionado por interleucina 6 (IL6), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF) e oncostatina M (OSM). GHAZIZADEH *et al.* (2007) constataram pela técnica da PCR semiquantitativa que o gene IL6ST encontrava-se hiperexpresso nos fibroblastos de queiloide comparados com os fibroblastos de pele normal. Quanto às amostras de queiloide fixadas em formalina ou congeladas os autores constataram que das 10 amostras disponíveis, apenas 6 apresentavam hiperexpressão do gene IL6ST comparado ao grupo de pele normal. Em seu estudo os referidos autores concluíram que a via de sinalização da IL-6 deve estar envolvida no surgimento do queiloide, o que envolveria a proliferação de fibroblasto e o aumento na produção de colágeno.

Segundo O'REILLY *et al.* (2012) a molécula IL6ST pode homodimerizar e quanto maior for a homodimerização de IL6ST menor será a sinalização e a expressão gênica, pois a trans-sinalização depende da formação do complexo molecular formado por IL-6, IL-6R e IL6ST, na eventualidade de haver IL-6R solúvel entre as células se leucócitos liberarem IL-6R após sofrerem apoptose em um processo inflamatório no tecido, o conjunto molecular, IL-6/IL-6R/IL6ST, poderia ativar outras células, como os monócitos, pois o conjunto IL-6R/IL-6 solúvel se ligaria à molécula IL6ST da

membrana plasmática da célula.

Os achados de GHAZIZADEH *et al.* (2007) evidenciaram que o aumento de expressão do gene IL6ST deve ter influência na proliferação de fibroblastos de quelóide *in vitro* e também evidenciaram que em diferentes amostras de quelóide podem haver diferentes níveis de expressão do gene IL6ST, o que torna o dado obtido no presente estudo, a hipoexpressão do gene IL6ST no grupo quelóide, não compatível com os achados de GHAZIZADEH *et al.* (2007), entretanto no presente estudo as amostras de quelóide tiveram a expressão gênica avaliada em *pool* e não em amostras individuais, embora na apresentação final da média de cada opção de apresentação dos resultados tenha-se um resultado similar. Considerando os achados de O'REILLY *et al.* (2012) frente ao resultado da expressão gênica do IL6ST no presente estudo, que foi hipoexpresso, podemos supor que a menor concentração de IL6ST no tecido do quelóide diminuiria a homodimerização de IL6ST deixando-as disponíveis para a formação do complexo molecular IL-6/IL-6R/IL6ST, porém a formação deste complexo molecular também poderia diminuir na mesma proporção em que a proteína IL6ST seria hiporregulada, segundo nossa hipótese quanto mais complexo molecular IL-6/IL-6R/IL6ST formado maior seria a fibrose formada no tecido.

Quanto ao gene NGF com *fold change* de -7,14 ($p=0,000106$), hipoexpresso no quelóide e que codifica a proteína do fator de crescimento neural, também é conhecido pelas siglas NGFB, HSAN5 e Beta-NGF. A proteína codificada por esse gene está envolvida na regulação do crescimento e da diferenciação de neurônios. MICERA *et al.* (2006) observou em fibroblastos e queratinócitos, *in vitro*, que a suplementação do meio de cultura com NGF não acarretou em alterações na frequência em que ocorria mitose assim como não houveram alterações na produção de colágeno pelos fibroblastos, contudo uma constatação importante foi que na cultura dos dois tipos celulares as células se converteram em miofibroblastos e estes começaram a expressar metaloproteinase do tipo MMP-9.

Segundo AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU (2008) a concentração mais elevada de NGF encontrada em cicatrizes seria consequência da maior produção e liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas estimuladas por sinais mecânicos na pele, embora esses autores não descrevam no seu estudo qual a localização de origem e

tipo do queloide utilizado e tenha realizado várias técnicas para análise da expressão gênica diferentes do qPCR usado no presente estudo. OGAWA (2008) também relatou que haveria elevação nos níveis do NGF em queloide e cicatriz hipertrófica devido à liberação de NGF por diversos tipos celulares encontrados na pele estimulados pelos neuropeptídeos liberados pelas fibras nervosas sensoriais da pele que sofreram alterações na sua resposta mecanossensitiva.

Segundo WEI *et al.* (2012) o NGF seria um dos mediadores intermediários no desenvolvimento da dor inflamatória, e em seu estudo foi descoberto que a substância P pode estimular queratinócitos a produzir NGF. Para BENECKE, LOTTIS, STÄNDER (2013) o NGF tem função de mediador inflamatório e em concentrações elevadas poderia direcionar o desenvolvimento dos nervos sensoriais e favorecer a formação de prurido. BLAIS *et al.* (2013) lançaram a hipótese de que o NGF, além de atuar na migração e manutenção de fibras nervosas sensoriais, também seria um fator angiogênico secretado por queratinócitos durante processos de reparação da pele, experimentalmente os autores puderam demonstrar, *in vitro*, que o NGF aumentou entre 40% e 80% a quantidade de estruturas semelhantes a capilares em cultura. Embora no estudo de MICERA *et al.* (2006) tenha ocorrido a descoberta de que em cultura tanto fibroblastos quanto queratinócitos se transformaram em miofibroblastos após a suplementação com NFG, esta suplementação não acarretou em alterações na frequência da mitose dos fibroblastos assim como na produção de colágeno por parte deste tipo de célula em cultura.

Para WEI *et al.* (2012) e BENECKE, LOTTIS, STÄNDER (2013) o NGF teria também funções como um mediador no processo inflamatório, o que sugeriria que esta molécula deveria estar mais expressa em processos inflamatórios como no queloide, portanto a hipoexpressão do NGF encontrada no presente estudo foi contrária a este direcionamento. Quanto à hipótese de BLAIS *et al.* (2013), que postula uma função angiogênica do NGF, esta também mostrou-se contrária à constatação de que o NGF foi hipoexpresso no queloide. No presente estudo o NGF hipoexpresso no grupo queloide contrariou a perspectiva apontada anteriormente na literatura, que pressupõe que o NGF seria mais expresso no queloide que em pele normal, porém no presente estudo a hiporregulação deste gene poderia ser justificada em parte pelo fato desses outros

estudos não apresentarem a mesma localização que a atual, lóbulo de orelha não tratados, e analisados por outros métodos diferentes do qPCR adotado no presente estudo.

Quanto ao gene MT3 com *fold change* de -6,57 ($p=0,002915$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína metalotioneína 3, também é conhecido pelas siglas GIF, GIFB, GRIF e ZnMT3. A proteína codificada por esse gene se liga a íons de zinco e cádmio e conseqüentemente afeta a viabilidade celular, atua na homeostase do sistema nervoso central e tem efeito protetor contra danos no DNA em resposta a espécies reativas de oxigênio. TOH *et al.* (2010) descobriram que nas células KF suplementadas com 5% e 10% de FBS houve aumento da proliferação celular e de deposição de colágeno acompanhados de hiporregulação das isoformas de metaloproteínas (MT). A adição de soro ao meio de cultura de KF promoveu a proliferação celular, a deposição de colágeno e a hiporregulação de isoformas das proteínas MT nas células KF. Também constataram em cultura de KF com silenciamento do gene MT-2A que nestas células houve promoção da proliferação celular, e que a exposição das células KF ao TGF- β 1 hiporregula a isoforma MT-2A. TOH *et al.* (2010) suspeitaram que a hiporregulação de isoforma MT-2A poderia estar envolvida na formação do queiloide e sugerem que a hiporregulação de isoformas das proteínas MT em queiloide reduziria a ativação da colagenase e isso diminuiria a degradação do colágeno.

PULA *et al.* (2015) observaram que a expressão proteica de MT3 entre carcinoma de células escamosas e carcinoma basocelular varia muito, sendo mais expresso no primeiro carcinoma e menos expresso no segundo, enquanto a expressão na pele normal foi intermediária entre estas outras duas. É interessante notar que naquele estudo a variação na expressão de MT3 nos dois tipos de carcinomas tenha sido grande, com o carcinoma de células escamosas tendo hiperexpressão e com o carcinoma basocelular tendo hipoexpressão se comparados com a pele normal, sugerindo que a hiperexpressão ou a hipoexpressão por si só não é o suficiente para conferir malignidade a um tumor. Os resultados e as conclusões apresentados por TOH *et al.* (2010) são condizentes com a hipoexpressão de MT3 encontrada no presente estudo e nos permite convergir com estes autores na sugestão de que a hiporregulação de metaloproteínas poderia estar envolvida com a formação do queiloide. Conclui-se que os resultados

obtidos por PULA *et al.* (2015) demonstram que o MT3 não deve estar diretamente envolvido com a malignidade do tumor, o que estaria condizente com a hipoexpressão do gene MT3 observada no presente estudo.

Quanto ao gene BCL2 com *fold change* de -4,38 ($p=0,000009$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína leucemia linfoide crônica das células-B / linfoma 2, também é conhecido pelas siglas Bcl-2 e PPP1R50. A proteína codificada por esse gene integra a membrana externa da mitocôndria e pode interromper a apoptose em algumas células, como nos linfócitos. JURZAK *et al.* (2014) observaram que em fibroblastos provenientes de queiloide o gene BCL2 encontrava-se hipoexpresso comparado aos fibroblastos provenientes de pele normal. No ano seguinte, após avaliarem os resultados de seus experimentos *in vitro*, LEE *et al.* (2015) sugeriram que quando houvesse hiporregulação do gene BCL2 nos fibroblastos de queiloide por consequência ocorreria um aumento na apoptose destes fibroblastos. A hiporregulação do gene BCL2 encontrada no presente estudo está coerente com a observação feita por JURZAK *et al.* (2014) em seu estudo, quanto à sugestão de LEE *et al.* (2015) concorda-se que esta está coerente com o que ocorre no queiloide, em especial na região central da massa fibrótica, onde é sabido ter um aumento de apoptose, sendo que a atividade principal ocorre na periferia da lesão.

Quanto ao gene CCKAR com *fold change* de -2,9 ($p= 0,002353$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína que forma o receptor A de colecistoquinina, também é conhecido pelas siglas CCK-A, CCK1R, CCKRA e CCK1-R. A proteína codificada por esse gene este receptor é um mediador fisiológico. A literatura é ausente relativa à associação do gene CCKAR e queiloide ou pele ou fibrose. Existe relação com obesidade. Esse receptor é o maior mediador fisiológico da secreção de enzima pancreática e da contração da musculatura lisa da bexiga e do estômago. No sistema nervoso central e periférico, esse receptor regula a saciedade e a liberação de beta endorfina e dopamina.

Quanto ao gene PSPN com *fold change* de -2,57 ($p=0,000029$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína persefina, também é conhecido pela sigla PSP. A proteína codificada por esse gene é um fator neurotrófico que promove a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral em cultura. Na avaliação feita

por BABA *et al.* (2015) da expressão proteica e gênica da persifina (PSPN) em cultura de células derivadas do carcinoma oral de células escamosas, tendo como grupo controle células de queratinócitos humanos normais, foi constatado que a expressão proteica e gênica de PSPN estavam hiperreguladas. Os pesquisadores também notaram que havia uma correlação entre a expressão proteica de PSPN e o tamanho que tumor alcançou no paciente, esta correlação seria um indício de que a PSPN poderia ser responsável pelo desenvolvimento deste tumor maligno, o que levou-os a concluir que a PSPN deve atuar na proliferação celular estando funcionalmente e clinicamente relacionado com a progressão tumoral. Comparando os dados obtidos por BABA *et al.* (2015) em seu estudo com a constatação no presente estudo de que o gene PSPN esteve hipoexpresso no grupo queiloide fica evidente que os dois tipos de tumores apresentaram resultados opostos, o que permite sugerir que a hipoexpressão do gene PSPN seria um evento que não poderia conferir malignidade aos tumores.

Quanto ao gene GALR2 com *fold change* de -2,16 ($p=0,000835$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína do receptor 2 da galanina, também é conhecido pelas siglas GAL2-R, GALNR2 e GALR-2. A proteína codificada por esse gene está envolvida com a neuromodulação no cérebro, no sistema gastrointestinal e no eixo hipotalamicopituitário. Como foi sugerido por JIMENEZ-ANDRADE *et al.* (2004) o GALR2 seria um dos receptores de papel central no aumento da inflamação neurogênica e da dor inflamatória, porém no presente estudo o gene GALR2 apresentou-se hipoexpresso, o que sugere que no queiloide podem existir outras moléculas envolvidas na inflamação neurogênica e na dor relatada por parte dos portadores de queiloide. DALLOS *et al.* (2006) conseguiram demonstrar que o gene GALR2 e sua respectiva proteína estavam sendo expressos em queratinócitos humanos em cultura e em pele humana normal. Tanto nas células HaCaT quanto nos queratinócitos humanos de cultura foram detectadas, para o gene GALR2, a transcrição de mRNA por PCR e corrida em gel de agarose, assim como a tradução de sua respectiva proteína tanto por *Western blotting* como por imunocitoquímica com anticorpos policlonais contra GALR2 humano. DALLOS *et al.* (2006) provaram que queratinócitos humanos em cultura e células HaCaT expressam mRNA e proteína do receptor GALP2. Estes dados não entram em conflito com a hipoexpressão de GALR2 encontrada no grupo queiloide no presente estudo, mas mostra que em pele normal o receptor GALR2 está presente na

camada basal da epiderme e ao redor de vasos sanguíneos na derme, sugerindo que este receptor deve ser importante na manutenção de uma epiderme saudável e deve ter influência na vascularização da epiderme. SCHMIDHUBER *et al.* (2007) foram os primeiros a constatar que o extravasamento plasmático na pele de camundongos, estimulado pela injeção de SP e de CGRP, promoveu hiperexpressão de mRNA do GALR2, demonstrando que o GALR2 estaria envolvido na modulação inflamatória do edema periférico, sendo contrário ao resultado obtido no presente estudo, sendo realizado em tecido humano e sem estímulos como no estudo desses autores.

Quanto ao gene FRS3 com *fold change* de -2,02 ($p= 0,011067$), hipoexpresso no queiloide e que codifica a proteína que forma o substrato ligado ao receptor do fator de crescimento de fibroblasto, também é conhecido pelas siglas SNT2, FRS2B, SNT-2, FRS2beta e FRS2-beta. A proteína codificada por esse gene é encontrada na membrana plasmática periférica e hiporregula a quinase 2 de regulação extracelular por ligação direta. Como foi observado por VALENCIA *et al.* (2011) a diferença na expressão gênica, entre diferentes linhagens de células derivadas de câncer de próstata, dos genes FRS2 e FRS3 varia pouco, com apenas 6% a 8% das linhagens de tumor com alguma alteração significativa na expressão deste dois genes. Estes pesquisadores também observaram, em cultura de células de câncer de próstata com adição de fator de crescimento de fibroblasto, que ocorria mais mitose nesta cultura com hiperexpressão do gene FRS3. Portanto, a hiporregulação do gene FRS3 encontrada no presente estudo é compatível, visto que no queiloide ocorre maior taxa de apoptose de fibroblastos, e não uma maior proliferação de fibroblastos como ocorreu no estudo citado acima.

O presente estudo trouxe uma nova contribuição ao conhecimento científico, pois o perfil de expressão gênica do queiloide de lóbulo de orelha não tratado em comparação com a expressão gênica da pele hígida de mama, com hiporregulação de doze genes relacionados às neurotrofinas e seus receptores (da placa PAHS-031Z), é original.

Como perspectivas, existe a necessidade de coleta e análise de queiloide submetido ao tratamento com corticosteroides tópicos e por infiltração intralesional, tamoxifeno, e comparar com esses resultados obtidos no presente estudo, onde os pacientes não foram submetidos a nenhum tratamento prévio ao queiloide. Também é

necessário o estudo de novas áreas doadoras como controle para comparação aos resultados do queiloide, sendo a cicatriz de aspecto normal possível controle para comparar ao queiloide. Também utilização de pele próxima ao lóbulo de orelha, excedente de pele em cirurgia de ritidoplastia, pré e retro auricular, além de correções de lóbulo bifido ou correção de orelha em abano, embora algumas em faixa etária diferente à média de idade do grupo queiloide. Assim como, um completo perfil do padrão da expressão gênica do queiloide, e posterior busca e utilização de drogas que possam estimular ou silenciar genes para o tratamento definitivo do queiloide.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Dos 84 genes analisados, 12 (14%) apresentaram expressão gênica diferencial, sendo que desses 100% apresentaram-se hipoexpressos no quelóide de lóbulo de orelha não tratado comparados à pele do grupo controle, e os genes prioritários para estudo são HSPB1, GRPR, NGF, MT3 e BCL2.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: Neurogenic inflammation hypotheses. *Medical Hypotheses*. 2008;71:32–8.
- Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model*. 2010;7:1-37.
- Baba T, Sakamoto Y, Kasamatsu A, Minakawa Y, Yokota S, Higo M, Yokoe H, Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H, Uzawa K. Persephin: A potential key component in human oral cancer progression through the RET receptor tyrosine kinase-mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Mol Carcinog*. 2015;54(8):608-17.
- Benecke H, Lotts T, Ständer S. Investigational drugs for pruritus. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2013;22(9):1167-79.
- Blais M, Levesque P, Bellenfant S, Berthod F. Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 and Glial-Derived Neurotrophic Factor Enhance Angiogenesis in a Tissue-Engineered In Vitro Model. *Tissue Engineering*. 2013;15(19):1655-64.
- Bock O, Yu H, Zitron S, Bayat A, Ferguson MWJ, Mrowietz U. Studies of Transforming growth factors beta 1–3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm Venereol*. 2005;85:216–20.
- Campaner AB, Ferreira LM, Gagnani A, Bruder JM, Cusick JL, Morgan JR. Upregulation of TGF- β 1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol*. 2006;126:1168–76.
- Dallos A, Kiss M, Polyánka H, Dobozy A, Kemény L, Husz S. Galanin receptor expression in cultured human keratinocytes and in normal human skin. *J Peripher Nerv Syst*. 2006;11(2):156-64.
- De Felice B, Garbi C, Santoriello M, Santillo A, Wilson RR. Differential apoptosis markers in human keloids and hypertrophic scars fibroblasts. *Mol Cell Biochem*. 2009;327(1-2):191-201.

Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc.* 2009;81(3):623-9.

Freitas JO, Quieregatto PR, Hochman B, Lapin GA, Mella SM, Maximino JR, Chadi G, Ferreira LM. Does dexamethasone act in neuropeptides SP and CGRP in neurogenic inflammation of the skin? An experimental study. *Acta Cir Bras.* 2015;30(8):523-8.

Furtado F, Hochman B, Farber PL, Muller MC, Hayashi LF, Ferreira LM. Psychological stress as a risk factor for post operative keloid recurrence. *J Psychosom Res.* 2012;72(4):282-7.

Ghazizadeh M, Tosa M, Shimizu H, Hyakusoku H, Kawanami O. Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(1):98-105.

Hochman B, Bôas FCV, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2005;20(3):200-12.

Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, Ferreira LM. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol.* 2008;158(3):651-2.

Hochman B, Farkas CB, Isoldi FC, Ferrara SF, Furtado F, Ferreira LM. Keloid and hypertrophic scar distribution according to Fitzpatrick skin phototypes. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2012;27(2):185-189.

Hochman B, Pinfildi CE, Nishioka MA, Furtado F, Bonatti S, Monteiro PK, Antunes AS, Quieregatto PR, Liebano RE, Chadi G, Ferreira LM. Low-level laser therapy and light-emitting diode effects in the secretion of neuropeptides SP and CGRP in rat skin. *Lasers Med Sci.* 2014;29(3):1203-8.

Hochman B, Isoldi FC, Silveira TS, Borba GC, Ferreira LM. Does ear keloid formation depend on the type of earrings or piercing jewellery? *Australasian Journal of Dermatology* 2015;56:77-9.

Jeffrey J, Kim S, Chen ZF. Itch signaling in the nervous system. *Physiology (Bethesda).* 2011; 26 (4):286-92.

Jimenez-Andrade JM, Zhou S, Du J, Yamani A, Grady JJ, Castañeda-Hernandez G, Carlton SM. Pro-nociceptive role of peripheral galanin in inflammatory pain. *Pain.*

2004;110(1-2):10-21.

Joaquim RA, Kuhlmei A, Dinh QT, Handjiski, Fischer T, Peters EMJ, Klapp BF, Arck PC. Neuronal plasticity of the “brain–skin connection”: stress-triggered up-regulation of neuropeptides in dorsal root ganglia and skin via nerve growth factor-dependent pathways. *J Mol Med.* 2007;85:1369-78.

Jurzak M, Adamczyk K, Anto-Czak P, Garnarczyk A, Ku&amierz D, Latocha M. Evaluation of genistein ability to modulate CTGF mRNA/protein expression, genes expression of TGFbeta isoforms and expression of selected genes regulating cell cycle in keloid fibroblasts in vitro. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research.* 2014;71(6):972-86.

Kiguchi N, Sukhtankar DD, Ding H, Tanaka K, Kishioka S, Peters CM, Ko MC. Spinal Functions of B-Type Natriuretic Peptide, Gastrin-Releasing Peptide, and Their Cognate Receptors for Regulating Itch in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016; 356 (3): 596-603.

Kloster E, Saft C, Akkad DA, Epplen JT, Arning L. Association of age at onset in Huntington disease with functional promoter variations in NPY and NPY2R. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(2):177-84.

Lee YJ, Lee HJ, Choi SH, Jin YB, An HJ, Kang JH, Yoon SS, Lee YS. Soluble HSPB1 regulates VEGF-mediated angiogenesis through their direct interaction. *Angiogenesis.* 2012;15(2):229-42.

Lee YJ, Kwon SB, Kim CH, Cho HD, Nam HS, Lee SH, Lee MW, Nam DH, Choi CY, Cho MK. Oxidative Damage and Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Protein Expression in Normal Skin and Keloid Tissue. *Ann Dermatol.* 2015;27(5);507-16.

Liu T & Ji R-R. New insights into the mechanisms of itch: are pain and itch controlled by distinct mechanisms? *Pflugers Arch.* 2013;465(12):1-24.

Lotti T, Hautmann G, Panconesi E. Neuropeptides in skin. *J Am Acad Dermatol.* 1995; 33(3):482-96.

Martínez-Martínez E, Galván-Hernández CI, Toscano-Márquez B, Gutiérrez-Ospina G. Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. *PLoS ONE.* 2012;5(7):1-17.

- Micera A, Lambiase A, Puxeddu I, Aloe L, Stampachiacchiere B, Levi-Schaffer F, Bonini S, Bonini S. Nerve growth factor effect on human primary fibroblastic-keratocytes: possible mechanism during corneal healing. *Exp Eye Res.* 2006;83(4):747-57.
- Naitoh M, Kubota H, Ikeda M, Tanaka T, Shirane H, Suzuki S, Nagata K. Gene expression in human keloids is altered from dermal to chondrocytic and osteogenic lineage. *Genes Cells.* 2005;10(11):1081–91.
- Ogawa R. Keloid and hypertrophic scarring may result from a mechanoreceptor or mechanosensitive nociceptor disorder. *Med Hypotheses.* 2008;71(4):493-500.
- O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, Hügler T, van Laar JM. Interleukin-6, its role in fibrosing conditions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012;23(3):99-107.
- Page RB, Stromberg AJ. Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:1383-93.
- Parkhouse N, Crowe R, McGrouther DA, Burnstock G. Painful hypertrophic scarring and neuropeptides. *Lancet.* 1992;340(8832):1410.
- Pitteri SJ, JeBailey L, Faça VM, Thorpe JD, Silva MA, Ireton RC, Horton MB, Wang H, Pruitt LC, Zhang Q, Cheng KH, Urban N, Hanash SM, Dinulescu DM. Integrated proteomic analysis of human cancer cells and plasma from tumor bearing mice for ovarian cancer biomarker discovery. *PLoS One.* 2009;4(11):1-13.
- Pula B, Tazbierski T, Zamirska A, Werynska B, Bieniek A, Szepietowski J, Rys J, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M. Metallothionein 3 expression in normal skin and malignant skin lesions. *Pathol Oncol Res.* 2015;21(1):187-93.
- Ramos MLC, Gragnani A, Ferreira LM. Microarray as a new tool to study hypertrophic and keloid scarring. *Wounds.* 2009;21:57-63.
- Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet.* 2006;2(7):e119.
- Schmidhuber S M, Santic R, Tam C W, Bauer J W, Kofler B, Brain S D. Galanin-Like

Peptides Exert Potent Vasoactive Functions In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127:716–21.

Scott J, Muangman P, Gibran N. Making sense of hypertrophic scar: a role for nerves. *Wound Rep Reg*. 2007;15:S27–31.

Suarez E, Syed F, Rasgado TA, Walmsley A, Mandal P, Bayat A. Skin equivalent tensional force alters keloid fibroblast behavior and phenotype. *Wound Repair Regen*. 2014;22(5):557-68.

Sukhtankar DD, Ko MC. Physiological function of gastrin-releasing peptide and neuromedin B receptors in regulating itch scratching behavior in the spinal cord of mice. *PLoS One*. 2013; 8 (6): 1-8.

Toh PP, Li JJ, Yip GW, Lo SL, Guo CH, Phan TT, Bay BH. Modulation of metallothionein isoforms is associated with collagen deposition in proliferating keloid fibroblasts in vitro. *Exp Dermatol*. 2010;19(11):987-93.

Totan S1, Echo A, Yuksel E. Heat shock proteins modulate keloid formation. *Eplasty*. 2011;11:190-202.

Umemura AY, Orgaes FAFS, Canicoba NJB, Dorsa PP, Guarizzo J, Gonella HA. Resultados do tratamento das cicatrizes queloidianas com cirurgia e imiquimo de 5% creme: um estudo prospectivo. *Rev. Bras. Cir. Plást*. 2011; 26(1): 3-9.

Valencia T, Joseph A, Kachroo N, Darby S, Meakin S, Gnanapragasam VJ. Role and expression of FRS2 and FRS3 in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:484.

Walburn J, Vedharab K, Hankinsa M, Rixona L, Weinmana J. Psychological stress and wound healing in humans: A systematic review and meta-analysis. *J Psychosomatic Res*. 2009;67:253–71.

Wei T, Guo T-Z, Li W-W, Hou S, Kingery W S, Clark JD. Keratinocyte expression of inflammatory mediators plays a crucial role in substance P – induced acute and chronic pain. *J Neuroinflam*. 2012;9:1-15.

Yagmur C, Guneren E, Kefeli M, Ogawa R. The effect of surgical denervation on prevention of excessive dermal scarring: A study on rabbit ear hypertrophic scar model. *JPRAS*. 2011;64:1359-65.

Yamaoka J, Di ZH, Sun w, Kawana S. Changes in cutaneous sensory nerve fibers

induced by skin-scratching in mice. *J Dermatol Sci.* 2007;46:41-51.

Zhang Z, Nie F, Chen X, Qin Z, Kang C, Chen B, Ma J, Pan B, Ma Y. Upregulated periostin promotes angiogenesis in keloids through activation of the ERK 1/2 and focal adhesion kinase pathways, as well as the upregulated expression of VEGF and angiopoietin-1. *Molecular Medicine Reports.* 2015;11:857-64.

ABSTRACT

Introduction: The resulting fibrosis in the healing process can be steeper than usual forming hyperproliferative skin scarring such as hypertrophic scar and keloid, which latter is unique to humans. Both scars have more nerve fiber endings, compared to normal skin, suggesting that neuropeptides and neurotrophins were involved in generating, maintaining and postoperative recurrence of these scars. **Objective:** To evaluate the expression of 84 genes related to neurotrophins and receptors in keloid. **Methods:** Were collected twelve (12) samples of keloid in keloid group and twelve (12) normal skin samples in the control group. Total RNA was purified with Qiagen RNeasy Minikit DNase and the quantity and quality of the extracted RNA were assessed by spectrophotometry. The mRNA was used for cDNA synthesis. The reverse transcription reactions were carried out using the First Strand Kit RT² Superarray Bioscience, according to the manufacturer's protocol and RT-qPCR was performed using the PCR RT² Profiler® Superarray Bioscience array 84 where relevant human genes involved were analyzed the neurotrophin synthesis and their receptors - Human neurotrophins & receptors PCR Array (PAHS-031Z). **Results:** Twelve (12/84 or 14%) genes - HSPB1, GRPR, CRHR2, NPY2R, 1L6ST, NGF, MT3, BCL2, CCKAR, PSPN, GalR2 and FRS3 were differentially expressed in keloid. **Conclusion:** The differentially expressed genes, 100% hypo-expressed in keloid compared to normal skin, and priority genes are HSPB1, GRPR, CRHR2, NGF, MT3 and BCL2.

Keywords: 1. Keloid; 2. Gene Expression; 3. Wound Healing; 4. Nerve growth factor.

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: "EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES EM QUELOIDE".

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 em fragmentos de queiloide, doença que acomete parte da população e que prejudica a cicatrização de feridas e determina vários sintomas e consequências importantes para as atividades diárias, será avaliado a produção de proteínas em fragmentos de pele de pacientes com queiloide. Sendo que esse convite esta sendo realizado a pacientes normais sem queiloide, com sua pele normal para participarem como controle do estudo da doença. A amostra a ser utilizada é a pele em excesso que seria descartada no lixo hospitalar, durante a realização do procedimento operatório estético - abdominoplastia ou mamoplastia, que V.Sa. será submetida.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: durante o procedimento operatório estético, mamoplastia ou abdominoplastia, ao qual será submetido, pele normal excedente geralmente é retirada e descartada. Essa pele que normalmente seria desprezada no lixo hospitalar será utilizada nos experimentos do estudo 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, existindo o risco probabilisticamente baixo de reação alérgica por conta do procedimento anestésico. Há o risco de o procedimento deixar cicatrizes nos locais de incisão na pele, bem como risco de infecção por conta do procedimento cirúrgico. Outro risco que os procedimentos operatórios podem oferecer é de hemorragias durante e após o procedimento. A fim de diminuir todos esses riscos, o procedimento será realizado por equipe qualificada e seguindo a técnica padrão utilizada na instituição.

6 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto ao paciente no presente estudo. Porém, o queiloide é uma cicatriz complexa de difícil

tratamento, que prejudica a qualidade de vida do paciente. Assim, com a obtenção de novos conhecimentos sobre mediadores inflamatórios que estão envolvidos na formação do quelóide, o estudo estará colaborando com todos os pacientes com quelóide 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: agragnanif@gmail.com. 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, portanto, todo material biológico obtido da preparação dos fragmentos de pele para os testes genéticos serão utilizados somente para esta pesquisa e posteriormente serão devidamente descartados.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "EXPRESSÃO GÊNICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES EM QUELOIDE."

Eu discuti com o Prof. Alfredo Gragnani Filho, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente

em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante

legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

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

Prof. Alfredo Gragnani

Data ____ / ____ / ____

Apêndice 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Queloide

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

1 – Título do projeto: "EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES EM QUELOIDE".

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 em fragmentos de queiloide, avaliando a produção de proteínas e expressão de genes em fragmentos de pele oriundos de pacientes com queiloide. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele com queiloide, durante o procedimento de retirada desse e enviada ao laboratório.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: durante o procedimento operatório a que o paciente irá retirar o fragmento de pele com o queiloide, a amostra será coletada e enviada ao laboratório para ser utilizado no experimento. Não será realizada nenhuma conduta diferente da que é feita na cirurgia dos pacientes que não estão no estudo, o paciente não será submetido a nenhuma mudança na rotina. 4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados: amostras de pele com queiloide serão coletadas e enviadas ao laboratório. O procedimento é realizado como de rotina, com anestesia local, seguindo todo o protocolo cirúrgico técnico da retirada, sem mudanças do que é realizado a todos os pacientes.

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do estudo: Nenhum desconforto fora do habitual aos pacientes que são submetidos à cirurgia será acrescentado ao paciente, existindo o risco probabilisticamente baixo de reação alérgica por conta do procedimento anestésico. Há o risco de o procedimento deixar cicatrizes nos locais de incisão na pele, bem como risco de infecção por conta do procedimento cirúrgico. Outro risco que os procedimentos operatórios podem oferecer é de hemorragias durante e após o procedimento. A fim de diminuir todos esses riscos, o procedimento será realizado por equipe qualificada e seguindo a técnica padrão utilizada na instituição. O procedimento operatório para a retirada do quelóide ao qual será submetido possui os mesmos riscos de recidiva do que os procedimentos operatórios padrão utilizados na instituição para tratamento de quelóide. Logo, o risco de recidiva existe assim como em qualquer outro procedimento existente com este fim. 6 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto ao paciente no presente estudo. Porém, o queiloide é uma cicatriz complexa de difícil tratamento, que prejudica a qualidade de vida do paciente. Assim, com a obtenção de novos conhecimentos sobre mediadores inflamatórios que estão envolvidos na formação do queiloide, o estudo estará colaborando com todos os pacientes com queiloide no futuro com as possíveis mudanças em protocolos se os dados mostrarem essa necessidade. 7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não existem, pois os procedimentos relacionados no estudo são realizados de rotina, sem nenhuma mudança, somente que, a pele normal que sai junto do tecido necrótico ou morto e que seria desprezada, e no estudo será coletada e enviada ao laboratório.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Alfredo Gragnani Filho, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Telefone(s): 5576.4118. E-mail: agragnanif@gmail.com. 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, portanto, todo material biológico obtido da preparação dos fragmentos de pele para os testes genéticos serão utilizados somente para esta pesquisa e posteriormente serão devidamente descartados.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: "EXPRESSÃO GÊNICA DE NEUROTROFINAS E RECEPTORES EM QUELOIDE."

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

Assinatura do paciente/representante

legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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

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

Prof. Alfredo Gagnani

Data ____ / ____ / ____

Apêndice 3

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão Gênica de Neuropeptídeos e Neurotrofinas em Quelóide.

Pesquisador: ALFREDO GRAGNANI FILHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34825214.1.0000.5505

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 820.141

Data da Relatoria: 08/10/2014

Apresentação do Projeto:

CONFORME PARECER CONSUBSTANCIADO CEP nº 786.189 de 10/09/2014

Objetivo da Pesquisa:

CONFORME PARECER CONSUBSTANCIADO CEP nº 786.189 de 10/09/2014

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

CONFORME PARECER CONSUBSTANCIADO CEP nº 786.189 de 10/09/2014

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

TRATA-SE DE RESPOSTAS DE PENDÊNCIAS DO PARECER ORIGINAL CONSUBSTANCIADO CEP nº 786.189 de 10/09/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

CONFORME PARECER CONSUBSTANCIADO CEP nº 786.189 de 10/09/2014

Recomendações:

NADA CONSTA

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas de Pendências de acordo com os seguintes questionamentos:

Sobre o Projeto:

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: 820.141

Metodologia: não está clara como será obtida a pele normal, como no TCLE - não há referência a mamoplastia, abdomenplastia, onde será realizada, etc; fala-se em cirurgia na "Casa da Plástica" que se aplica para os quelóides e não para as dos pacientes que "doarão" a pele normal excedente das cirurgias citadas

RESPOSTA: Metodologia esclarecida e descrita no projeto e no TCLE. PENDÊNCIA ATENDIDA

Sobre o TCLE:

1) Riscos: apesar de os participantes da pesquisa serem submetidos a cirurgias de rotina, com riscos "habituais", deverá ser incluída descrição minuciosa de todos os riscos, inclusive a possibilidade bem conhecida de recidiva do quelóide

2) Deverá ficar claro no TCLE se o material biológico obtido após a preparação dos fragmentos de pele para os testes genéticos será armazenado em biobanco ou biorepositório para futuros estudos ou se será utilizado só para esta pesquisa e descartado.

RESPOSTA: Novo TCLE apresentado adequadamente, com a descrição dos procedimentos e riscos da pesquisa e informando que o material coletado será utilizado somente para a pesquisa presente (e descartado). PENDÊNCIA ATENDIDA

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatório, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

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: 820.141

SAO PAULO, 06 de Outubro de 2014

Assinado 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:** cepunfesp@unifesp.br

Apêndice 4

HSPB1: proteína 1 de choque térmico 27 kDa (*heat shock 27 kDa protein 1*)

Também conhecido como: CMT2F; HMN2B; HSP27; HSP28; Hsp25; SRP27; HS.76067; HEL-S-102. A proteína codificada por este gene é induzida por estresse ambiental e mudanças de desenvolvimento. A proteína codificada está envolvida na resistência à tensão e a organização da actina e se transloca desde o citoplasma para o núcleo após indução de estresse. Defeitos neste gene causa Charcot-Marie-Tooth tipo 2F (CMT2F) e neuropatia motora distal hereditária (dHMN). [fornecido por RefSeq, Out 2008]

GRPR: receptor de peptídeo de liberação da gastrina (*gastrin-releasing peptide receptor*)

Também conhecido como: BB2. O peptídeo de liberação da gastrina (GRP) regula várias funções do trato gastrointestinal e do sistema nervoso central, incluindo a liberação de hormônios gastrointestinais, a contração de células musculares lisas, e proliferação de células epiteliais e é um potente agente mitogênico para tecidos neoplásicos. Os efeitos do GRP são mediados através do receptor de peptídeo de liberação da gastrina. Este receptor é um receptor glicosilado, 7-transmembranar acoplado à proteína G que ativa a via de sinalização da fosfolipase C. O receptor é expresso de forma aberrante em muitos tipos de cancer, tais como os do pulmão, cólon, e da próstata. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

CRHR2: receptor 2 de liberação do hormônio corticotropina (*corticotropin releasing hormone receptor 2*)

Também conhecido como: CRF2; CRFR2; CRF-RB; HM-CRF. A proteína codificada por este gene pertence à família da proteína G acoplada a receptores 2, e à subfamília do receptor do hormônio de liberação da corticotropina. Este receptor apresenta uma elevada afinidade para o hormônio de liberação de corticotropina (CRH), e também se liga a peptídeos relacionados com CRH, tais como a urocortina. CRH é sintetizado no hipotálamo, e desempenha um papel importante na coordenação do sistema endócrino, autônomo, às respostas comportamentais ao estresse e ao sistema imunológico. Estudos em ratos sugerem que este receptor talvez esteja envolvido na mediação da homeostase cardiovascular. Para este gene foram descritas diferentes isoformas codificadas por variantes transcritas por splicing alternativo. [Fornecida por RefSeq, Jan 2011]

NPY2R: receptor Y2 do neuropeptídeo Y (*neuropeptide Y receptor Y2*)

Os receptores do neuropeptídeo Y (NPY) são uma família de receptores acoplados à proteína Gi/O que está dividido em quatro subtipos: Y1, Y2, Y4 e Y5. Receptores de NPY media diversas ações biológicas, incluindo a estimulação da ingestão de alimentos, ansiólise, a modulação do ritmo circadiano, a transmissão da dor e controle da liberação do hormônio pituitário. Todos os quatro subtipos de receptores de NPY são encontrados em concentrações elevadas no cérebro e no cólon e também são encontrados numa ampla variedade de tecidos periféricos em níveis mais baixos. Os genes humanos que codificam para os receptores Y1, Y2 e Y5 estão localizados no cromossomo 4, 4q31.3-q32, e o gene humano que codifica Y4 é localizado no cromossomo 10, 10q11.2. [Resumo da Tocris para o gene NPY2R]

IL6ST: interleucina 6 transdutora de sinal (*interleukin 6 signal transducer*)

Também conhecido como: CD130; GP130; CDW130; IL-6RB. A proteína codificada por este gene é um transdutor de sinal partilhada por muitas citocinas, incluindo a interleucina 6 (IL6), fator neurotrófico ciliar (CNTF), fator inibidor de leucemia (LIF), e oncostatina M (OSM). Esta proteína funciona como uma parte do complexo do receptor de citocina. A ativação desta proteína está dependente da ligação de citocinas aos seus receptores. vIL6, uma proteína relacionada com a IL6 e codificada pelo vírus do herpes Kaposi associado ao sarcoma, pode ignorar o receptor de interleucina 6 (IL6R) e ativar diretamente a proteína. Estudos em ratos knockout sugerem que este gene tem um papel crítico na regulação da apoptose do miócito. Variantes de splicing alternativo de transcritos foram descritos. Um pseudogene relacionado foi identificado no cromossomo 17. [fornecido por RefSeq, maio de 2014]

NGF: fator de crescimento neural (polipeptídeo beta) [*nerve growth factor (beta polypeptide)*]

Também conhecido como: NGFB; HSAN5; Beta-NGF. Este gene é um membro da família NGF-beta e codifica uma proteína secretada que homodimeriza e é incorporada num complexo maior. Esta proteína possui atividade estimuladora do crescimento de nervo e o complexo está envolvido na regulação do crescimento e na diferenciação de neurônios sensoriais e simpáticos determinados. Mutações neste gene têm sido associados com neuropatia sensorial hereditária e autonômica, tipo 5 (HSAN5), e a desregulação da expressão deste gene está associada com a rinite alérgica. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

MT3: metalotioneína 3 (*metallothionein 3*)

Também conhecido como: GIF; GIFB; GRIF; ZnMT3. MT3 (metalotioneína 3) é um gene que codifica uma proteína afiliada com a classe lncRNA. Doenças associadas com MT3 incluem cistadenoma serosa pancreática e doença de Alzheimer. Ações relacionadas a este gene incluem ligação de sua proteína ao íon de cobre e de inibidor da atividade de cisteína endopeptidase em processo de apoptose.

BCL2: LLC das células-B / linfoma 2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*)

Também conhecido como: Bcl-2; PPP1R50. Leucemia linfóide crônica (LLC). Este gene codifica uma proteína integrante da membrana externa da mitocôndria que bloqueia a morte apoptótica de algumas células, tais como linfócitos. A expressão constitutiva de BCL2, tal como no caso de translocação de BCL2 ao locus da cadeia pesada de Ig, acredita-se ser a causa de linfoma folicular. Duas variantes de transcritos, produzidos por splicing alternativo, diferem nas suas extremidades C-terminais. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

CCKAR: receptor A de colecistoquinina (*cholecystinin A receptor*)

Também conhecido como: CCK-A; CCK1R; CCKRA; CCK1-R. Este gene codifica um receptor acoplado à proteína G que se liga a membros não-sulfatados da família colecistoquinina (CCK), de hormônios peptídicos. Este receptor é um importante mediador fisiológico da secreção de enzimas pancreáticas e contração do músculo liso do estômago e vesícula biliar. No sistema nervoso central e periférico este receptor regula a saciedade e a libertação de beta-endorfina e dopamina. [fornecido por RefSeq,

Jul 2008]

PSPN: persefina (*persephin*)

Também conhecido como: PSP. A proteína codificada por este gene é um fator neurotrófico, pertencente à família GDNF. Os fatores neurotróficos são importantes para o bom desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso. Estes fatores promovem a sobrevivência neuronal e pode prevenir a degeneração neuronal associada com lesão, exposição a toxina, ou doenças neurodegenerativas. A proteína codificada tem semelhança de aminoácidos com os seus outros membros da família, o fator neurotrófico derivado da linha de células da glia e neurturina. Este produto de gene promove a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral em cultura e impede a sua degeneração após tratamento de 6-hidroxidopamina *in vivo*. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

GALR2: receptor da galanina 2 (*galanin receptor 2*)

Também conhecido como: GAL2-R; GALNR2; GALR-2. A galanina é um neuromodulador importante presente no cérebro, sistema gastrointestinal, e eixo hipotalamicopituitario. Contêm 30 aminoácidos em uma cadeia não-C-terminalmente péptido amidada que estimula o aumento da secreção hormonal, inibe o estímulo cardíaco vagal diminuindo o ritmo cardíaco, elimina a arritmia sinusal, e inibe a motilidade gastrointestinal pós-prandial. As acções de galanina são mediadas através da interacção com receptores específicos de membrana que são membros da família de 7-transmembrana dos receptores acoplados à proteína. GalR2 interage com a região N-terminal do péptido de galanina. O mecanismo primário para a sinalização GalR2 é através da fosfolipase C / proteína-quinase C via (via Gq), em contraste com GALR1, que comunica o seu sinal intracelular através da inibição da adenililciclase através da Gi. No entanto, foi demonstrado que GALR2 liga-se de forma eficiente em ambas proteínas, Gq e Gi, e ativam simultaneamente 2 vias independentes de transdução de sinal. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

FRS3: substrato 3 do receptor do fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor receptor substrate 3*)

Também conhecido como: SNT2; FRS2B; SNT-2; FRS2beta; FRS2-beta. Este gene codifica um substrato para o receptor do fator de crescimento de fibroblastos. A proteína codificada é encontrada na membrana plasmática periférica e liga a estimulação do receptor do fator de crescimento à ativadores do Ras. A proteína codificada hiporregula a quinase 2 de regulação extracelular por ligação direta. [fornecido por RefSeq, Jul de 2013]

<https://www.wikigenes.org> (13/07/2016)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> (13/07/2016)