

DANIELLE TAFNER CONCEIÇÃO

**EXPRESSÃO DE GENES DA IMUNIDADE EM
QUELOIDE DE LÓBULO DE ORELHA.**

SÃO PAULO

2020

DANIELLE TAFNER CONCEIÇÃO

**EXPRESSÃO DE GENES DA IMUNIDADE EM
QUELOIDE DE LÓBULO DE ORELHA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

SÃO PAULO
2020



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



Coordenação: Prof^ª. Dr^ª. Lydia Masako Ferreira

ORIENTADOR: PROF. DR. ALFREDO GRAGNANI FILHO

SÃO PAULO

2020

Tafner Conceição, Danielle

Expressão de genes da imunidade em queiloide de lóbulo de orelha/

Danielle Tafner Conceição. -- São Paulo, 2020.

xxiv,133f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: *Gene expression of immunity in earlobe keloid.*

1. Queiloide. 2. Expressão gênica. 3. Imunidade.

DEDICATÓRIA

Ao **UNIVERSO**, pela oportunidade de viver e pelas situações enfrentadas
que me fizeram ser quem sou hoje.

À minha **FAMÍLIA**, por todo aprendizado.

Aos meus **AMIGOS**, por todo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

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

Ao querido **PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO**,
PROFESSOR ASSOCIADO LIVRE-DOCENTE da Disciplina de Cirurgia
Plástica da UNIFESP/EPM, orientador desta dissertação na qual tenho
muito carinho, por toda sua dedicação, conselhos e atenção nesta minha
jornada, pela capacidade de transmitir aprendizados na qual serei
eternamente grata e por ser uma pessoa honesta, coerente e justa,
certamente um exemplo a ser seguido.

À **PROFESSORA SILVANA APARECIDA ALVES CORREA** e ao
PROFESSOR SAMUEL MARCOS CORREA DE NORONHA,
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, pelos
ensinamentos.

Ao **PROFESSOR DOUTOR BERNARDO HOCHMAN** (*in memoriam*),
desbravador do tema cicatrização alterada e quelóide, pelo suporte inicial
na discussão do projeto.

Ao **FELIPE ISOLDI** pela transmissão de conhecimento e à todos os **MÉDICOS RESIDENTES** pelos atos operatórios que tornaram possível a obtenção de amostras de queiloide para a realização do presente estudo.

Às minhas colegas de laboratório **DAYANNE MAYER, MARÍLIA BAENINGER** e **VERÔNICA CHOMISKI** pela paciência, parceria, incentivo e pela amizade construída nestes anos.

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.

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**, nota 6 da CAPES, pela indicação da bolsa de mestrado e pela oportunidade e desenvolvimento acadêmico e profissional.

À **FAPESP** na qual disponibilizou verba para realização desta pesquisa.

À todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desta pesquisa.

Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.

Francisco Cândido Xavier

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE QUADROS.....	XII
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XXI
<i>ABSTRACT</i>.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	7
3. LITERATURA.....	9
4. MÉTODO.....	24
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÃO.....	59
7. CONCLUSÃO.....	106
8. REFERÊNCIAS.....	108
FONTES CONSULTADAS.....	123
NORMAS ADOTADAS.....	125
APÊNDICE.....	128
ANEXO.....	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de calor para genes da Imunidade nas amostras de queuloide.....	42
Figura 2. Gráfico de dispersão para genes da Imunidade nas amostras de queuloide.....	43
Figura 3. Grupo de <i>Networks</i> gerados pelo programa MetaCore® a partir da lista dos genes diferencialmente expressos para Imunidade.....	45
Figura 4. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: <i>Network 1</i> (<i>ITGAM</i> , <i>alpha-M/beta-2 integrin</i> , <i>IL-8</i> , <i>ICAM1</i> , <i>NFKBIA</i>).....	46
Figura 5. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: <i>Network 2</i> (<i>PERM</i> , <i>S1P3 receptor</i> , <i>S1P1 receptor</i> , <i>Rb protein</i> , <i>G-CSF</i>).....	48
Figura 6. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: <i>Network 3</i> (<i>IL-8</i> , <i>NF-kB</i> , <i>STAT3</i> , <i>ROR-gamma</i> , <i>IL-6</i>).....	50
Figura 7. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: <i>Network 4</i> (<i>FADD</i> , <i>FasL(TNFSF6)</i> , <i>sFasL</i> , <i>FasR(CD95)</i> , <i>FasL(TNFSF6) = sFasL</i>).....	53
Figura 8. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: <i>Network 5</i>	

(CD8 *alpha*, MHC class I, 26S proteasome (19S regulator), Immunoproteasome (11S regulator), Antigen extracellular region)55

Figura 9. Análise por MetaCore®: Queloides vs Controles: *Network 06* (CD8, CD80, CD86, IL-10, IL-10 receptor).....57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Dados de média de idade e sexo dos pacientes incluídos no estudo.....	25
Quadro 2. Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo controle.....	31
Quadro 3. Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo queuloide	32
Quadro 4. Genes diferencialmente expressos no queuloide de lóbulo de orelha.....	41

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µg	Micrograma
µl	Microlitros
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
3D	3 Dimensões
15d-PGJ2	15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J2
AKR1C	Aldo-ceto reductase 1C; do inglês “ <i>aldo-keto reductase family 1 member C</i> ”
APOA1	Apolipoproteína 1
BMDC	Células dendríticas derivadas da medula óssea; do inglês “ <i>Bone marrow derived dendritic cells</i> ”
BP	Proteína de ligação; do inglês “ <i>Binding protein</i> ”
CA	Califórnia
CCL	CC Ligante de quimiocina; do inglês “ <i>C-C motif chemokine ligand</i> ”
CD	Grupamento de diferenciação; do inglês “ <i>Cluster of differentiation</i> ”
CD40L	Ligante CD40; do inglês “ <i>CD40 ligand</i> ”

CD8A	Molécula CD8A; do inglês “ <i>CD8a molecule</i> ”
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Cômite de Ética e pesquisa
COX	Ciclo-oxigenase; do inglês “ <i>Ciclo oxygenase</i> ”
Cq	Do inglês “ <i>Quantification cycle</i> ”
Ct	Do inglês; “ <i>Threshold cycle</i> ”
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo; do inglês “ <i>Connective tissue growth fator</i> ”
CXCL	Ligante de quimiocina CXC; do inglês “ <i>CXC motif chemokine ligand</i> ”
CXCR	Receptor de quimiocina CXC; do inglês “ <i>CXC motif chemokine receptor</i> ”
DCP	Disciplina de Cirurgia Plástica
DMEM	Do inglês: “ <i>Dulbelco’s Modified Eagle Medium</i> ”
DNase	Desoxirribonuclease
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
dsRNA	Fita dupla de RNA; do inglês “ <i>Double stranded RNA</i> ”
<i>et al.</i>	E outros; do latim “ <i>et alii</i> ”
EUA	Estados Unidos da América

FADD	Proteína associada ao Fas com domínio de morte; do inglês “ <i>Fas-associated protein with death domain</i> ”
FASLG	Fas ligante; do inglês “ <i>Fas ligand</i> ”
FC	Fibroblastos de cicatriz
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos; do inglês “ <i>Fibroblast growth factor</i> ”
FN	Fibroblastos normais
FOXP3	Do inglês; “ <i>Forkhead box P3</i> ”
FQI	Fibroblasto de queiloide intra-lesional
FQP	Fibroblasto de queiloide peri-lesional
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; do inglês “ <i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> ”
GO	Ontologia gênica; do inglês “ <i>Gene ontology</i> ”
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos; do inglês “ <i>Granulocyte colony stimulating factor</i> ”
HH	Cicatriz hipertrófica; do inglês “ <i>Healing hypertrophy</i> ”
HIV	Vírus da imunodeficiência humana; do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”
HLA	Antígeno leucocitário humano; do inglês “ <i>Human leukocyte antigen</i> ”

HN	Cicatriz normal; do inglês “ <i>Healing normal</i> ”
HSP	Hospital São Paulo
HU	Hospital Universitário
ICAM	Molécula de adesão celular; do inglês “ <i>Intercellular Adhesion Molecule</i> ”
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível; do inglês “ <i>Inducible nitric oxide synthase</i> ”
IL	Interleucina
ITGAM	Integrina alfa M; do inglês “ <i>Integrin alpha M</i> ”
KFB	Fibroblastos humanos provenientes de queleide; do inglês “ <i>Human fibroblasts from keloid</i> ”
KF	Fibroblastos de queleide; do inglês “ <i>Fibroblasts from keloid</i> ”
KK	Queratinócitos de queleide; do inglês “ <i>Keratinocyte from keloid</i> ”
LCT	Laboratório de cirurgia translacional
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crônica
lncRNA	Ácido ribonucleico longo não codificado; do inglês “ <i>Long non-coding RNA</i> ”

LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz extracelular
mg	microgramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade; do inglês “ <i>Major histocompatibility complex</i> ”
Mig	Monoquina induzida por interferon- γ
miRNA	Micro RNA; do inglês: “miRNA”
MPO	Mieloperoxidase; do inglês “ <i>Myeloperoxidase</i> ”
mRna	Ácido ribonucleico mensageiro
MyD88	Resposta primária de diferenciação mielóide; do inglês “ <i>Myeloid differentiation primary response 88</i> ”
n	Tamanho da casuística
NEDD4	U3-ubiquitina-proteína ligase; do inglês “ <i>E3 ubiquitin-protein ligase</i> ”
NF-kB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NK	Do inglês; “ <i>Natural killer</i> ”
p	Índice de Significância Estatística
P38-MAPK	Proteína cinase ativada por mitogênio P38; do inglês “ <i>P38 mitogen-activated protein kinases</i> ”

PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; do inglês <i>“Plasminogen activator inhibitor-1”</i>
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno; do inglês <i>“Pathogen-associated molecular pattern”</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase; do inglês: <i>“Polymerase chain reaction”</i>
PCR-SSP	Reação em cadeia da polimerase em sequência <i>primer</i> específico; do inglês <i>“Polymerase chain reaction- specific sequence primer”</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas; do inglês <i>“Platelet-derived growth factor”</i>
PGD2	Prostaglandina D2
PGF2	11beta-prostaglandina F2
PRP	Polipeptídeo citostático rico em prolina
qPCR	Polimerase Reação em Cadeia Quantitativa; do inglês <i>“Quantitative polymerase chain reaction”</i>
qRT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase após transcriptase reversa quantitativa; do inglês: <i>“Quantitative retro transcription-polymerase chain reaction”</i>
RIP	Proteínas inativadoras de ribossomos; do inglês <i>“Ribosome Inactivating Proteins”</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROR	Receptor órfão relacionado com RAR; do inglês <i>“RAR- Related orphan receptor”</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio; do inglês <i>“Reactive oxygen species”</i>
rpm	Rotação por minuto

RT-PCR	Polimerase reação em cadeia em tempo real–Transcriptase reversa; do inglês: “ <i>Polimerasechain reaction real time - Reverse transcriptase</i> ”
siRNA	Pequeno ácido ribonucleico interferente; do inglês “ <i>Small interfering RNA</i> ”
SLC11A1	Proteína 1 de macrófagos associada à resistência natural; do inglês “ <i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i> ”
SMA	Actina do musculo liso; do inglês “ <i>Smooth muscle actin</i> ”
SNP	Sistema nervoso periférico
SOD	Superóxido dismutase; do inglês “ <i>Superoxide dismutase</i> ”
Sp1	Especificidade de proteína 1; do inglês “ <i>Protein specificity</i> ”
S1P	Receptor de Esfingosina Fosfato; do inglês “ <i>Sphingosine phosphate receptor</i> ”
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição; do inglês “ <i>Signal transducer and activator of transcription</i> ”
TCD	Grupamento de diferenciação em células T; do inglês “ <i>Cluster of differentiation T cells</i> ”
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	Fator de crescimento transformante; do inglês “ <i>Transforming growth factor</i> ”
Th	Linfócitos T <i>helper</i> ; do inglês “ <i>Linfocyte T helper</i> ”
TICAM1	Interferon β indutor de adaptador de domínio TIR; do inglês “ <i>TIR domain containing adapter inducing interferon β</i> ”

TLR	Receptor do tipo <i>Toll-like</i> , do inglês “ <i>Receptor Toll-like</i> ”
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório; do inglês “ <i>Treg cell</i> ”
TV	Transcrição codificadora de proteínas; do inglês “ <i>Transcript variants</i> ”
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular; do inglês “ <i>Grow factor endothelial vascular</i> ”

RESUMO

Introdução: O queiloide é uma cicatriz patológica caracterizada pelo crescimento de tecido fibroso denso que se estende além dos limites da lesão original, sendo considerado um tumor benigno de cicatriz restrito aos humanos e sua etiopatogenia não foi aclarada devido a influência multifatorial e falta de modelo experimental animal. Essa patologia da cicatrização está associada a diversos fatores da imunidade como citocinas, fatores de crescimento e células do sistema imune. **Objetivo:** Avaliar a expressão de genes da imunidade em queiloide de lóbulo de orelha. **Métodos:** Foram coletadas doze (12) amostras de queiloide de lóbulo de orelha e doze (12) amostras de pele provenientes de mamoplastia para o 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 (*Nanovue*®). O mRNA dos pacientes de cada grupo foi usado em *pool* para a síntese de cDNA. As reações de transcrição reversa foram realizadas em triplicata usando o *RT² First Strand Kit*® *Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante e a RT-qPCR foi realizada usando o *RT² Profiler*® *PCR array* da *Superarray Bioscience*. Oitenta e quatro (84) genes relevantes para a resposta humana da imunidade foram analisados - *Human Innate & Adaptive Immune Responses* (PAHS – 052ZC). **Resultados:** Dos 84 genes da imunidade avaliados, 20 (20/84 = 24%) se apresentaram diferencialmente expressos. Dos 20 genes diferencialmente expressos, 100% apresentaram-se

hipoexpressos. Através da análise de vias canônicas pelo MetaCore®, obtiveram-se 6 vias (*networks*) entre os genes diferencialmente expressos.

Conclusão: A expressão dos genes da imunidade de queiloide de lóbulo de orelha resultou em 20 genes diferencialmente expressos (24%), todos hipoexpressos no perfil estudado, sendo os genes de maior interesse para construção de um perfil inicial da imunidade para o queiloide de lóbulo de orelha foram CXCR3, MX1, FOXP3, SLC11A1, TICAM1, TLR6, ITGAM, IL-8, IL-13, CD40LG, CD8A, IL1A, ICAM1, TLR4, IL-18, HLA-A, FASLG, NFKBIA, MPO e TLR7.

ABSTRACT

Introduction: Keloid is a cutaneous lesion characterized by the growth of dense fibrous tissue that extends beyond the limits of the original site and is considered a benign tumor restricted to humans and its etiopathogenesis has not been clarified due to the multifactorial influence and lack of experimental animal model. This altered wound healing is associated with various immunity factors such as cytokines, growth factors, and immune system cells. **Objective:** To evaluate the gene expression of immunity in earlobe keloid. **Methods:** Twelve (12) earlobe keloid samples and twelve (12) skin samples from mammoplasty were collected for the control group. Total RNA was purified with Qiagen RNeasy Minikit™ DNase and the amount and quality of extracted RNA were evaluated by spectrophotometry (Nanovue™). Patients' mRNA from each group was pooled for cDNA synthesis. Reverse transcription reactions were performed in triplicate using the RT2 First Strand Kit™ Superarray Bioscience according to the manufacturer's protocol and RT-qPCR was performed using the RT2 Profiler™ PCR array from Superarray Bioscience. 84 genes relevant to the human immunity response were analyzed - Human Innate & Adaptive Immune Responses (PAHS - 052ZC). **Results:** Of the 84 immunity genes, 20 ($20/84 = 24\%$) were differentially expressed. Of the 20 differentially expressed genes, 100% were hypoexpressed. Through the analysis of canonical pathways by Metacore™, we obtained 6 networks between differentially expressed genes. **Conclusion:** The expression of the earlobe keloid immunity genes resulted in 20 differentially expressed genes, all

hypoexpressed, the genes of interest being for earlobe keloid CXCR3, MX1, FOXP3, SLC11A1, TICAM1, TLR6, ITGAM, IL-8, IL -13, CD40LG, CD8A, IL1A, ICAM1, TLR4, IL-18, HLA-A, FASLG, NFKBIA, MPO and TLR7.

1. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O quelóide é um crescimento fibroproliferativo dérmico que ultrapassa os limites iniciais de sua origem, sendo considerado uma lesão tumoral benigna que não tem uma causa conhecida e é restrito aos humanos, sendo de difícil estudo por falta de modelo experimental animal (LIANG *et al.*, 2004; HARUNARI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2014). Também é considerado uma lesão cutânea proveniente do resultado de uma resposta excessiva a um dano, como procedimentos cirúrgicos, queimaduras, traumas, condições inflamatórias e infecciosas dérmicas (HOCHMAN *et al.*, 2015; HULTMAN & YOSHIDA, 2017; GOLDSTEIN & GOLDSTEIN, 2018).

O desenvolvimento do quelóide afeta homens e mulheres sendo mais comum em indivíduos jovens. Existe uma tendência familiar de desenvolvimento, estudos familiares sugerem uma herança autossômica dominante com penetrância incompleta (BROWN & BAYAT, 2009). Contudo, foram relatados em 5 a 16% dos indivíduos de ascendência hispânica e africana (ROBLES & BERG, 2007). Também, foi identificado que quanto maior o fototipo de pele conforme a classificação de Fitzpatrick, maior a tendência em desenvolver quelóide (HOCHMAN *et al.*, 2012).

Clinicamente, é caracterizado por um crescimento de tecido fibroso denso que se estende além dos limites da área lesada originalmente. São salientes, firmes, frequentemente apresentam prurido e dor, e não costumam regredir espontaneamente diferente da cicatriz hipertrófica, que normalmente é avermelhada, confinada às bordas originais da cicatriz e

tende a regredir com o tempo. A fisiopatologia do quelóide ainda não é totalmente entendida, sendo sugerido ser uma doença de origem multifatorial e o seu tratamento pouco efetivo, pois geralmente está associado a alta taxa de recorrência após o tratamento, apesar da disponibilidade de alguns tipos de tratamentos como o cirúrgico, a infiltração intralesional de corticosteroide, gel de silicone, terapia por pressão, radioterapia, sendo mais comumente usado associação de tratamentos (CHIKE-OBI, COLE, BRISSET, 2009; GOLDSTEIN & GOLDSTEIN, 2018).

Após uma injúria que ultrapassa a membrana basal, inicia-se um processo de reparo imediato que resultará na formação de uma cicatriz no local. Quando há algum distúrbio no balanço do processo de reparação, a cicatrização pode ser afetada resultando na formação de uma cicatriz patológica. Esse processo está associado a diversos fatores relacionados à imunidade, como citocinas, fatores de crescimento, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Comparado às cicatrizes fisiológicas, há números relativamente maiores de citocinas que estimulam fibroblastos na qual respondem depositando matriz extracelular, podendo manifestar-se cicatrizando de forma anormal (POTTER *et al.*, 2019). Existem várias teorias ou hipóteses para tentar explicar a fisiopatogenia do quelóide, sendo que a resposta imune anormal às injúrias dérmicas é mais uma dessas hipóteses (BRAN *et al.*, 2009). Com isso, existe a hipótese de que a patogênese envolva resposta imunológica anormal às injúrias dérmicas, produzindo esta cicatrização patológica (BRAN *et al.*, 2009; LOVE & KUNDU, 2013).

Na patogênese do quelóide, encontra-se principalmente o colágeno tipo I e III, contendo feixes de colágeno hipocelular com coloração pálida, sem nódulos ou excesso de miofibroblastos (GAUGLITZ, 2017) e ativação de fibroblastos dérmicos (CANADY *et al.*, 2013a). Apresentam uma produção aumentada de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interferon beta (IFN- β) e Interleucina 6 (IL-6). O Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- β) é crucial na regulação do processo de cicatrização, pois é conhecido por estimular a síntese de colágeno. A expressão de TGF- β 1 e TGF- β 2 leva a cicatrização aumentada, enquanto TGF- β 3 a reduz (CAMPANER *et al.*, 2006; LOVE & KUNDU, 2013; GRAGNANI *et al.*, 2013; GRAGNANI *et al.*, 2014; GOLDSTEIN & GOLDSTEIN, 2018).

O TNF- α está envolvido no processo inflamatório. Em fluidos corporais durante as primeiras vinte horas após o trauma, pode-se detectar a presença de TNF- α inicialmente produzido por macrófagos em locais nos quais induzem o recrutamento e a maturação de neutrófilos. O TNF- α também é responsável por inibir a reepitelização de feridas, sendo importante durante o processo de cicatrização (GRAGNANI *et al.*, 2013).

Linfócitos e macrófagos têm contribuição na formação de quelóide. No estudo de BOYCE *et al.* (2001) foi encontrado maior população de linfócitos e macrófagos na derme de quelóide em comparação à pele além de maior fração de Grupamento de Diferenciação em Células T (TCD4) e TCD8. Isso sugeriu que um desequilíbrio dessas subpopulações de células inflamatórias poderia contribuir para sua formação. Macrófagos apresentam diferentes funções imunológicas na pele, incluindo fagocitose e apresentação de antígenos, mas também produzem diversas citocinas e

quimiocinas estimuladoras da síntese de colágeno e fibrose (MAHDAVIAN *et al.*, 2011). O papel das células T no desenvolvimento do queloide foi estudado por CHEN *et al.* (2018a), onde constatou-se acúmulo significativo dessas células pertencentes ao sistema imunológico no tecido queloidiano.

WULFF & WILGUS (2013) verificaram que há presença de número elevado de mastócitos presentes no tecido queloidiano, além de influenciarem na atividade dos fibroblastos e regulam a resposta inflamatória aguda estando envolvidos diretamente em reações de hipersensibilidade e que, quando ativados, produzem citocinas e fatores de crescimento importantes como exemplo IL-4, IL-10, TGF- β , Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 (FGF-2), que atuam como estimulantes celulares além de recrutarem variados tipos celulares e interferirem na proliferação celular.

O sistema da citocina pró-inflamatória IL-18 aparenta exercer papel importante na patogênese de queloide através de interações epitélio-mesenquimais. Ela age como importante regulador das respostas imunes inata e adquirida e tem grande papel na fibrogênese, carcinogênese e cicatrização de feridas (DO *et al.*, 2012). Também, as concentrações séricas de imunoglobulina G (IgG), IgA e IgM mostraram-se aumentadas em pacientes que desenvolveram queloides (BRAN *et al.*, 2009).

Dadas as correlações entre o sistema imunológico e a formação do queloide, é importante estudar o perfil de genes relacionados à resposta imune inata e adquirida de pacientes com queloide em áreas específicas, sem tratamento e não apresentando atividade clínica, ou seja, sem prurido,

dor ou hiperemia. O estudo da expressão gênica pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *array* foi proposto para construir um perfil inicial de genes diferencialmente expressos no grupo de pacientes portadores desse tipo específico de quelóide, em lóbulo de orelha.

2. OBJETIVO

OBJETIVO

Avaliar a expressão de genes da imunidade em queiloide de lóbulo de orelha.

3. LITERATURA

LITERATURA

NIESSEN *et al.* (2001) analisaram o perfil imunológico da derme e epiderme de cicatrizes normais e hipertróficas. Foi investigada a presença de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PDGF, TGF- β 1 e β FGF em biópsias retiradas de cicatrizes de mamoplastia redutora após 3 e 12 meses da cirurgia. As amostras foram analisadas por métodos imunohistoquímicos e as cicatrizes foram categorizadas em hipertróficas (HH), tornaram-se normais (HN) ou que permaneceram normais após 12 meses (NN). Em cicatrizes NN, a expressão epidérmica de IL-1 α foi significativamente maior quando comparada às cicatrizes HN e HH nos dois períodos de análise, enquanto a expressão dérmica não mostrou diferença. A expressão do PDGF foi maior na derme de cicatrizes normais após 3 meses e, em cicatrizes hipertróficas, na derme e epiderme após 12 meses. IL-1 β , TNF- α , TGF- β e β FGF não mostraram diferenças. Os autores levantaram a hipótese de que a falta de IL-1 α poderia reduzir o catabolismo da matriz dérmica, enquanto que o aumento da produção de PDGF epidérmica poderia estimular maior formação de matriz dérmica em cicatrizes hipertróficas. Essas observações sustentam a possibilidade de que a epiderme estar envolvida na prevenção da formação de cicatrizes hipertróficas.

HOCHMAN *et al.* (2005) utilizaram o modelo experimental do *Mesocricetus auratus* (*hamster*) para enxertia de amostra de quelóide. Para este procedimento foram utilizados fragmentos de quelóide de uma

paciente não branca de 27 anos. As cobaias foram separadas em seis grupos (A, B, C, D, E e F), com três animais cada, e os enxertos foram colocados entre as camadas epiteliais nas bolsas das bochechas. 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. Em análise histológica posterior, foram encontrados melanócitos e formações císticas com secreção de queratina no epitélio das cobaias dos grupos acima de 30 dias (D, E e F). Os autores sugerem possível participação do Sistema Nervoso Periférico (SNP) na formação da cicatriz devido à presença de melanócitos.

CAMPANER *et al.* (2006) constataram que TGF- β 1 está relacionado com cicatrizes hipertróficas e queloides, afirmando que a hiperexpressão do TGF- β 1 é necessária mas não suficiente para manter a formação excessiva de cicatrizes. Os autores implantaram fibroblastos modificados geneticamente que hiperexpressavam TGF- β 1 na derme de camundongos atímicos, comparando com o grupo controle, para caracterizar seu papel. Relataram que os fibroblastos geneticamente modificados secretaram cerca de 20 vezes mais TGF- β 1, quando comparado ao controle, embora apenas as células mutantes secretaram na forma ativa. Ainda, relataram maior taxa de proliferação celular, maior expressão da alfa-actina das células do músculo liso e maior capacidade de contração das redes de colágeno. Notaram a formação de nódulo semelhante a queleide no local do implante das células modificadas, que foi persistente, contendo colágeno, em ratos

atímicos. Concluíram que a hiperexpressão de TGF- β 1 por fibroblastos pode ser necessária, mas não é suficiente para a cicatrização hipertrófica, pois são necessárias outras sinalizações ou outras citocinas adicionais para ativar TGF- β 1 e prolongar a persistência celular.

ROBLES & BERG (2007) discutiram as características clínicas, genéticas, epidemiologia e tratamentos para quelóide. A revisão descreve que a patogênese de sua formação é pouco conhecida, mas que geralmente aparecem após uma lesão ou inflamação da pele em indivíduos predispostos. Fibroblastos derivados de quelóide podem expressar níveis mais elevados de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- β 1/ β 2 e PDGF. Constatou-se que fibroblastos de quelóide cultivados têm uma produção aumentada de matriz e metaloproteinases de quando em comparação com fibroblastos dérmicos normais. Dados epidemiológicos sobre cicatriz hipertrófica e de quelóide são limitados, mas sugerem diferenças importantes entre raças com taxas mais altas em negros, hispânicos e asiáticos. No geral, o risco de desenvolvimento é aproximadamente 15 vezes maior em indivíduos de pele não branca em comparação aos de pele branca. A incidência em afrodescendentes e hispânicos varia de 4,5% a 16%, com maiores incidências durante a puberdade e a gravidez. Um ligeiro predomínio feminino é observado, mas isso sugere refletir o aumento na perfuração do lóbulo da orelha entre este grupo. Referente à genética, ainda não existem *loci* claramente definidos que confirmam riscos para quelóide. Duas síndromes raras foram associadas à formação de quelóides, a Síndrome Rubinstein-Taybi e Síndrome de Goeminne. Numerosas terapias para quelóide foram descritas com vários graus de apoio clínico e científico para a sua eficácia. Os

tratamentos mais comumente usados com possivelmente mais evidência de eficácia incluem esteroides. Outras modalidades têm sido mencionadas como possíveis tratamentos que incluem terapia com pressão, excisão cirúrgica, crioterapia, remoção a laser, radioterapia e uso de gel de silicone.

MCCARTY, SYED, BAYAT (2010) fizeram uma revisão sistemática para investigar a evidência de associações positivas ou negativas do sistema de Antígeno Leucocitário Humano (HLA) com vários tipos de fibrose cutânea, com foco em quelóide, cicatriz hipertrófica e esclerodermia. Os autores relataram que existe uma clara associação entre os alelos HLA específicos e a predileção ou a proteção à fibrose cutânea. Destes alelos HLA candidatos, os *loci* de classe II parecem ser os mais promissores em termos de biomarcador genético, com os alelos DQ e DR com associações significativas com cicatrização anormal de feridas e fibrose cutânea. No entanto, os mecanismos precisam ainda de melhor esclarecimento, uma vez que a patogênese da fibrose cutânea e da cicatrização anormal da ferida não são totalmente compreendidas.

HOCHMAN *et al.* (2012) estudaram a frequência de queloides e cicatrizes fibroproliferativas em 146 pacientes provenientes do Ambulatório da Disciplina de Cirurgia Plástica (DCP) da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM, São Paulo, SP, Brasil), portadores de qualquer tipo de cicatriz fibroproliferativa,

em um ou mais locais do corpo. Os tipos de pele foram classificados segundo os fototipos de Fitzpatrick e as cicatrizes fibroproliferativas foram classificadas de acordo com os critérios de Muir sendo do tipo queloide, cicatriz hipertrofica e cicatriz mista. O fototipo Fitzpatrick III e a cicatriz mista foram as mais frequentes entre os pacientes avaliados. Houve associação entre as cicatrizes fibroproliferativas e os fototipos da classificação de Fitzpatrick, ou seja, quanto maior o fototipo na escala, maior a tendência de desenvolvimento de cicatrizes dos tipos queloide e mista.

ASHCROFT, SYED, BAYAT (2013) investigaram a influência parácrina de meios de cultura condicionados com fibroblastos de queloide peri-lesional (FQP) e fibroblastos de queloide intra-lesional (FQI) sobre o comportamento celular e molecular de fibroblastos de pele normal (FN) e fibroblastos de cicatriz (FC) ao longo de 240 horas. As taxas de proliferação e de migração celular foram monitorados em tempo real. A expressão de um gene marcador de fibrose, bem como de sua síntese proteica, foi analisado. Tanto FN como de FC em meio condicionado com FQP e com FQI tiveram maiores taxas de proliferação, de migração e de viabilidade celular em relação ao grupo controle. Houve aumento de colágeno I, fibronectina, alfa-actina do músculo liso (α -SMA), inibidor do ativador de plasminogênio do tipo 1 (PAI-1), TGF- β e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), confirmados por análise de

qRT-PCR. O meio condicionado com FQP provocou maiores efeitos, se comparados ao meio condicionado com FQI.

ABDOU, MARAEE, SAIF (2014) avaliaram o padrão e a localização da expressão de ciclo-oxigenase (COX-1) e COX-2 em queuloide e cicatriz hipertrófica em comparação com cicatrizes cirúrgicas. COX-1 e COX-2 foram analisados em biópsias cutâneas de 15 pacientes com queuloide, 15 com cicatriz hipertrofica e 10 com cicatrizes cirúrgicas normais para o grupo controle. Tanto a COX-1 quanto a COX-2 foram expressas em fibroblastos, em células inflamatórias, em células endoteliais, bem como em queratinócitos epidérmicos nas diferentes cicatrizes estudadas. A expressão de COX-1 foi de 40% na cicatriz cirúrgica, 53,5% na cicatriz hipertrófica e 100% em queuloide. A COX-2 foi expressa em 100% de cicatrizes cirúrgicas, 73,3% de cicatriz hipertrófica e 86,7% de queuloide. A diferença significativa na expressão de COX-1 entre cicatriz hipertrófica e queuloide pode se referir à presença de diferentes patogenias entre elas. A expressão de COX-2 em todas as cicatrizes indica seu papel ativo como meio inflamatório.

DOUAIHER *et al.* (2014) realizaram uma revisão da literatura sobre o desenvolvimento dos mastócitos em ratos e em humanos, bem como o envolvimento de seus grânulos de serina proteases na inflamação e na remodelação do tecido conjuntivo, que ocorre durante as diferentes fases do

processo de cicatrização da pele ferida e outros órgãos. Os dados sugerem que os mastócitos e suas proteases desempenham papéis importantes no reparo tecidual. Inicialmente, os mastócitos estão relacionados à cura, mas podem ser prejudiciais se forem estimulados cronicamente ou se muitos mastócitos ativarem-se ao mesmo tempo. Concluíram que existe a possibilidade de mastócitos e suas proteasas contribuírem para a formação de cicatriz hipertrófica e de quelóide, tornando-os alvos potenciais para intervenção terapêutica no reparo da pele danificada.

ARBI *et al.* (2015) avaliaram a ultraestrutura da derme de pacientes com quelóide por técnicas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os pesquisadores observaram a formação anormal de fibras colágenas prematuras intracelulares. A fagocitose de fibrilas de colágeno pelos mastócitos foi uma característica ultra estrutural comum do tecido do quelóide, assim como uma associação direta ou próxima entre fibroblastos e mastócitos. Com base nesses achados e recentes avanços no conhecimento relacionados à síntese de colágeno, formação e processamento de fibrilas, a hipótese defendida é que a formação de quelóide é principalmente devido à síntese anormal de colágeno, onde o acúmulo de fibras de colágeno provoca aumento do recrutamento de mastócitos e fagocitose de colágeno. A liberação de mediadores derivados de mastócitos promove então a síntese de colágeno. A observação da formação precoce no tecido do quelóide das fibrilas de colágeno insolúveis

prematuros apoia estudos prévios de que enzimas como a procolágeno C proteinase são importantes alvos terapêuticos precoces.

HOCHMAN *et al.* (2015) selecionaram 100 pacientes com queiloide de orelha sendo 82% localizados no lóbulo de orelha e 18% na projeção da cartilagem auricular enquanto 18% das lesões ocorreram em superfícies posterior e anterior da orelha. Verificou-se que os queiloides ocorreram em 1 ano após a lesão em 41% dos pacientes; depois de 6 meses em 31% e depois de menos de 6 meses em 28%. Dos pacientes que tinham brincos ou *piercing* de joalheria com fechos, 65% não tiveram infecção durante a formação do queiloide enquanto 35% dos pacientes relataram infecção. Os resultados revelaram que a lesão epitelial causada pelo brinco ou *piercing* de orelha produz uma corrente endógena de lesão na ferida local. Essa corrente gera um campo elétrico que contribui à migração direcional das células, a eletrotaxia, em resposta de cura. Fechos metálicos podem induzir um aumento da amplitude da corrente da lesão alterando a energia elétrica endógena do campo, consequentemente possibilita o desenvolvimento do queiloide.

MANTEL *et al.* (2016) investigaram o possível papel da prostaglandina D2 (PGD2) e de seus metabólitos, Aldo-ceto redutase 1C3 (AKR1C3) e 9α , 11beta-prostaglandina F2 (11β -PGF2), utilizando

fibroblastos de queiloide (CRL1762) e imuno-histoquímica. Os dados sugeriram um aumento de, aproximadamente, 3 vezes a contagem de mastócitos triptase-positivos em fibroblastos de queiloide se comparados ao grupo controle, fibroblastos de pele sadia. Seu metabólito AKR1C3 mostrou-se hiperexpresso na área fibrótica de queiloide, enquanto a coloração do grupo controle mostrou-se fraca. Já a concentração do metabólito 9α , 11β -PGF₂ nos fibroblastos de queiloide e sadios, dependia da concentração do metabólito AKR1C3, uma vez que esta reação foi atenuada na presença do inibidor de AKR1C3, 2'-hidroxiflavanona ou em células com expressão de AKR1C3 diminuída. A 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J₂ (15d-PGJ₂) inibiu a proliferação de fibroblastos de queiloide, reduzindo a concentração do gel de colágeno, e aumentou a ativação da caspase-3. Além disso, 15d-PGJ₂ induziu a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e do antioxidante Superóxido dismutase 1 (SOD1). Finalmente, a inibição da proteína cinase ativada por mitogênio P38 (P38-MAPK), que está envolvida na diferenciação celular, apoptose e autofagia, aumentou ainda mais a clivagem de caspase-3 induzida por 15d-PGJ₂ e atenuou seu efeito na transcrição de SOD1. Dessa forma, os autores concluíram que a inibição dupla de AKR1C3 e P38-MAPK pode resultar em inibição da progressão queiloide. A inibição da atividade de AKR1C3 pode gerar ambiente oxidativo devido ao metabolismo de PGD₂ em direção a 15d-PGJ₂, enquanto a inibição de P38-MAPK irá sensibilizar as células do queiloide para a apoptose, induzida por ROS.

LUO *et al.* (2017) estudaram o hormônio adiponectina derivado de adipócitos que exerce diversos efeitos no organismo como inflamação, homeostase vascular, apoptose e imunológicos. Foram explorados os efeitos da adiponectina sobre a proliferação celular induzida por fator de crescimento do tecido conjuntivo, a migração e a deposição de matriz extracelular e suas vias de sinalização intracelular associadas em fibroblastos de queloides. O efeito da adiponectina foi testado sobre a proliferação celular induzida por migração e a deposição de matriz extracelular (MEC) e suas vias de sinalização intracelular associadas em fibroblastos de queloides. Foram isolados fibroblastos a partir de biópsias do prepúcio e de biópsias de pacientes com queloides. A expressão dos receptores de adiponectina foi avaliada por RT-PCR, qRT-PCR, imunofluorescência e análise imunohistoquímica. Em seguida, fibroblastos derivados de queleide e fibroblastos dérmicos normais foram tratados com o fator de crescimento de tecido conjuntivo na presença ou ausência de adiponectina. Com base nos resultados apresentados, a adiponectina suprimiu a proliferação de fibroblastos provenientes de queloides induzida pelo fator de crescimento de tecido conjuntivo, migração e superprodução de MEC. Portanto, a adiponectina demonstrou-se importante na progressão dos queloides, sugerindo um potencial novo alvo para o tratamento de queloides.

ZHANG *et al.* (2018) selecionaram 6 amostras de quelóide obtidas de diferentes partes anatômicas e compararam com 12 amostras de pele retiradas de locais com média tensão e baixa tensão para analisar o nível transcricional de genes mecanorreceptores conhecidos e fizeram o sequenciamento Sanger para identificar potenciais mutações no gene CXC receptor de quimiocina 1 (CXCR1) e foi identificada a expressão de uma mutação *missense* c.574G> A (p.Gly192Glu), com confirmação da coloração imuno-histoquímica que mostrou elevada expressão do nível da proteína no quelóide em comparação com o grupo controle.

CHEN *et al.* (2018b) investigaram o papel do Pequeno Ácido Ribonucleico Interferente (siRNA) de β -catenina na proliferação e apoptose de fibroblastos quelóide através de um estudo realizado com 12 pacientes utilizando RT-PCR e *Western Blot* para monitorar o Ácido Ribonucleico Mensageiro (mRNA) e níveis de expressão proteica de β -catenina em tecido cicatricial e tecido normal adjacente. Fibroblastos humanos provenientes de quelóide foram isolados do tecido por digestão enzimática e identificados por imuno-histoquímica onde foi confirmado que a β -catenina foi anormalmente expressa em tecido de quelóide, e que silenciando sua expressão em fibroblastos temos a inibição significativa a proliferação celular e apoptose confirmando que são propícias para melhorar o entendimento sobre a patogênese do quelóide.

SONG *et al.* (2019) investigaram o mRNA e a expressão de 9 subunidades de integrinas: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\alpha 8$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, $\beta 1$ e $\beta 3$ em células-tronco mesenquimais derivadas de queiloide comparado com células-tronco mesenquimais humanas normais derivadas da pele e ambos tipos celulares foram estimulados com tensão. Constatou-se que a tensão aumenta a proliferação celular e síntese de colágeno e promove expressão das integrinas αv e $\beta 3$ nas células-tronco mesenquimais derivadas de queiloide. Este processo de tensão, é um estímulo mecânico transformado em sinais bioquímicos e participação em respostas celulares que contribui para a ocorrência e desenvolvimento de queiloide.

FUJITA *et al.* (2019) examinaram 20 amostras de queiloide com fenótipo de risco C rs8032158 devido a um polimorfismo em nucleotídeo único e expressar um nível mais alto de U-3 ubiquitina proteína ligase (NEDD4) com transcrição codificadora de proteínas 3 (TV3) e compararam com amostras de pele obtidas de diferentes locais anatômicos. O gene NEDD4 expresso em células, que tem seis variantes transcritas de codificação de proteínas, está geneticamente associado ao queiloide. Foi constatado que a inflamação é fortemente ativada nos queratinócitos e fibroblastos no tecido do queiloide de uma maneira dependente do NEDD4 TV3 que interagiu fortemente com as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) para ativar o Fator Nuclear Kappa B (NF-kB). Estes dados lançam luz em uma função NEDD4 relacionada à inflamação crônica e sugerem

que o NEDD4 TV3 poderia ser um diagnóstico potencial marcador e alvo terapêutico para cicatrizes de pacientes portadores de queloides. Na pele do queloide, 42,0% dos queratinócitos e 25,2% dos fibroblastos foram positivos para a fosforilação dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (*phospo*-STAT3) nuclear. Na pele os percentuais foram de apenas 3,8% e 5,3%. Após estimulação com IL-17 e IL-6 ou com TNF- α e IL-6, os queratinócitos primários e fibroblastos de amostras de pele do queloide mostraram expressão do mRNA de vários genes alvo de NF-kB, tais como o ligante de quimiocina 2 (CCL2) e IL-6 e ativação mais forte da inflamação em comparação com células normais da pele. O gene NEDD4 consiste de 30 éxons que produzem seis variantes transcritas de codificação de proteínas 1-5 e 7 (TV 1-5 e TV 7). No entanto, ambos os ensaios mostraram que o NEDD4 TV3 foi significativamente mais abundante na pele do queloide em comparação com a pele.

NOISHIKI, HAYASAKA, OGAWA (2019), realizaram um estudo no Japão para a coleta de dados epidemiológicos referente à formação do queloide e através de uma análise de 1659 pacientes, concluíram que os pacientes do sexo feminino tem 2,7:1 chances de desenvolvimento de queloide antes dos 15 anos demonstrando que há uma maior suscetibilidade fisiológica de formação de queloide, porém deve-se considerar que o uso de brincos/*piercing* na orelha mostra-se mais frequente em pacientes do sexo feminino favorecendo o desenvolvimento do queloide (HOCHMAN *et al.*, 2015; KHAN *et al.*, 2019).

GONZÁLES & GOLDBERG 2019, referiram numa revisão sistemática sobre o tema, que existem vários tratamentos para diferentes tipos de cicatrizes fibroproliferativas, entre elas a do queloide, embora sejam necessários mais estudos para validação do melhor método.

4. MÉTODO

MÉTODO

4.1 Delineamento de pesquisa

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa primário, analítico, observacional, experimental, *in vitro*, transversal, controlado e realizado em centro único. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP/EPM e aprovado sob número 1.681.967 (Apêndice 1).

Foram incluídos doze (12) pacientes com queiloide em lóbulo de orelha e doze (12) pacientes no grupo controle que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os pacientes do grupo queiloide, foram atendidos no setor de Cicatrizes Patológicas da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, localizado na Rua Borges Lagoa, 806 – Vila Clementino – São Paulo/SP e submetidos ao ato operatório na Casa da Cirurgia Plástica, sendo apresentado a média de idade e sexo de cada grupo no Quadro 1.

Os pacientes do grupo controle foram atendidos no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP). Esses pacientes sem antecedentes pessoais de queiloide e com indicação de procedimento operatório de mamoplastia, doaram a pele que normalmente seria descartada durante o procedimento padrão e foram usadas no presente estudo.

Quadro 1. Dados de média de idade e sexo dos pacientes incluídos no estudo

Grupos/Dados	n	Média de Idade	Sexo
Grupo Controle	12	36,75 anos	12 F
Grupo Queiloide	12	25,5 anos	5M 7F

n=número; F=feminino; M=masculino

A fase laboratorial, foi realizada no Laboratório de Cirurgia Translacional (LCT) da DCP, localizado no Edifício Acadêmico Prof. Dr. Horácio Knesse de Mello, na Rua Pedro de Toledo, 871 – 4º andar (Fundos) - Vila Clementino - São Paulo/SP. Esta fase compreendeu a extração de RNA (Ácido ribonucleico), PCR *array*, MetaCore® e análise dos dados.

Por se tratar de um estudo experimental *in vitro*, posto que a partir de um fragmento de tecido homogeneizado, foi extraído RNA das células do tecido, e essa informação gênica que é comum a todas as células que sofreram o estímulo da doença em estudo, no caso o queiloide, no qual não existem outras variáveis envolvidas além da carga genética celular das células do tecido queiloidiano, o número de amostras utilizadas na pesquisa foi definido em 12, coletados de doadores de tecidos, tanto no grupo queiloide como no grupo controle.

4.2 Critérios de Inclusão

Foram inclusos pacientes encaminhados a Casa da Cirurgia Plástica UNIFESP/EPM, de ambos os sexos; com queiloide no lóbulo de orelha sem ter realizado qualquer tipo de tratamento nos últimos 6 meses antes da doação do fragmento para o estudo; sem atividade de crescimento marginal do queiloide e que apresentavam interesse na retirada do queiloide e o cirurgião indicou o procedimento cirúrgico por se tratar de lesão pedunculada; com idade entre 18 e 45 anos; que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE.

4.3 Critérios de Não Inclusão

Não foram inclusos os pacientes que não concordaram em participar da pesquisa; que apresentavam doenças prévias de pele (inflamatória, infecciosa, autoimune) ou doenças clínicas que interferem diretamente no processo de cicatrização tais como diabetes e hipertensão arterial.

4.4 Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão foram consideradas quantidade insuficiente de RNA extraído das amostras que impossibilitassem a avaliação dos dados do paciente (<1µg) e/ou perda do material extraído. Quando excluído algum paciente durante o estudo, o mesmo deveria ser repostado por outro com os mesmos critérios de inclusão, mantendo o n inicial do estudo de 12 pacientes com quelóide, porém não ocorreram situações de exclusão de amostras no presente estudo.

4.5 Grupo Controle

Para o grupo controle temos como critérios de inclusão pacientes do sexo feminino pelo fato de que a cirurgia para obtenção da pele descartada ser mamoplastia; idade entre 18 e 45 anos que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE; que não apresentavam doenças prévias (inflamatória, infecciosa, autoimune).

4.6 Procedimento Operatório

O paciente doador do fragmento de pele do grupo queloide foi submetido a cirurgia no ambulatório com procedimento padrão, e o doador de pele do grupo controle foi submetido ao procedimento no centro cirúrgico do HSP com todo procedimento padrão seguido pela equipe do setor de Mamoplastia da DCP.

Embora clinicamente a história, o aspecto macroscópico, a característica e o tempo de crescimento da lesão já identifiquem um queloide, um terço da amostra de tecido do queloide removido foi separada após o procedimento operatório ambulatorial pelo cirurgião e encaminhado ao Departamento de Anatomia Patológica para confirmação do diagnóstico.

4.7 Obtenção das amostras de tecidos

Os pacientes foram operados na Casa da Cirurgia Plástica pela equipe médica do Ambulatório do Setor de Cicatrizes Patológicas, sob anestesia local utilizando-se lidocaína 2% com adrenalina em solução de concentração de 1/200.000. O queloide foi excisado no plano do tecido subcutâneo, por incisão fusiforme justalesional, com bisturi de lâmina nº15, incluindo nas extremidades um fragmento de pele, correspondente à retirada do excedente cutâneo necessário para uma adequada coaptação da sutura nas extremidades.

4.8 Extração de RNA das amostras

Os fragmentos de queloide obtidos foram enviados ao laboratório

imediatamente após a sua retirada, devidamente acondicionados em frasco seco estéril, e colocados em uma caixa de isopor resfriada. Foram divididos pelo cirurgião em duas partes, sendo uma delas armazenada em *freezer* com temperatura -80°C para conservação do material e outra parte foi armazenada e utilizada posteriormente em conjunto com as restantes amostras para a extração do RNA e posteriormente a realização do PCR *array*. O manuseio dessas amostras foi realizado com o uso de luvas para evitar o contato da amostra com nucleases liberadas pelas mãos dos pesquisadores ou qualquer outro tipo de contaminação além da realização de assepsia da bancada para minimizar qualquer possibilidade de contaminação já que a molécula de RNA é instável e de fácil degradação.

Quantidades da amostra, entre 50mg e 100mg, foram adicionadas a uma solução tampão de digestão, na proporção de 1,2ml de tampão para cada 100 mg de tecido, e colocadas em banho-maria em temperatura próxima a 50°C , para que viabilizasse a digestão. O tempo de incubação foi de 12 horas, ou até que a amostra apresentasse aspecto viscoso na qual indicava digestão da mesma.

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%.

4.9 Purificação do RNA total

As amostras de RNA dos indivíduos do grupo controle e do grupo

queleide foram purificadas utilizando o *RNeasy Mini Kit*® (*Qiagen Company*) conforme o protocolo do fabricante.

4.10 Quantificação do RNA total

A quantificação e pureza do RNA foram avaliadas através de espectrofotometria no aparelho *NanoVue*® *Plus GE* (*Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA*). A absorvância das amostras foi medida nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, sendo que a Densidade Óptica (DO) 260=1 corresponde a 40ng/μl de concentração (Quadros 2 e 3). Foi considerado RNA de qualidade satisfatória quando a razão DO260/DO280 manteve-se entre 1,8 a 2,0.

Quadro 2. Concentração da solução de RNA proveniente de fragmento da pele de paciente do Grupo Controle obtida por meio de espectrofotometria após purificação das amostras e razão de densidade óptica, DO260/DO280 das amostras (n=12).

Amostra	Conc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Razão (260/280)
Paciente 1 Grupo Controle	62,6	1,9
Paciente 2 Grupo Controle	145,6	1,9
Paciente 3 Grupo Controle	181,2	1,8
Paciente 4 Grupo Controle	112,8	1,9
Paciente 5 Grupo Controle	198	1,9
Paciente 6 Grupo Controle	162,4	1,9
Paciente 7 Grupo Controle	126	1,8
Paciente 8 Grupo Controle	64	1,9
Paciente 9 Grupo Controle	128,4	1,9
Paciente 10 Grupo Controle	198,8	1,9
Paciente 11 Grupo Controle	86,4	1,9
Paciente 12 Grupo Controle	76,4	1,9

Conc = Concentração; $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ micrograma/microlitro

Quadro 3. Concentração da solução de RNA proveniente de fragmento da pele de paciente do Grupo Queloide de lóbulo de orelha obtida por meio de espectrofotometria após purificação das amostras e razão de densidade óptica, DO260/DO280 das amostras (n=12).

Amostra	Conc ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Razão (260/280)
Paciente 1 Grupo Queloide	247,6	2
Paciente 2 Grupo Queloide	68,4	2
Paciente 3 Grupo Queloide	56	2
Paciente 4 Grupo Queloide	34	2
Paciente 5 Grupo Queloide	68	2
Paciente 6 Grupo Queloide	73,2	2
Paciente 7 Grupo Queloide	432	2
Paciente 8 Grupo Queloide	566,8	2
Paciente 9 Grupo Queloide	112,8	2
Paciente 10 Grupo Queloide	208,4	2
Paciente 11 Grupo Queloide	417,2	2
Paciente 12 Grupo Queloide	77,6	2

Conc = Concentração; $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ micrograma/microlitro

4.11 RT-PCR *Array* quantitativo

Para o estudo, 84 genes humanos relevantes envolvidos na resposta humana da imunidade inata e adaptativa foram analisados - *Human Innate & Adaptive Immune Responses* (PAHS – 052ZC), sendo comercializada como uma placa pré definida pela empresa com os genes mais relevantes que aparecem em diversas doenças. A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas foram realizadas no *ABI Prism 7500 Sequence Detection System*® (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) utilizando a metodologia

Taqman® fluorescente (*TaqMan One Step RT-PCR Master Mix Reagentes, Biosystems*).

O equipamento para a Polimerase Reação em Cadeia Quantitativa (qPCR) *Array* possui um sistema óptico para destacar a fluorescência e detectar a emissão de fótons, os dados adquiridos foram enviados a um computador que os analisa com um *software*. A fluorescência eventualmente produzida pela amostra é detectada e o momento da reação de PCR em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*) é comumente denominado de Ct (*Threshold cycle*). Os limiares máximos e mínimos 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 as amostras = queiloide e o controle = pele. O controle interno foi feito com genes endógenos de referência para identificar variações dos resultados obtidos e a mudança de razão dos genes diferencialmente expressos que podem apresentar-se hipoexpressos (*fold change* < -2), hiperexpressos (*fold change* > 2) ou sem diferença significativa ($-2 < \textit{fold change} < 2$), por isso a expressão gênica analisada dessa maneira é dita expressão gênica relativa.

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 da fita de DNA Complementar (cDNA), o *kit RT² First Strand*® (*SABioscience Corporation*) para as reações de transcrição reversa e completa eliminação do DNA (Ácido

desoxirribonucleico) genômico e o *Kit RT² Profiler® PCRarray* (SA Bioscience Corporation) sendo utilizado uma placa de 96 poços, com 84 genes diferentes, dentre os quais há os genes de relevância para o estudo da imunidade e mais 12 poços sendo; 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 para a análise global e relativa da qPCR *Array*. As reações foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística. Também foi decidido por realizar a análise em *pool*, após a extração, purificação e análise do RNA, o material de cada paciente foi colocado junto para realização da análise do conjunto dos pacientes de cada grupo separadamente, sendo, portanto, o resultado a expressão de todos os pacientes do grupo e não a análise individual de cada paciente.

O programa apresenta os resultados de duas formas sendo em mapa de calor ou *heat map* e gráfico de dispersão ou *scatter plot*. No mapa de calor são apresentados os resultados de cada poço que representa cada gene analisado, em cores diferentes onde vermelho representa os genes hiperregulados ou hiperexpressos, verde aponta os genes hiporregulados ou hipoexpressos e a cor preta e/ou 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. A informação dos experimentos de RT-PCR para divulgação segue *guidelines* de conhecimento da comunidade acadêmica (BUSTIN *et al.*, 2009). A métrica do valor de Ct foi utilizada para normalizar a expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e determinar a diferença entre os grupos.

A seguir, a descrição detalhada da placa com cada gene relacionado à imunidade inata e adquirida:

Innate Immunity:

Pattern Recognition Receptors: DDX58 (RIG-I), NLRP3, NOD1 (CARD4), NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9.

Cytokines: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10, IFNA1, IFNB1, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL8, TNF.

Other Genes: APCS, C3, CASP1(ICE), CD14, CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, HLA-A, HLA-E, IL1R1, IRAK1, IRF3, IRF7, ITGAM, LY96 (MD- 2), LYZ, MAPK1 (ERK2), MAPK8 (JNK1), MBL2, MPO, MX1, MYD88, NFKB1, NFKBIA (I/Ba/Mad3), STAT1, TICAM1 (TRIF), TRAF6.

Adaptive Immunity:

Th1 Markers/Immune Response: CCR5, CD80, CXCR3, IFNG, IL18, IL23A, SLC11A1, STAT4, TBX21, TLR4, TLR6.

Th2 Markers/Immune Response: CCR4, CCR8, CD86, GATA3, IFNB1, IL10, IL13, IL18, IL4, IL5, IL6, NOD2, STAT6.

Th17 Markers: CCR6, IL17A, RORC, STAT3.

Treg Markers: CCR4, CCR8, FOXP3, IL10.

T Cell Activation: CD80, CD86, ICAM1, IFNG, IL23A, IL6, SLC11A1.

Cytokines: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNG, IL10, IL13, IL17A, IL18, IL2, IL23A, IL4, IL5, IL6, IL8, TNF.

Other Genes: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, FASLG (TNFSF6), HLA-A, IFNAR1, IFNGR1, IL1B, IL1R1, IRF3, IRF7, ITGAM, JAK2, MAPK8 (JNK1), MBL2, MX1, NFKB1, RAG1, STAT1.

Humoral Immunity: C3, CCL2 (MCP-1), CCR6, CRP, IFNB1, IFNG, IL6, MBL2, NOD2, TNF.

Inflammatory Response: APCS, C3, CCL5 (RANTES), CRP, FOXP3, IL1A, IL1B, IL4, IL6, MBL2, STAT3, TNF.

Defense Response to Bacteria: IFNB1, IFNG, IL23A, IL6, LYZ, MBL2, MYD88, NOD1 (CARD4), NOD2, SLC11A1, TLR1, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TNF.

Defense Response to Viruses: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD86, CD8A, CXCL10 (INP10), DDX58 (RIG-I), HLA-A, IFNAR1, IFNB1, IL23A, IL6, IRF3, NLRP3, TICAM1 (TRIF), TLR3, TLR7, TLR8, TYK2.

4.12 Metacore®

Na busca do aprofundamento do significado biológico dos resultados obtidos, foi utilizado o *software* MetaCore® (Thomson Reuters) que é um programa de computador que utiliza um banco de dados alimentado manualmente com informações já existentes na literatura. Este programa foi utilizado para identificar as vias canônicas de metabolismo ou sinalização e processos biológicos *Gene Ontology* (GO: www.geneontology.org).

Além das vias metabólicas e de sinalização, o banco de dados do MetaCore® é configurado para analisar 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 onde contém informações de interações de proteína-proteína humana, proteína-DNA e proteína-RNA além de pequenas moléculas. Esse acervo próprio contém informações sobre interações envolvendo mais de 90% das proteínas humanas com função conhecida (Anexo 1). O programa MetaCore® foi utilizado online no site: <http://thomsonreuters.com/en/products-services/pharma-life-sciences/pharmaceuticalresearch/metacore.html>

4.13 Análise Estatística

O programa de computador *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 $p < 0,05$ através do teste de *t de student* realizado pelo próprio *software* onde comparou-se os resultados do Grupo Queloide vs Grupo Controle.

5. RESULTADOS

RESULTADOS

A metodologia empregada produziu os genes com expressão diferenciada, e somente foram citados nos resultados os genes que apresentaram valores de $p < 0,05$, a mudança de razão, ou o termo em inglês mais conhecido como *Fold Regulation* (FR), maior que 2 (hiperexpressos) ou menor que -2 (hipoexpressos). Na análise dos 84 genes da imunidade, 20 ($20/84 = 24\%$) apresentaram-se diferencialmente expressos, sendo 100% hipoexpressos (Quadro 4) dentro do perfil estudado, para queiloide de lóbulo de orelha. Os resultados também foram apresentados em forma de mapa de calor (Figura 1) e como gráfico de dispersão (Figura 2).

Quadro 4. Genes diferencialmente expressos de queiloide de lóbulo de orelha.

GENE	<i>FOLD REGULATION</i>
CXCR3	-31,3898
MX1	-18,4431
FOXP3	-16,906
SLC11A1	-16,7968
TICAM1	-13,6171
TLR6	-10,9541
ITGAM	-5,6963
IL8	-5,0456
IL13	-4,6315
CD40LG	-4,0846
CD8A	-4,0778
IL1A	-3,8719
ICAM1	-3,7894
TLR4	-3,4295
IL18	-3,2736
HLA-A	-2,9796
FASLG	-2,9045
NFKBIA	-2,6606
MPO	-2,3802
TLR7	-2,1068

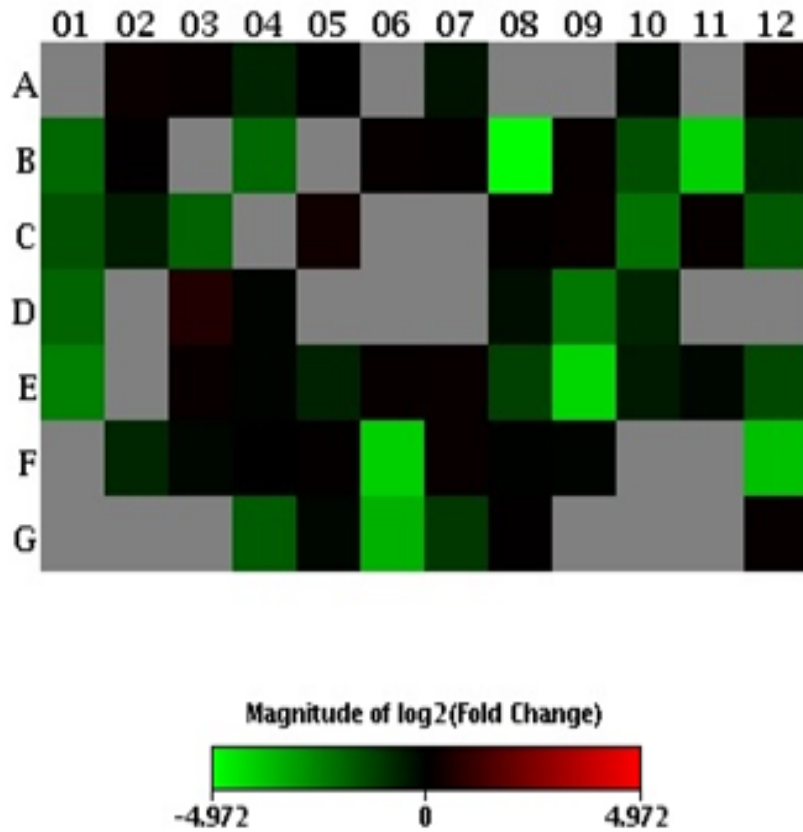


Figura 1. Mapa de calor (*Heat Map*) para os genes da imunidade nas amostras de queiloide de lóbulo de orelha. Em vermelho, genes hiperexpressos; em verde, genes hipoexpressos; e em preto/tons de cinza os genes que não apresentaram expressão.

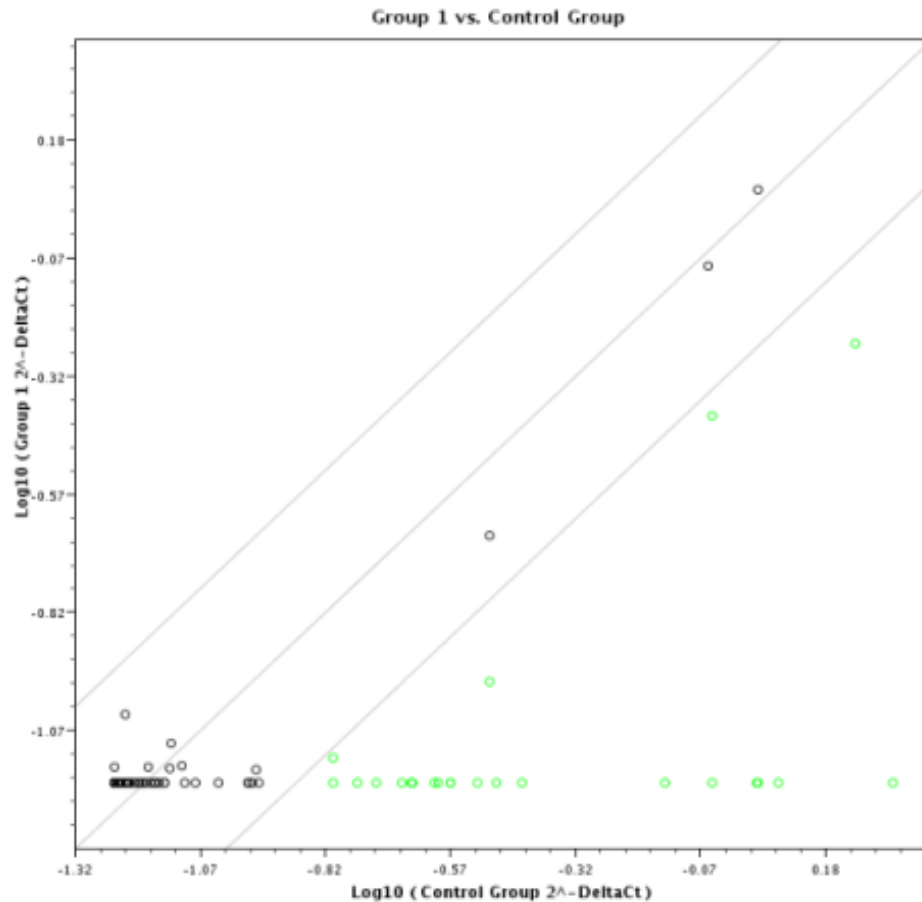


Figura 2. Gráfico de dispersão para genes da Imunidade nas amostras de queiloide de lóbulo de orelha. Em verde, genes hipoexpressos, e em preto/tons de cinza, os genes que não apresentaram expressão.

5.1 Análise de Processos Metabólicos e de *networks* por meio do programa MetaCore®

As redes selecionadas ou *networks* foram construídas a partir da expressão gênica através dos ensaios de PCR *Array* e os genes resultantes diferencialmente expressos. O conteúdo gênico dos arquivos enviados portava a lista de genes com os respectivos nomes e valores de *Threshold*

Cycle (Ct) que foi usado para a geração de redes biológicas usando modelos de vias ou caminhos canônicos para o seu algoritmo de conjunto de dados com as configurações padrão. Através do programa de computador MetaCore® (Thomson Reuters) foram construídas as vias canônicas para os genes relacionados à Imunidade. Na Figura 3 foram apresentadas as seis redes selecionadas a partir dos genes diferencialmente expressos alimentados ao sistema, e os respectivos processos de *Gene Ontology* (GO) gerados. Nas Figuras de 4 a 9 foram apresentadas as seis redes geradas com mais detalhes acerca das vias intracelulares relacionadas a estes genes.

	GO processes
<i>Mycob</i>	immune system process (91.1%; 1.441e-31), response to molecule of bacterial origin (55.6%; 3.937e-28), defense response (77.8%; 1.626e-27), response to other organism (66.7%; 1.907e-27), response to external biotic stimulus (66.7%; 2.006e-27), regulation of immune system process (78.4%; 1.004e-23), immune system process (83.8%; 9.508e-22), defense response (75.7%; 1.097e-21), inflammatory response (54.1%; 8.445e-21), response to external stimulus (78.4%; 5.044e-19), defense response (89.6%; 8.502e-40), immune response (85.7%; 1.224e-38), response to other organism (77.6%; 1.370e-38), response to external biotic stimulus (77.6%; 1.461e-38), response to biotic stimulus (77.6%; 5.921e-28), necrotic signaling pathway (100.0%; 1.257e-11), positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic, regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic, necrotic process (100.0%; 4.882e-09), antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via antigen processing and presentation (100.0%; 2.888e-13), antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I regulation of cellular amino acid metabolic process (71.4%; 9.395e-12), T cell costimulation (66.7%; 6.084e-13), lymphocyte costimulation (66.7%; 6.484e-13), regulation of T cell activation (77.8%; 2.801e-11), regulation of leukocyte cell-cell adhesion (77.8%; 3.466e-11), regulation of homotypic cell-cell adhesion (77.8%; 4.502e-11)
<i>lcn_5_CSE</i>	
<i>LCN5C6</i>	
<i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> (115_regulator), <i>Antigen extracellular matrix</i>	

Figura 3. Grupo de *Networks* gerados pelo programa MetaCore® a partir da lista dos genes diferencialmente expressos para Imunidade em queiloide de lóbulo de orelha.

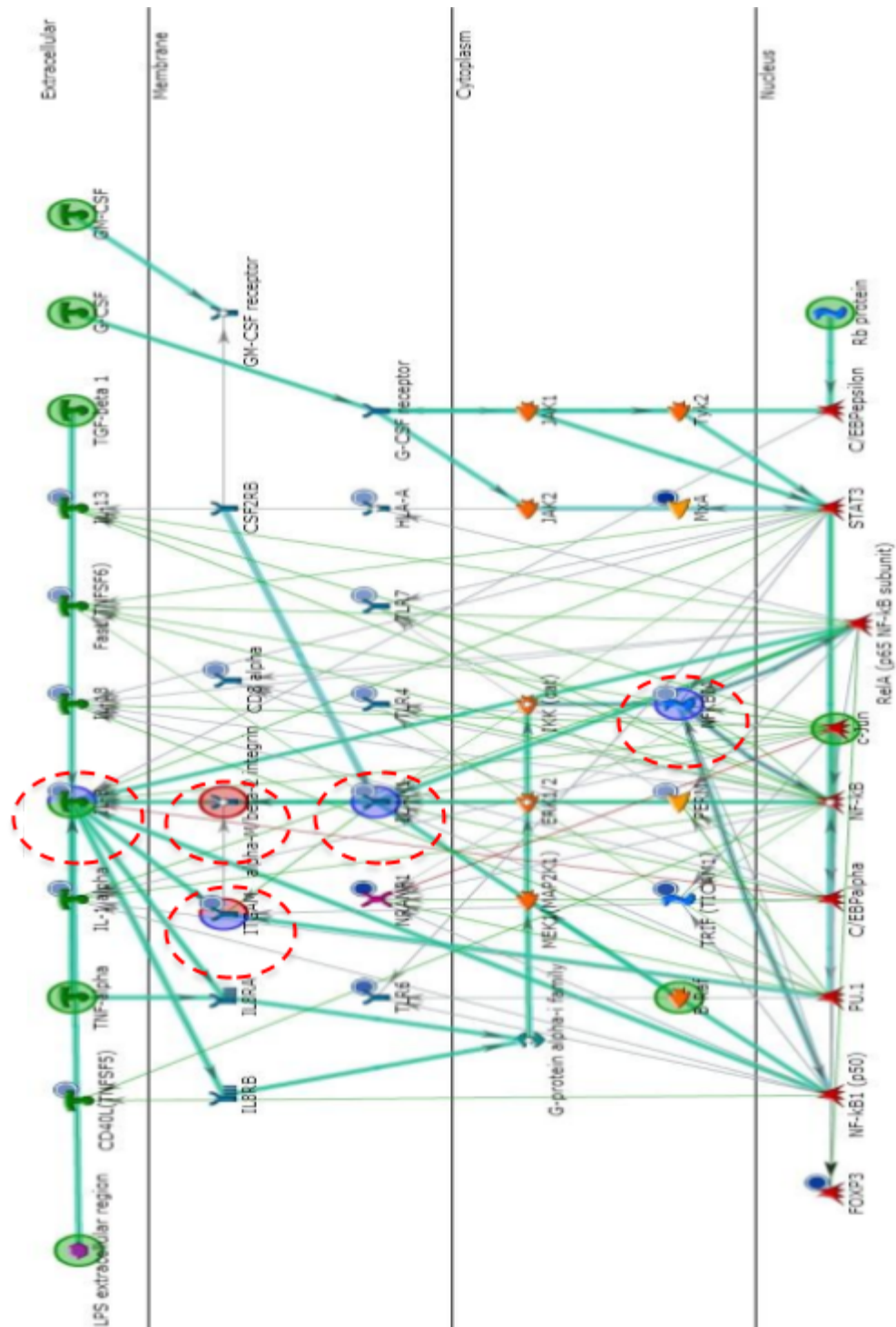


Figura 4. Análise por MetaCore® de queloide de lóbulo de orelha vs controles (n=12) - *Network 1* (ITGAM, *alpha-M/beta-2 integrin*, IL-8, ICAM1, NFKBIA). Ontologias Gênicas relacionadas: *immune system process* (91,1%), *response to molecule of bacterial origin* (55,6%), *defense*

response (77,8%), *response to other organism* (66,7%), *response to external biotic stimulus* (66,7%).

Observa-se a cascata de ativação do fator de transcrição STAT3 a partir do ligante extracelular G-CSF e da proteína de ligação *Rb protein*. STAT3 ativa o fator de transcrição *Forkhead box P3* (FOXP3) por meio outros fatores de transcrição ligados ao grupo NF-kB que junto com o fator de transcrição NF-kB1 atuam na ativação do receptor de Molécula de Adesão Celular 1 (ICAM1) e da proteína de ligação NFKBIA.

Além disso, observa-se intensa atividade dos fatores de transcrição que ativam importantes receptores de membrana: HLA-A, Receptor do Tipo *Toll-like* (TLR7), TLR4, ICAM-1, TLR-6 e a Molécula CD8A (CD8A) todos hipoexpressos no presente estudo; e ativam o ligante IL-8, diretamente e indiretamente pelos ligantes extracelulares (IL-13, FasL, IL-18, CD40L, TNF-*alpha* e IL1-*alpha*).

O IL-8 por sua vez atua na sequência de ativação de enzimas mediadas pela proteína G assim como na ativação da Integrina alfa M (ITGAM1).

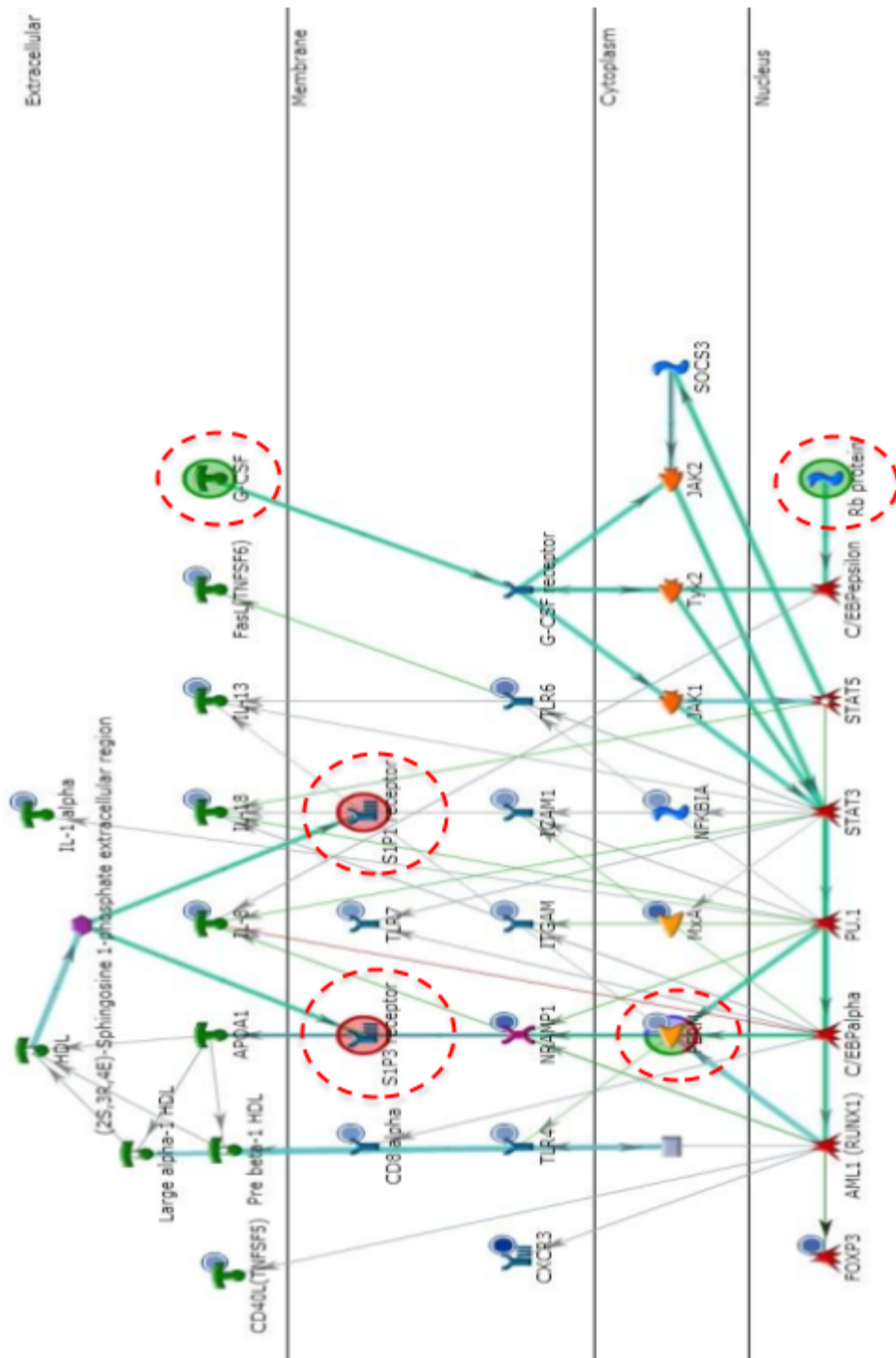


Figura 5. Análise por Metacore® de queiloide de lóbulo de orelha vs controle (n=12) - *Network 2* (PERM, S1P3 receptor, S1P1 receptor, Rb protein, G-CSF). Ontologias Gênicas relacionadas: *regulation of immune system process* (78,4%), *immune system process* (83,8%), *defense response* (75,7%), *inflammatory response* (54,1%), *response to external stimulus* (78,4%).

Nota-se que o G-CSF (ligante) através de seu receptor e um grupo enzimático atua na ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT5.

O STAT3 atua na ativação de diversos ligantes extracelulares: FasL (através do receptor de membrana TLR6); IL-13 (diretamente, mas também através do TLR6); IL-18 (através da proteína de ligação NFKBIA e do receptor ICAM-1) e IL-8 (ativação direta). Por sua vez, STAT3 e STAT5 através de outros fatores de transcrição atuam na ativação do fator de transcrição FOXP3 e da ativação da enzima citoplasmática PERM, ligada a ativação do ligante da Apolipoproteína 1 (APOA1) relacionada a apresentação de compostos para os Receptores de Esfingosina Fosfato (S1P1 e S1P3) acoplados a proteína G.

STAT3 é um membro da família de proteínas STAT, que em resposta a citocinas e fatores de crescimento, membros da família STAT são fosforilados pelas quinases associadas a receptores e então são translocados ao núcleo onde agem como ativadores da transcrição. Essa proteína media a expressão de uma variedade de genes em resposta ao estímulo celular e por isso tem papel importante em vários processos celulares como crescimento e apoptose (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6774>, acesso em 20/07/2019). Segundo PARK *et al.* (2008) a via da STAT3 está envolvida na proliferação de fibroblastos de queiloide.

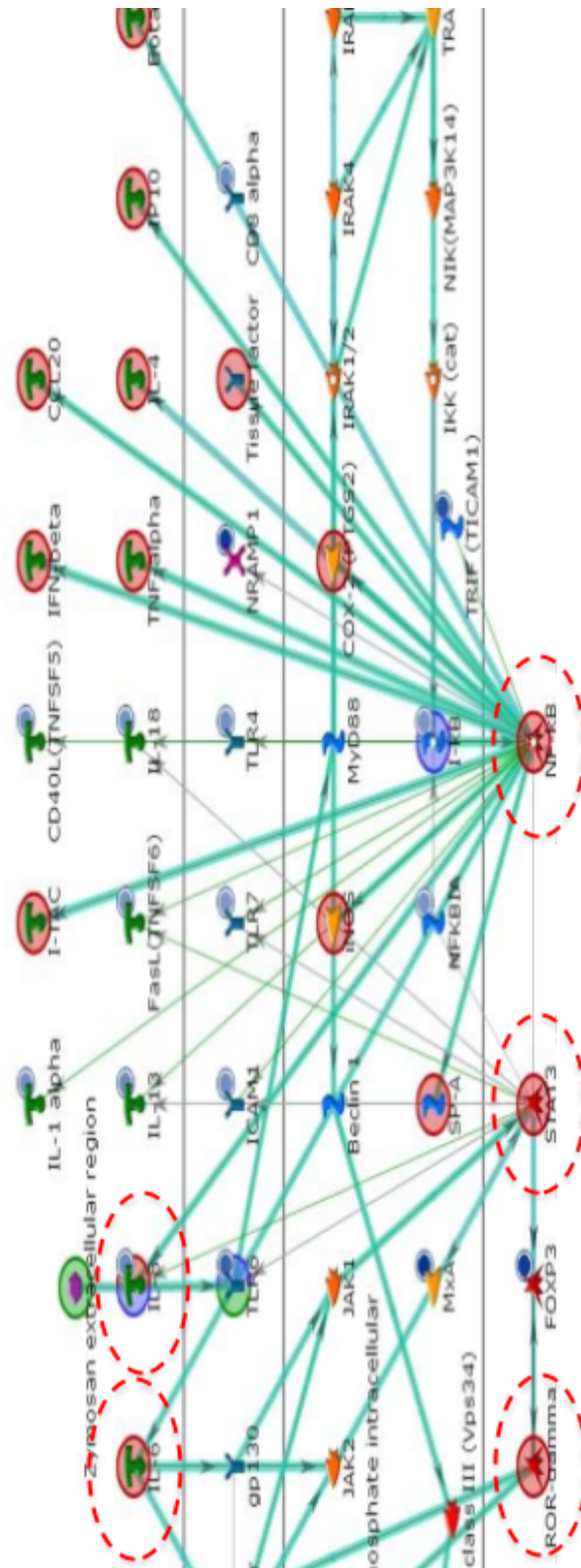


Figura 6. Análise por MetaCore® de quelóide de lóbulo de orelha vs controle (n=12) - *Network 3* (IL-8, NF-kB, STAT3, ROR-gamma, IL-6). Ontologias Gênicas relacionadas: *defense response* (89,8%), *immune response* (85,7%), *response to other organism* (77,6%), *response to external biotic stimulus* (77,6%), *response to biotic stimulus* (77,6%).

Nesta rede, inicia-se ativando o TLR6 por um composto extracelular, *Zymosan*, através do ligante IL-8. O receptor TLR6 atua indiretamente através, da proteína ligante de Resposta Primária de Diferenciação Mielóide (MyD88), na ativação do grupo de fatores de transcrição NF-kB o qual ativa receptores de membranas, CD8A, TLR7, TLR4, Fator Tecidual, ICAM1, e ligantes extracelulares, FasL, IL-13, IL1-alpha, IL-18, CD40L, IL-4, IP10, IL-6, entre outros. O ligante ativado IL-6 participa ativamente da ativação do fator de transcrição STAT3 o qual ativa ligantes extracelulares, mas também outros fatores de transcrição como o FOXP3 e o Receptor órfão relacionado com RAR (ROR- γ) que por sua vez ativa os ligantes extracelulares IL-17 e IL-17F.

De acordo com o estudo LIM *et al.* (2009), existe uma correlação entre a citocina IL-6 e a via da STAT3 na qual elas participariam de um sistema de *feedback* negativo exacerbado no queiloide. Isso pode ser devido a uma hiperestimulação de IL-6 levando a dessensibilização de seus receptores com inibição da via de STAT3 ou a secreção de fatores inibitórios que antagonizariam a sinalização de IL-6 em fibroblastos de queiloide. Segundo os autores, a IL-8 seria candidata a fator inibitório. As ligações cruzadas entre essas citocinas poderia contribuir para o desequilíbrio de citocinas durante a remodelação do tecido que predispõe as feridas ao queiloide.

A citocina IL-17F é muito similar a citocina IL-17. Ela é expressa por células T ativadas, e foi demonstrado que estimula a produção de outras citocinas, incluindo IL-6, IL-8 e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/112744>, acesso em 20/07/2019). A

IL-17 por sua vez é uma citocina pró-inflamatória que regula a atividade de NF-kB podendo estimular a expressão de IL-6 e COX-2 associada a inflamação crônica (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3605>, acesso em 20/07/2019).

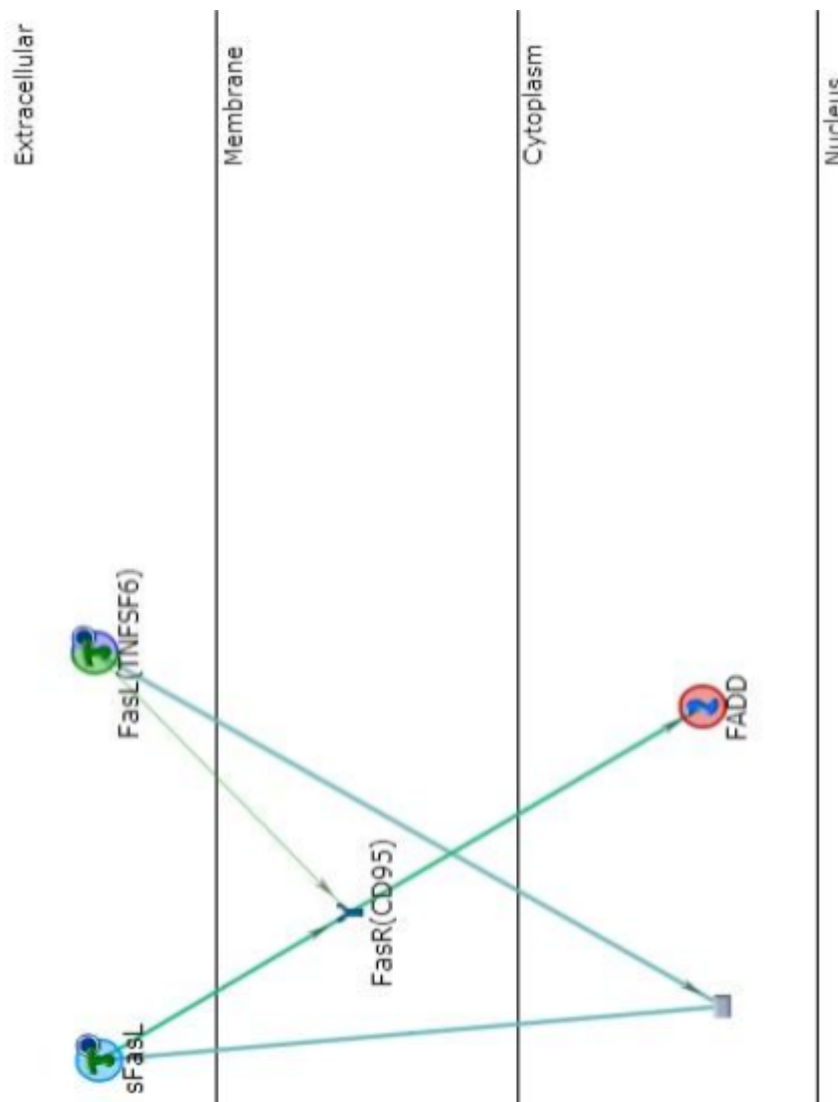


Figura 7. Análise por MetaCore® de queiloide de lóbulo de orelha vs controle (n=12) – *Network 4* (FADD, FasL (TNFSF6), sFasL, FasR (CD95), FasL (TNFSF6) = sFasL). Ontologias Gênicas relacionadas: *necroptotic signaling pathway* (100%), *activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway* (100%), *positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway* (100%), *regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic signaling pathway* (100%), *necroptotic process* (100%).

Expõe-se nesta rede o ligante extracelular FasL (TNFSF6) através de uma reação citoplasmática ativa o ligante extracelular sFasL. O sFasL

associado ao receptor FasR (CD95) – ativado pelo FasL – ativa Proteína associada ao Fas com domínio de morte (FADD).

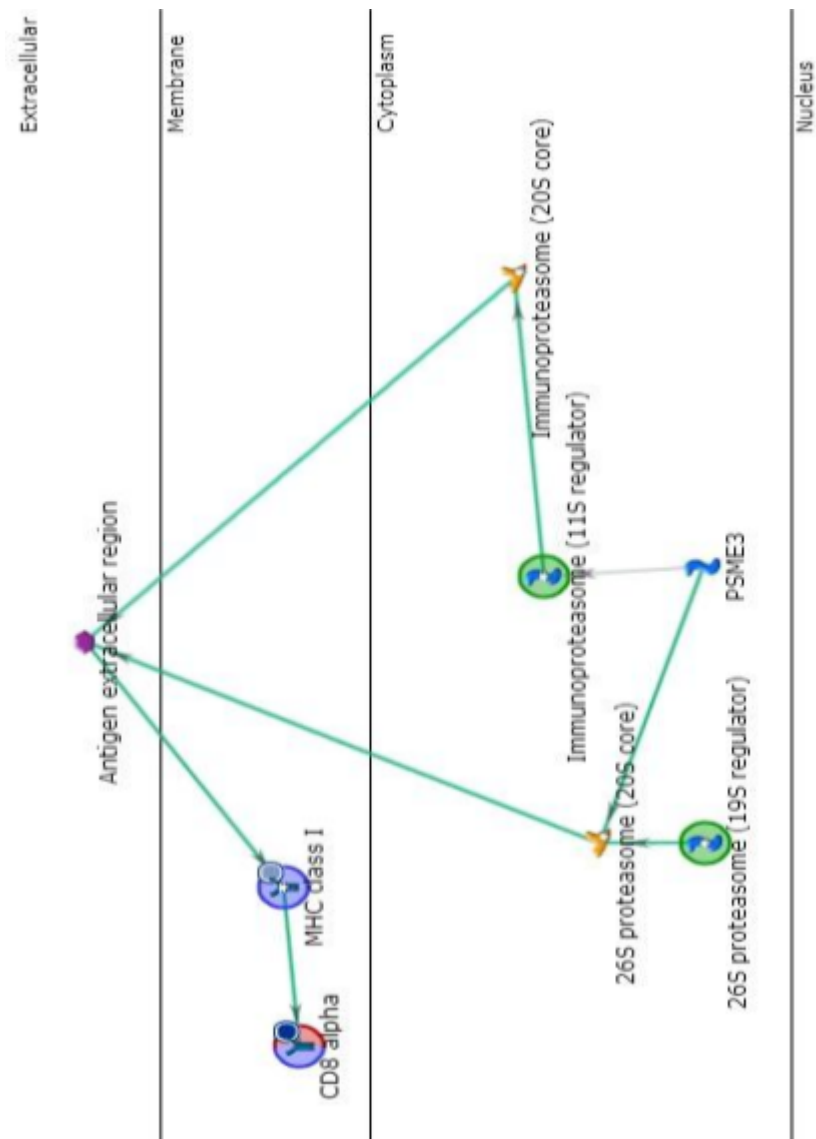


Figura 8. Análise por *MetaCore*[®] de queiloide de lóbulo de orelha vs controle (n=12) - *Network 5* (CD8 *alpha*, MHC class I, 26S proteasome (19S regulator), Immunoproteasome (11S regulator), Antigen extracellular region). Ontologias Gênicas relacionadas: *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen MHC class I TAP-dependent* (85,7%), *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen MHC class I* (85,7%), *antigen processing and presentation* (100%), *antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I* (85,7%), *regulation of cellular amino acid metabolic process* (71,4%).

É possível observar nesta rede o processo de apresentação de antígenos do meio extracelular ao MHC (Complexo de histocompatibilidade) de classe I o qual ativa o CD8 alfa. Anteriormente o antígeno é processado pelas proteases citoplasmáticas.

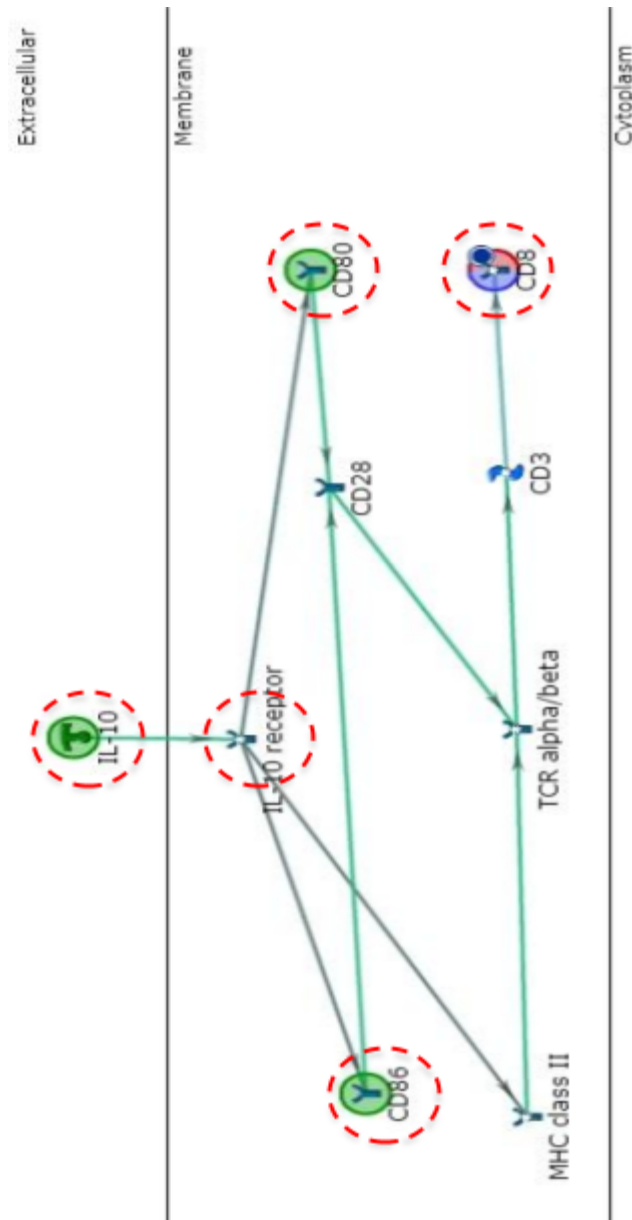


Figura 9. Análise por MetaCore® de quelóide de lóbulo de orelha vs controle (n=12) - *Network 6* (CD8, CD80, CD86, IL-10, IL-10 receptor). Ontologias Gênicas relacionadas: *T cell costimulation* (66,7%), *lymphocyte costimulation* (66,7%), *regulation of T cell activation* (77,8%), *regulation of leukocyte cell-cell adhesion* (77,8%), *regulation of homotypic cell-cell adhesion* (77,8%).

Pode-se constatar nesta rede que ocorre a ativação do complexo do receptor IL-10, que por sua vez age nos receptores CD86 e CD80, os quais

ativam o receptor CD28, e no complexo do MHC de classe II que junto ao CD28 ativa o receptor TCR alfa/beta. O receptor alfa/beta junto a proteína de ligação CD3 ativa o receptor CD8.

6. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O processo de cicatrização resulta de um conjunto complexo de reações entre as células sanguíneas, células da pele e mediadores bioquímicos incluindo moléculas pró e antiinflamatórias, fatores de crescimento, citocinas, hormônios e vitaminas (BROUGHTON *et al.*, 2006).

Doenças como esclerose sistêmica, esclerodermia localizada, queloides, cicatrizes hipertróficas, fasceíte eosinofílica, entre outras, com etiologias diversas afetam diferentes grupos demográficos em diferentes fases da vida compartilhando uma desregulação do metabolismo do tecido conjuntivo, com o envolvimento dos fibroblastos dérmicos. A característica compartilhada por esses distúrbios cutâneos é a deposição excessiva de colágeno por fibroblastos ativados (CANADY *et al.*, 2013b).

O estudo do perfil da expressão gênica do sistema imunológico no desenvolvimento do queleide de lóbulo de orelha é original da forma proposta pela metodologia do estudo, porque a maioria dos artigos da literatura mostram metodologia com vários tipos diferentes de apresentação e localização de queleide, e com outros tipos de análise que não o PCR array.

É essencial para o maior entendimento da fisiopatogenia de uma alteração cicatricial tão frequente, com várias hipóteses ou teorias para explicar seu desenvolvimento e ainda por apresentar alta taxa de recidiva para as opções de tratamento aos pacientes portadores de queleide. Assim, foi realizada essa análise resultando em 20 genes (24%) diferencialmente

expressos, sendo 100% hipoexpressos. Posteriormente, foi utilizado o MetaCore® para analisar o envolvimento dos genes diferencialmente expressos em cascatas habitualmente existentes armazenadas em bibliotecas gênicas do conhecimento atual. Nesse processo, obteve-se como resultado 6 *networks* que relacionaram os genes a ontologias gênicas e processos da imunidade geral. Assim, acrescenta-se novo conhecimento a respeito das moléculas e dos processos que ocorrem na patologia do queiloide, somando esforços para o maior entendimento da doença.

Em estudos de ciências da saúde experimentais *in vitro* existe uma dificuldade maior do profissional da estatística em definir ou calcular o n do projeto, ficando com maior relação com a pergunta da pesquisa. Existem dois tipos principais de delineamento de estudo, os que usam grande número de pacientes e é baseado em evidência estatística, como estudos epidemiológicos, psicologia, *clinical trials*, estudos de genoma de ampla associação e busca de marcadores; e os que usam menor número de pacientes, como perguntas em biologia molecular, bioquímica e estudos de genética para identificação de perfil de perguntas específicas. Para o primeiro tipo de estudo com grande número de pacientes existem programas e fórmulas estatísticas bem delineadas para o acesso ao número correto da amostra, mas esse tipo de orientação não serve ao outro tipo de estudo referido anteriormente.

Em estudos de cultura de células, ou em estudos com fragmentos de tecidos onde se extraem amostras de RNA ou proteínas, como em biologia celular e molecular, o tamanho da amostra pode ser iniciado em experimentos múltiplos independentes em triplicata, que deve ser realizado

como replicação de forma independente, mas que pela repetição do experimento com número mínimo de variáveis possibilita mostrar um resultado coerente e homogêneo, e devendo ser aumentado o n se os resultados não forem consistentes e robustos, portanto, sem a necessidade de estudos estatísticos para obtenção do n no presente estudo (CUMMING, FIDLER, VAUX, 2007; LAZIC, 2010; VAUX, 2012; VAUX, FIDLER, CUMMING, 2012; VAUX, 2014).

No estudo com fragmentos de pele são extraídas moléculas de RNA total em alta quantidade, por ser de amostra tecidual, realizado em *pool* de cada grupo, queiloide e controle, e o PCR realizado em triplicata experimental. No presente estudo não foi necessário avaliar variantes raras ou mutações específicas que indicariam a necessidade de análise individual de cada paciente no agrupamento das amostras. Como a intenção principal foi a criação de um perfil inicial de pacientes com queiloide de lóbulo de orelha não tratados nos últimos 6 meses, justifica-se o uso de *pool* de amostras devido à facilidade de apresentação dos resultados, pois com resultados individuais existe a necessidade de comparação de cada indivíduo com o controle específico, gerando múltiplos resultados que dificultam o entendimento e o espaço para divulgação do conhecimento, além do custo-benefício oferecido por essa metodologia, pois teria de ser realizada em triplicata individualmente, e por ser uma técnica relativamente simples com uso consciente de materiais de alto custo e amplamente utilizada em diversas análises de biologia molecular (BANSAL *et al.*, 2011).

No fragmento de pele existem distribuídos, nas diferentes camadas da epiderme e derme, todos os tipos celulares, ou seja, queratinócitos, fibroblastos, células sanguíneas, células de defesa, células de músculo liso, células epiteliais, etc. Assim, nesse caso, resultou-se uma população celular heterogênea, sendo que todas células podem participar direta ou indiretamente no processo de cicatrização e serem corresponsáveis pelo desenvolvimento da cicatrização patológica.

Em experimento observacional *in vitro* no qual as amostras coletadas são utilizadas para a extração de RNA, 12 amostras em cada grupo foi um número suficiente de pacientes para mostrar num experimento uma relação causal forte entre a pergunta e o resultados obtidos para uma determinada condição fisiológica ou patológica realizada de forma observacional e com objetivo de obter um perfil inicial na qual não existe na literatura dados até o momento, sendo realizados os experimentos em *pool* de 12 pacientes de cada grupo, queloide e controle, totalizando 24 pacientes. A realização dos experimentos em triplicata é recomendável para garantir uma média confiável da precisão da metodologia proposta (PASSARI *et al.*, 2011).

A idade dos pacientes foi delimitada de 18 a 45 anos, variação de idade na qual o aparecimento e a prevalência de queloide são maiores. Segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, em 2006, queloides foram citados na lista de doenças dermatológicas mais frequentes. Em estudo de FURTADO *et al.* (2009), queloides foram mais frequentes em mulheres, afrodescendentes e no grupo de idade dos 30 anos, corroborando a literatura. Na amostra de pacientes do presente estudo foi observada

média de idade de 25,5 que esta dentro da faixa etária mais acometida respaldada pela literatura.

Quanto ao sexo, no critério de inclusão do estudo foram pacientes femininos e masculinos, pois sabe-se que ambos são acometidos igualmente (FERREIRA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2014), e para que não houvesse viés nos resultados devido as diferenças entre os sexos, como estímulos hormonais femininos ou masculinos, para uma resposta quanto aos marcadores para a população em geral. A amostra mostrou 5 homens e 7 mulheres, compatível com a maioria dos estudos epidemiológicos, alguns mostrando alguma frequência maior para o sexo feminino.

Quanto ao fenótipo ou a forma de apresentação do queiloide, eles podem ser de diversas, pedunculados, em especial no lóbulo da orelha; planos pequenos ou extensos em diferentes regiões, em especial em áreas de maior tensão como ombro ou região pré esternal, ou no tórax de forma geral; e por fim pode ser múltiplos, pequenos ou maiores ou coalescentes. No presente estudo, a apresentação do queiloide foi apenas de um tipo, no lóbulo de orelha e pedunculado. Existe uma taxa de complicações com a colocação do brinco e o material que o compõe, ao redor de 35%, sendo que é uma localização única com uma fisiopatologia mais coerente e com um único fator indutor que é a perfuração traumática do lóbulo para colocação do brinco. O orifício na pele para a colocação do brinco pode complicar com infecção, reação alérgica, especialmente ao níquel existente na sua constituição, e a formação do queiloide que se desenvolve de aspecto pedunculado podendo apresentar-se somente anterior, posterior ou em ambos as faces do lóbulo da orelha (HOCHMAN *et al.*, 2015). Portanto,

esse estudo objetivou estudar uma região específica e bem delimitada e com uma origem bem definida.

A escolha do grupo controle para o presente estudo é assunto complexo e de difícil decisão, mas o estudo da cicatrização patológica solicitaria de maneira ideal uma cicatriz de boa qualidade em localização próxima. No repertório cirúrgico da Cirurgia Plástica, cicatriz em região de lóbulo é de difícil obtenção, pois é uma unidade estética muito pequena com detalhes anatômicos que podem ser facilmente distorcidos se cirurgias para correção forem realizadas no local e é um local onde é utilizado adornos como brincos e *piercings* por ambos os sexos.

Cirurgias realizadas próximas e que poderiam fornecer pele sem cicatriz que seria descartada poderia ser correção de orelha em abano, que é uma cirurgia realizada em faixa etária que varia de 7 a 20 anos aproximadamente, e outra cirurgia comum é a ritidoplastia que é realizada em pacientes com idade entre 40 e 60 anos aproximadamente. Ambos os grupos etários fogem da faixa etária dos paciente operados para ressecção de queiloide que varia de 20 a 40 anos.

O maior problema com a escolha do local da obtenção de pele do grupo controle é o entendimento que muitos profissionais da área da saúde tem de que fibroblastos dérmicos apresentam diferente expressão gênica em diferentes localizações do organismo.

No estudo de RINN *et al.* (2006) foi descrito que os fibroblastos são células mesenquimais presentes em todos tecidos com muitas funções vitais durante o desenvolvimento como reparo de tecidos e doenças. Os fibroblastos de diferentes sítios anatômicos têm padrões de expressão

gênica distintos e característicos, mas os princípios que governam sua especialização molecular são pouco compreendidos. A organização espacial da diferenciação celular pode ser alcançada por especificação única de cada tipo celular, alternativamente, a organização pode surgir por células que interpretam sua posição ao longo de um sistema de coordenadas.

No estudo os autores testaram modelos analisando os perfis de expressão gênica em todo o genoma de populações primárias de fibroblastos através da técnica de *microarray* de 43 locais anatômicos únicos que abrangem todo o corpo humano. As diferenças em grande escala nos programas de expressão gênica foram relacionadas a três divisões anatômicas: ântero-posterior (rosto-caudal), proximal-distal e dérmica versus não-dérmica. Um conjunto de 337 genes que variaram de acordo com essas divisões posicionais foi capaz de agrupar todas as 47 amostras por seus locais anatômicos de origem.

Os genes envolvidos na formação de padrões, sinalização célula-célula e remodelação da matriz foram enriquecidos entre esse conjunto mínimo de genes identificadores posicionais. Muitas características importantes do padrão embrionário da expressão do gene HOX foram mantidas nos fibroblastos e foram confirmadas *in vitro* e *in vivo*. Juntos, esses achados sugerem que as variações específicas do local nos programas de expressão gênica de fibroblastos não são idiossincráticas, mas estão sistematicamente relacionadas às suas identidades posicionais em relação aos principais eixos anatômicos.

Os autores chegaram a padrões específicos, mostrando que

fibroblastos de mãos, pés e genital masculino tem mesmo padrão de expressão; braços e antebraços possuem padrão semelhante a pernas e coxas; que a expressão de fibroblastos viscerais é diferente da expressão de fibroblastos dérmicos; e por fim que fibroblastos acima da cicatriz umbilical, tórax, pescoço e cabeça, apresentam expressão semelhantes. Portanto, estes achados conferiram suporte científico para a escolha da região da mamoplastia no presente estudo como grupo controle, visto que o lóbulo de orelha e as mamas estão localizados na região anterior do tronco, acima da cicatriz umbilical, apresentando padrão similar de expressão gênica e molecular dos fibroblastos.

Os genes diferencialmente expressos que apresentaram-se hipoexpressos no presente estudo foram o CXCR3 [-31,3898], MX1 [-18,4431], FOXP3 [16,906], SLC11A1 [-16,7968], TICAM1 [-13,6171], TLR6 [-10,9541], ITGAM [-5,6963], IL-8 [-5,0456], IL-13 [-4,6315], CD40LG [-4,0846], CD8A [-4,0778], IL1A [-3,8719], ICAM1 [-3,7894], TLR4 [-3,4295], IL-18 [-3,2736], HLA-A [-2,9796], FASLG [-2,9045], NFKBIA [-2,6606], MPO [-2,3802], TLR7 [-2,1068].

O gene receptor de quimiocina 3, CXCR3, com *fold change* -31,3898 sendo portando um gene hipoexpresso no grupo queuloide, codifica um receptor acoplado à proteína G com seletividade para três quimiocinas, denominadas Ligante de quimiocina CXC/Monoquina induzida por interferon- γ (CXCL9/Mig), CXCL10/IP10, proteína 10 kDa induzível por interferon- γ , e CXCL11/I-TAC, interferon- γ α -químioatraente de células T induzíveis. A ligação de quimiocinas a estas proteínas induzem respostas celulares que estão envolvidas no tráfego de leucócitos, mais notavelmente

a ativação da integrina, alterações do citoesqueleto e migração quimiotática. Alternativamente, variantes transcritas processadas codificando diferentes isoformas foram encontradas para este gene.

CAMPBELL *et al.* (2004) apresentaram resultados com um efeito regulador claro da expressão diferencial de CXCR3 em respostas de memória de citocinas estimuladas por antígenos e que uma deficiência de expressão de CXCR3 por células TCD4 experientes em antígenos pode ser um fator chave limitando a habilidade de indivíduos alérgicos em responder à CXCL9-11 endógena com Imunidade Th1, Linfócitos T *helper*, por reexposição a antígenos ambientais. O nível de expressão do CXCR3 é um fator crucial que determina tanto a capacidade de resposta quanto à intensidade de resposta aos ligantes de CXCR. Consequentemente, indivíduos alérgicos podem ser hiporresponsivos simplesmente devido a níveis mais baixos de expressão de CXCR3 em suas células T específicas para alérgenos.

A formação de cicatrizes fracas, fibróticas e hiper celulares em modelos murinos, segue o desarranjo da sinalização de CXCR3, que inclui a promoção da migração de queratinócitos, diminuição de neovasos e diminuição da migração de fibroblastos durante a remodelação da cicatriz (HUEN & WELLS 2012; YATES *et al.*, 2010). O conhecimento da literatura mostra alguns aspectos compatíveis de que a alteração da expressão do CXCR3, como no caso dos resultados obtidos no presente estudo com a hipoexpressão do gene CXCR3, embora não existam artigos específicos do CXCR3 e quelóide, assim como na hipoexpressão e

alteração da resposta em processos alérgicos, ou em modelos muranos de cicatrização patológica.

O gene Dinamina MX1 como GTPase1, é o responsável pelo código da proteína MX1 de ligação a GTP induzida por interferon, com *fold change* -18,4431 sendo, portanto, hipoexpresso no grupo queiloide, codifica uma proteína de metabolização de trifosfato de guanosina (GTP) que participa na resposta antiviral celular. Em camundongos, a proteína Mx induzida por interferon é responsável por um estado antiviral específico contra a infecção pelo vírus *influenza* (*Myxovirus*). A proteína codificada por esse gene é semelhante à proteína de camundongo, conforme determinado por sua relação antigênica, condições de indução, propriedades físico-químicas e análise de aminoácidos. Essa proteína citoplasmática é um membro da família da dinamina e da família das grandes GTPases.

GHOREISHI, KELLET, DUTZ (2012) fizeram uma comparação entre morfeia, lúpus eritematoso cutâneo e líquen plano na qual utilizaram amostra de queiloide como controle por ser uma patologia fibrótica. Foi utilizado anticorpo monoclonal anti-MxA (anti-mixovírus A) humano para investigar a expressão da proteína induzida por IFN-1 e a presença de células dendríticas plasmocitóides. A análise de imuno-histoquímica também foi realizada. Observou-se que nas lesões de queiloide, houve expressão mínima e dispersa de MxA na derme, porém, não na epiderme ou no tecido subcutâneo, enquanto nas outras patologias testadas a proteína MxA foi detectada em altos níveis. Esse foi o único estudo encontrado na literatura que vincula queiloide ao MX1, e os dados desse estudo foram

coerentes como do presente estudo, demonstrando baixos níveis de expressão da MX1 no queiloide.

O gene *Forkhead box P3*, FOXP3, também conhecida como escurfina, é uma proteína envolvida nas respostas do sistema imunológico. Membro da família de proteínas FOX, o FOXP3 funciona como um regulador principal da via reguladora no desenvolvimento e na função das células T reguladoras. As células T reguladoras geralmente diminuem a resposta imune. No câncer, um excesso de atividade reguladora das células T pode impedir que o sistema imunológico destrua as células cancerígenas. Na doença autoimune, uma deficiência da atividade reguladora das células T pode permitir que outras células auto-imunes ataquem os próprios tecidos do corpo.

Com *fold change* de -16,906, hipoexpresso no grupo queiloide, é um regulador transcricional crucial para o desenvolvimento e função inibitória de Linfócitos T regulatórios (Tregs). Desempenha um papel essencial na manutenção da homeostase do sistema imunológico, permitindo a aquisição da função supressora completa e a estabilidade da linhagem Treg modulando diretamente a expansão e a função das células T convencionais.

Os Tregs representam um dos principais mecanismos imunológicos para manter a tolerância aos inofensivos auto antígenos e são críticos para o desenvolvimento e manutenção da auto tolerância suprimindo a ativação, produção de citocinas e a proliferação de células T efetoras, como as células Th1, Th2 e Th17 (LOSER & BEISSERT, 2012).

MURAO *et al.* (2014) utilizaram amostras de queiloide, queimadura parcial superficial, cisto epidérmico inflamado, cicatriz madura e pele sem

cicatriz para investigar a quantidade de Tregs. O número de Tregs nos queloides foi comparado com os seus níveis nas condições representativas de lesão da pele, na queimadura de espessura parcial superficial ou na inflamação do cisto epidérmico; usando imuno-histoquímica, e observaram uma proporção significativamente mais baixa de células T FOXP3 + na população de células T CD4 + em células provenientes de quelóide.

O quelóide é um tumor dérmico com alta taxa de recorrência pós-operatória. O sistema imunológico desempenha um papel crítico na prevenção da infiltração de patógenos, induzindo inflamação, iniciando processos adjuvantes e recrutando fibrócitos em queloides. Curiosamente, um enriquecimento local, mas não sistêmico, das células Treg e da expressão gênica associada a Treg nas lesões de quelóide em comparação com os tecidos não quelóide. Simultaneamente, os tecidos de quelóide apresentaram expressão significativamente elevada do colágeno tipo I e III. Além disso, o nível de colágeno III e a proporção de colágeno III para colágeno I foram positivamente correlacionados com o nível de FOXP3. Para investigar se as células Treg poderiam promover diretamente a expressão do colágeno, os fibroblastos foram co-cultivados com células Treg autólogas. As células Treg ativadas, mas não as células Treg inativas, foram capazes de promover a expressão do colágeno. Essa resposta foi mais pronunciada em pacientes com quelóide do que nos controles não quelóide e exigiu a secreção de TGF- β . No geral, esses achados demonstraram uma conexão entre superexpressão e desequilíbrio de colágeno e desregulação de Treg nos tecidos de quelóide (CHEN *et al.*, 2019).

Os detalhes mecanicistas da formação do quelóide ainda não são compreendidos. Dado que o sistema imunológico está envolvido no reparo de lesões de pele, foram examinados os macrófagos CD14 + e as células T CD3 + em tecido de quelóide e tecido de pele. Comparados à pele, os tecidos de quelóide apresentaram infiltração significativamente elevada por macrófagos CD14. Além disso, a transcrição e expressão proteica do Óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-12, IL-10 e TGF- β foram significativamente maiores em macrófagos de quelóide do que em macrófagos normais da pele, nos quais a expressão de genes associados a M2 foi ainda mais elevada em comparação com M1- genes associados no quelóide. Também foi observado que os tecidos de quelóide apresentaram maior infiltração pelas células TCD3, sendo a maioria células TCD4. Notavelmente, a frequência de células T reguladoras FOXP3 + Tregs foram significativamente maior em comparação com a do sangue periférico. Além disso, os macrófagos dos tecidos quelóides possuíam uma capacidade potente para induzir a expressão FOXP3 nas células TCD3 circulantes. Juntos, este estudo sugeriu que os macrófagos nos tecidos quelóides apresentavam alto *status* de ativação e eram polarizados em direção ao subtipo M2; além disso, esses macrófagos poderiam promover a diferenciação de Treg através da regulação positiva da expressão FOXP3. Os autores obtiveram quelóides de 16 pacientes inicialmente e posteriormente de mais 8 pacientes, todos previamente não tratados, nos dois grupos mulheres mais que homens na amostra, idade de 22 a 51 anos e quelóide de todas as regiões, menos de lóbulo de orelha. Para controle usou 8 pacientes e mais 5 numa segunda rodada, provenientes de cirurgia

estética, não sendo relatado o local da origem do tecido. Em ambos grupos foi coletado sangue (JIN *et al.*, 2018).

BOYCE *et al.* (2001) investigaram a contribuição de linfócitos e macrófagos para cicatrização do quelóide, caracterizando morfológicamente as subpopulações de células inflamatórias em cicatrizes de quelóide em comparação com a pele. Foram realizadas biópsias por *punch* de 3mm do antebraço anterior de oito voluntários saudáveis normais. Oito cicatrizes de quelóide foram excisadas usando uma técnica intralesional, de diferentes localizações, 3 de lóbulo de orelha, 2 região pós auricular, duas no esterno e uma no abdome. Todo o tecido foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido e as seções seriais foram coradas com um painel de anticorpos monoclonais de células antiinflamatórias. Os números de macrófagos e linfócitos e as proporções das subpopulações foram comparadas. Maiores números de macrófagos e linfócitos foram encontrados na derme do quelóide ($p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente [teste U de Mann-Whitney]). Não houve aumento significativo na expressão dos marcadores de ativação linfocitária, CD25 e CD27. No entanto, houve uma relação CD4+: CD8+ (Th: Ts) significativamente maior ($p=0,046$) no tecido do quelóide. Isso sugere que um desequilíbrio nessas subpopulações de células inflamatórias pode contribuir para a cicatrização do quelóide no homem.

Pode-se observar que as alterações na população de macrófagos e linfócitos T dentro do quelóide é importante nesses dois estudos, e mostra que a imunidade é um foco importante a ser estudado em quelóide. O estudo de BOYCE *et al.* (2001) não fala do gene FOXP3, mas o de JIN *et*

al. (2018), refere que o mesmo está mais expresso, mostrando não concordância com os resultados do presente estudo, que mostra o FOXP3 hipoexpresso, mas a metodologia é diferente da usada e a origem do queiloide foi de todas regiões menos de lóbulo de orelha. O presente resultado aponta um dado novo no conhecimento sobre o tema.

O gene SLC11A1 codifica a Proteína 1 de Macrófagos Associada à Resistência Natural 1, com *fold change* -16,7968, hipoexpresso no grupo queiloide, essa proteína de membrana funciona como um transportador de metal de transição divalente (ferro e manganês) envolvido no metabolismo do ferro e na resistência do hospedeiro a certos patógenos. Mutações nesse gene têm sido associadas à suscetibilidade a doenças infecciosas, como tuberculose e hanseníase, e doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e doença de Crohn.

NISHINO *et al.* (2005) analisaram a associação do polimorfismo na região promotora SLC11A1 em 244 pacientes japoneses com diagnóstico de doença autoimune (Diabetes tipo 1) e verificou-se que o efeito protetor do alelo 2 contra Diabetes tipo 1 e outras doenças autoimunes mostrou estar associado à baixa expressão do SLC11A1 demonstrando que um sistema imunológico menos ativo pode proteger indivíduos de doenças autoimunes.

Na busca da literatura foram encontrados estudos relacionando SLC11A1 com doenças autoimunes e inflamatórias como artrite, mas não com queiloide, demonstrando ser um achado novo, mostrando a possibilidade de novos estudos com esse gene que mostrou alta hipoexpressão.

O gene TICAM1, chamado de Molécula Interferon β indutor de adaptador de domínio, com *fold change* -13,6171 foi hipoexpresso no grupo queiloide. Esse gene codifica uma proteína adaptadora que contém um domínio de homologia de receptor *Toll*/interleucina-1 (TIR), que é um domínio de sinalização intracelular que medeia as interações proteína-proteína entre os receptores do tipo *Toll* (TLRs) e os componentes de transdução de sinal. Esta proteína está envolvida na imunidade nata contra patógenos invasores. Interage especificamente com o receptor *Toll-like 3*, mas não com outros TLRs, e essa associação medeia a indução de fita dupla de RNA (dsRNA) do INF- β através da ativação do NF- κ B, durante uma resposta imune antiviral.

MATSUMOTO & SEYA (2008) relataram que o receptor TLR3 reconhece o RNA de fita dupla viral e induz o IFN a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias além da maturação das células dendríticas através da proteína TICAM1. O envolvimento de TLR3 e TICAM1 na ativação de células *Natural killer* (NK) e CTLs por DCs mielóides sugere que o TLR3 serve como um indutor de imunidade celular, detectando infecção viral.

SEYA *et al.* (2009) relataram que o TICAM1 pode atuar como uma plataforma de sinalização para induzir apoptose, autofagia, ativação de células NK. Os pesquisadores verificaram se o TICAM1 em células do sistema imunológico é importante para o retardo do crescimento de tumor. O TICAM1 foi transfectado em células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDCs), e essas células foram transferidas para camundongos com carga tumoral. O crescimento tumoral foi

significativamente reduzido em camundongos injetados com BMDCs positivas para TICAM1, mas não naqueles injetados com outras BMDCs que não expressaram TICAM1. Assim, a via mDC TICAM1 está envolvida na ativação NK antitumoral.

VERSTAK *et al.* (2014) relataram que os receptores *Toll-like* atuam como sentinelas em células imunes para detectar e iniciar a resposta imune inata ao desafio do patógeno.

HONG *et al.* (2015) estudaram a relação do vírus da Hepatite B com o gene TRIF (TICAM1) e relataram que a proteína deste gene foi regulada negativamente em linhagens celulares de hepatoma e amostras de tecido hepático portadoras deste vírus além da apoptose celular induzida por TRIF também ser confirmada em linhagens celulares de hepatoma.

Os estudos mostram relação com resposta imune antiviral e resposta tumoral, não tendo sido encontrado nenhum estudo relacionado a queiloide. O resultado no presente estudo quanto a expressão do gene TICAM1 é um acréscimo ao conhecimento atual sobre o tema, e deve ser um gene de interesse para estudos futuros por aparecer em estudos relacionados a câncer, e seu envolvimento com ação antitumoral, sendo que alguns autores consideram o queiloide como um tumor benigno.

O gene *Toll like receptor 6* (TLR6) com *fold change* -10,9541, hipoexpresso no grupo queiloide, também foi designado como CD286. A proteína codificada por esse gene é um membro da família de receptores TLR, que desempenham papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata pois reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP's) que são expressos em

agentes infecciosos mediando a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de imunidade efetiva. O TLR6 interage funcionalmente com o TLR2 para mediar resposta celular às lipoproteínas bacterianas. São encontrados principalmente em células imunes como macrófagos, linfócitos B e mastócitos.

GALOIAN *et al.* (2018) investigaram receptores TLR1/2, TLR6 e a proteína mucina 5 (MUC5B) como parceiros de interação de ligação com o polipeptídeo citostático rico em prolina 1 (PRP1) em condrossarcoma humano, uma neoplasia óssea que não responde às terapias convencionais. Os TLR1/2, TLR6 e MUC5B foram negativamente regulados no condrossarcoma humano e aumentados de forma dose-resposta com o tratamento com PRP1. Neste contexto celular os receptores mencionados tinham função supressora de tumor.

Não foi encontrado nenhum estudo relacionando TLR6 e queiloide. O resultado do presente estudo quanto a expressão do gene TLR6 é um acréscimo ao conhecimento atual sobre o tema, e deve ser um gene de interesse para estudos futuros por aparecer em estudo relacionado a câncer, e sua hipoexpressão em condrossarcoma.

O gene da Integrina alfa M, ITGAM, com *fold change* -5,6963, hipoexpresso no grupo queiloide, codifica a cadeia de Integrina alfa M. Integrinas são proteínas de membrana integrais heterodiméricas compostas de uma cadeia α e uma cadeia β . A integrina $\alpha M\beta 2$ é importante na aderência de neutrófilos e monócitos ao epitélio estimulado, e também na fagocitose de partículas cobertas de complemento. O gene ITGAM,

localizado no cromossomo 16 é um dos que desempenham um papel nas vias moleculares que dão origem ao lúpus eritematoso sistêmico.

Devido a propensão de infecções graves, BOULOUGOURIS *et al.* (2019) investigaram em vacas periparturientes o efeito de dois principais estímulos inflamatórios: Componente 5a (C5a) e lipopolissacarídeos (LPS) na expressão de alguns genes selecionados e funções ligadas a esses receptores incluindo o ITGAM. Foi evidenciado que o ITGAM, envolvido na inflamação precoce, mostrou uma menor expressão em vacas periparturientes indicando uma resposta diferente dos neutrófilos em resposta ao LPS durante esse período. Uma diminuição no ITGAM, complica a localização correta dos neutrófilos e a fagocitose e sua regulação negativa sobre a estimulação podendo ser prejudicial para a erradicação adequada do patógeno além de aumentar a probabilidade de uma inflamação desequilibrada.

Não foi encontrado nenhum estudo relacionando ITGAM e queiloide. O resultado no presente estudo quanto a expressão do gene ITGAM é um acréscimo ao conhecimento atual sobre o tema, e deve ser um gene de interesse para estudos futuros por aparecer nesse estudo de BOULOUGOURIS *et al.* (2019) e sua diminuição foi prejudicial na erradicação da patogenia e aumentar o risco de inflamação, presente no queiloide.

O gene Interleucina 8, IL-8, com *fold change* -5,0456, hipoexpresso no grupo queiloide é um membro da família de quimiocinas CXC e é um importante mediador da resposta inflamatória. É o principal mediador da resposta imune inata aos microorganismos intracelulares e é indutor chave

da imunidade mediada por célula, a resposta adquirida contra esses microorganismos. Produzida pelos fagócitos mononucleoses ativadas e pelas células dendríticas, estimula a diferenciação dos linfócitos Th em Th1 produtores de IFN- γ . A proteína codificada é secretada principalmente por neutrófilos, onde serve como um fator quimiotático, guiando os neutrófilos para o local da infecção. Essa quimiocina também é um potente fator angiogênico.

SMITH *et al.* (2008) através da técnica de *microarray* em amostras cultivadas de fibroblastos normais e de quelóide na presença e na ausência de hidrocortisona observaram a regulação de diversos genes. Em seu estudo o gene IL-8 também estava hipoexpresso em fibroblastos de quelóide na ausência de hidrocortisona, compatível com os achados do presente estudo.

Outros estudos avaliaram a expressão da proteína do gene da IL-8 na qual apresentaram resultados divergentes quando comparados ao presente estudo. ZHANG *et al.* (2016) verificaram a expressão de uma quimiocina (CKLF-1), na qual é descrita como uma nova citocina que tem um papel crucial nas respostas imunológicas e inflamatórias para avaliar a diferença entre pacientes com quelóide e sem quelóide. Foram coletadas 50 amostras no total aleatoriamente e divididas em cinco grupos sendo amostras de pacientes com quelóide, amostras de pele, amostras de pacientes com cicatriz, amostras de pele de pacientes com cicatriz e amostras de pele de pacientes sem cicatriz. Comparado ao grupo quelóide, os outros 4 grupos apresentaram significativamente menos infiltração inflamatória e menores níveis de expressão de CKLF-1, IL-6, IL-8, IL-18 e TGF- β .

Em contrapartida, TANAKA *et al.* (2019) compararam o número de células progenitoras endoteliais circulantes e a capacidade vasculogênica e angiogênica, bem como a função secretora de células CD34 + circulantes em amostras de sangue periférico de pacientes com quelóide e indivíduos saudáveis. Foram 16 pacientes com quelóide, idade de 20 a 65 anos, 4 homens e 12 mulheres, um quelóide de lóbulo de orelha com tórax no mesmo paciente, sendo que 7 tinham quelóides em diferentes regiões e o tórax foi o local mais frequente com 11 casos. Constatou-se que as células CD34 + derivadas de pacientes com quelóide demonstraram uma expressão de mais de sete vezes do gene da IL-8 e uma expressão de mais de cinco vezes do gene do fator de crescimento endotelial vascular do que as células CD34 + derivadas de indivíduos saudáveis. Os resultados deste estudo suportam o papel do fator de crescimento endotelial vascular e da IL-8 no aumento do recrutamento de células progenitoras endoteliais em pacientes com quelóide, o qual também mostra-se divergente quando comparados aos resultados do presente estudo, mas como ressaltado acima, foi usado o sangue periférico com uma mistura de vários tipos de quelóide existente no mesmo paciente, diferentes idades e sexo sendo distribuídos de forma diferente do presente estudo e da literatura.

O gene Interleucina 13, IL-13, com *fold change* -4,6315, hipoexpresso no grupo quelóide, codifica uma citocina imunorreguladora produzida principalmente por células Th2 ativadas que está envolvida em vários estágios de maturação e diferenciação de células B regulando positivamente a expressão de CD23 e MHC de classe II e promovendo a troca do isótopo IgE das células B, também regula negativamente a atividade de macrófagos inibindo a produção de citocinas e quimiocinas

pró-inflamatórias. A IL-13 foi clonada pela primeira vez em 1993 e está localizada no cromossomo 5q31 com um comprimento de 1,4 kb. Possui uma massa de 13 kDa e dobra-se em 4 feixes helicoidais alfa. As características estruturais secundárias da IL-13 são semelhantes às da IL-4; no entanto, possui apenas 25% de homologia de sequência e é capaz de sinalização independente de IL-4. A IL-13 é uma citocina secretada pelas células Th2, células CD4, célula T NK, mastócito, células basófilas, células eosinófilas e células *Nuocyte*. A IL-13 é um regulador central na síntese de IgE, hiperplasia das células caliciformes, hipersecreção de muco, hiper-responsividade das vias aéreas, regulação positiva da fibrose e da quitinase. É um mediador inflamatório de diferentes doenças, incluindo a asma.

ORIENTE *et al.* (2000) descreveram os efeitos da IL-13 na homeostasia do colágeno em fibroblastos normais e de quelóide, ambos linhagens celulares imortalizadas, e compararam com os efeitos da IL-4 e TGF β 1. A geração total de colágeno nos fibroblastos normais estava hiperregulada após 48h de ser estimulada pelo IL-13. Nos fibroblastos de quelóide, a estimulação com IL-13 levou a uma resposta mais rápida do colágeno, sendo equivalente para IL-4 e TGF β 1. A IL-13 demonstrou uma habilidade única entre as 3 citocinas de induzir a expressão gênica para pro-colágeno 3alfa1. Esses dados demonstraram os efeitos pro fibróticos da IL-13 na homeostasia do colágeno e a potencial regulação diferencial da homeostasia do colágeno em subtipos de fibroblastos pela IL-13. O estudo mostrou que a expressão aumentada da IL-13 tem efeito fibrótico, sendo diferente do resultado do presente estudo, onde no quelóide de lóbulo de orelha obtivemos a hipoexpressão da mesma. Deve ser considerado que o

estudo foi com linhagens imortalizadas, com diferente expressão do que ocorre num tecido retirado do paciente, e que o local, tipo, e tratamento do queloide não são mencionados.

DIAZ *et al.* (2019) verificaram a expressão gênica por RT-PCR analisando expressão de genes Th2, IL-4, IL-13 e CCL18 inicialmente em queloides de região poplíteia de um paciente do sexo masculino que apresentou boa resposta ao tratamento com Dupilumab® e posteriormente de mais 3 pacientes mulheres portadoras de queleide há muito tempo e sem dermatite atópica, que apresentavam queleide. No estudo utilizaram-se 5 pacientes, duas mulheres e três homens, hígidos, afroamericanos como controle, com lesões em extremidades. A IL-4 foi altamente hiper expressa em queleide, IL-13 foi hiper expressa em queleide e lesão não queleide versus controle, e CCL18 foi bastante aumentada sua expressão em queleide, em especial na pele sem queleide. A associação do queleide e o eixo Th2 pode sugerir alto risco para formação de queleide em pacientes com dermatite atópica. Dupilumab® e outros agentes que tem Th2 como alvo pode prover uma opção de tratamento para queleide severo. O estudo mostra metodologia muito diversa do presente estudo, sendo que os resultados não foram coerentes ao atual.

IL-4 e IL-13 são citocinas Th2 imunorreguladoras que mediam importantes efeitos profibróticos, incluindo proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. NGUYEN *et al.* (2019) realizaram um resumo do papel do eixo IL-4/IL-13 evidenciando o importante papel na cicatrização de feridas e formação de fibrose na pele. É fato a importância dessas interleucinas no cenário fibrótico onde interferem na formação de cicatrizes

patológicas. Os autores ressaltaram que mais estudos sobre esses alvos são necessários pois podem aclarar o desenvolvimento de novas terapias preventivas ou de tratamento para fibrose possibilitando um melhor entendimento.

MAEDA *et al.* (2019) verificaram que a periostina, uma proteína da matriz extracelular que desempenha um papel crucial no desenvolvimento da pele e na manutenção da homeostase, também está envolvida em doenças da pele inclusive formação de cicatrizes anormais. Para explicar o mecanismo desta proteína, foram realizados cultura com fibroblastos de pele de linhagem imortalizada e de cicatriz hipertrofica e de queiloide, sem referir n, local e tipo do queiloide, através de imuno-histoquímica, *Western blot* e qRT-PCR onde foi detectado que IL-4, IL-13 e TGF β 1 promove a produção e secreção de periostina em fibroblastos dérmicos e que a periostina estimula a secreção de TGF β 1 por ativação via RhoA. Os autores ressaltam que essa é uma nova via definida para a formação da cicatriz anormal, onde IL-4 e IL-13 induzem a secreção de periostina e TGF β 1 num mecanismo de retroalimentação. Sugerem que a inibição de IL-4/IL-13 e a via RhoA/ROCK pode ser um potencial terapêutico para reduzir a fibrose de pele. A proteína periostina indica participação na formação de cicatrizes fibróticas além de ativar e prolongar a resposta imune (ZHANG *et al.*, 2015; KAWATSUKA & MUROTA 2019).

Embora o entendimento do desenvolvimento da cicatriz fibroproliferativa não seja estabelecido, diversos estudos mostram o papel ativo das interleucinas, IL-6, IL-8, IL-10, bem como fatores de

crescimento, TGF- β e PDGF, durante o processo de cicatrização (BERMAN, MADERAL, RAPHAEL, 2017).

Nessas referências ao gene IL-13 nota-se que a metodologia, em relação ao “n” e o tipo de cultivo celular em boa parte com linhagem celular, não são referidas a origem do queiloide, localização e tipo de lesão, evidenciando a dificuldade de ter resultados compatíveis com o que se obteve no presente estudo, no qual a pergunta foi focada em queiloide de lóbulo de orelha, sem tratamento anterior, com amostra compatível com a epidemiologia do queiloide, similaridade entre homens e mulheres e em idade adulto jovem. O gene IL-13 no presente estudo foi hipoexpresso, enquanto na literatura apresenta-se aumentado em expressão, são necessárias pesquisas sem tantas variáveis como a realizada no presente estudo para respostas mais específicas e claras para possivelmente confirmar a literatura ou não.

O gene CD40LG com *fold change* -4,0846, hipoexpresso no grupo queiloide, também conhecido como CD154, ligante CD40 ou CD40L, é uma proteína que é expressa principalmente nas células T ativadas e é um membro da superfamília de moléculas de TNF. Liga-se ao CD40 (proteína) nas células apresentadoras de antígenos (APC), o que leva a muitos efeitos, dependendo do tipo de célula alvo. No total, o CD40L possui três parceiros de ligação: CD40, integrina $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha II\beta 3$. CD154 atua como uma molécula co-estimulatória e é particularmente importante em um subconjunto de células T chamadas células auxiliares foliculares T (células TFH). Nas células TFH, o CD154 promove a maturação e a função das células B, envolvendo o CD40 na superfície da célula B e, portanto,

facilitando a comunicação célula-célula. Um defeito nesse gene resulta em uma incapacidade de sofrer troca de classe de imunoglobulina e está associado à síndrome de hiper IgM. A ausência de CD154 também interrompe a formação de centros germinais e, portanto, proíbe a maturação por afinidade de anticorpos, um processo importante no sistema imunológico adaptativo.

EMING *et al.* (2009) afirmaram que as interações entre a glicoproteína CD40 e o ligante CD40L foram reportadas em ter papel importante nas interações célula-célula entre células residentes e não residentes no sítio da ferida. Células T que expressam CD40L podem interagir com queratinócitos, fibroblastos, plaquetas e macrófagos que expressam CD40 e dessa forma alterar seu perfil de expressão de mediadores inflamatórios e conseqüentemente suas funções de reparo.

Ademais, não foi encontrado na literatura estudos com dados de expressão deste gene e queleide sendo assim, este gene demonstra um novo acréscimo ao conhecimento do queleide.

O gene CD8A com *fold change* -4,0778 sendo, portanto, hipoexpresso no grupo queleide codifica um antígeno que é uma glicoproteína de membrana celular encontrada na maioria de linfócitos T citotóxicos que medeiam as interações célula-célula eficientes dentro do sistema imunológico. O antígeno CD8 atua como um correceptor com o receptor de células T no linfócito T para reconhecer antígenos exibidos por uma célula apresentadora de antígeno no contexto de moléculas de MHC classe I.

O gene Interleucina 1 alfa, IL1A, com *fold change* -3,8719, hipoexpresso no grupo queiloide, codifica uma proteína pertencente a um membro da família das citocinas da IL-1. Esta citocina é uma citocina pleiotrópica envolvida em várias respostas imunológicas, pela produção do processo inflamatório, promoção de febre, sepse e hematopoese, é produzida por monócitos e macrófagos como uma proteína proteoliticamente processada e liberada em resposta à lesão celular e, portanto, induz a apoptose. Os inibidores da IL-1 α estão sendo desenvolvidos para interromper esses processos e tratar doenças.

A IL-1 α é produzida principalmente por macrófagos ativados, bem como neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais. Possui atividades metabólicas, fisiológicas, hematopoiéticas e desempenha um dos papéis centrais na regulação das respostas imunes. Liga-se ao receptor de interleucina-1. É no caminho que ativa o fator de necrose tumoral alfa.

De acordo com ROERINK *et al.* (2017) e MISTRY, SAVIC, VAN DER HILST (2017), a IL1, incluindo α , β e antagonista do receptor, são uma família de citocinas envolvidas na regulação da resposta inflamatória e na incidência de doença imunológica clínica.

SU *et al.* (2018) realizaram uma meta-análise de polimorfismos de IL1A e o risco de várias doenças autoimunes publicadas em banco de dados e as análises mostraram que este gene está relacionado com diversas doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla e doença de Graves.

A IL1 demonstra-se como uma das principais citocinas inflamatórias locais e sistêmicas. Baseado nisso, DINARELLO & VAN DER MEER

(2013), demonstraram que o bloqueio da IL1 em doenças inflamatórias resulta em uma redução rápida da doença, porém, a redução de sua atividade resultou no aumento da carga da doença em diversos pacientes.

Não existem artigos com descritores IL1A e queiloide, mostrando ser um conhecimento novo ao tema esse resultado com hipoexpressão do gene no queiloide de lóbulo de orelha.

O gene da molécula de adesão intercelular 1, ICAM1, com *fold change* -3,7894, hipoexpresso no grupo queiloide, também conhecido como CD54, *Cluster* de diferenciação 54, é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene ICAM1. Este gene codifica uma glicoproteína da superfície celular que é tipicamente expressa em células endoteliais e células do sistema imunológico. Ele se liga a integrinas do tipo CD11a/CD18 ou CD11b/CD18 e também é explorado pelo rinovírus como um receptor para entrada no epitélio respiratório.

CASTAGNOLI *et al.* (1994) analisaram cicatrizes hipertróficas para a expressão de ICAM1 após injúria térmica de 10 a 40% de superfície corpórea queimada, de 10 pacientes, 3 mulheres e 7 homens, com idade de 23 a 60 anos. Como controle foram usadas pele de 6 pacientes desses pacientes submetidos a correção da cicatriz hipertrófica ou de 5 cicatrizes normotróficas. Por ensaio imunoenzimático, a expressão positiva de ICAM1 foi similar à de antígenos HLA classe 2 nas cicatrizes hipertrofiadas para queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Como a expressão concomitante de ICAM1 e HLA classe 2 por queratinócitos é sabida por aumentar suas propriedades de apresentação de antígenos e combate à infecção por microorganismos, o estudo sugere a possibilidade que

distúrbios ao processo normal de cicatrização e remodelamento de tecido podem estar relacionados a eventos imunológicos e resultam em cicatrizes hipertróficas. O estudo não refere em nenhum momento sobre quelóide, tema do presente estudo, é um estudo mais antigo e quando usado os descritores ICAM1 e quelóide aparecem somente dois artigos, um sendo sobre o fenômeno de Meyerson em Melanoma *in situ* e o outro artigo em chinês, ambos não disponíveis na íntegra para discussão.

JIANG *et al.* (2006) investigaram a influencia do comportamento biológico das células epiteliais nos folículos e glândulas sebáceas em quelóide. Analisaram ICAM1, HLA-DR e citoqueratina CK 14 nas células epiteliais e a atividade dos linfócitos T na periferia do quelóide e na pele por método histológico e imuno-histoquímica. Foi expresso fortemente ICAM1, HLA-DR e CK14 nas células epiteliais. Concluído que a reatividade com hiperplasia e imunoindução de celular epiteliais pode estar associada a destruição de algumas estruturas como folículos e glândulas nos quelóides.

Ressalta-se que pouco conhecimento existe sobre a expressão de ICAM1 na literatura e os achados no presente estudo mostraram a hipoexpressão que ocorre neste gene em amostras de quelóide de lóbulo de orelha sendo considerado um gene de interesse para estudos posteriores.

O gene *Toll like receptor 4*, TLR4, com *fold change* -3,4295, hipoexpresso no grupo quelóide codifica uma proteína transmembranar, membro da família de receptores do tipo TLR, que pertence à família de receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Sua ativação leva a uma via de sinalização intracelular NF- κ B e produção de citocinas

inflamatórias, responsável pela ativação do sistema imunológico inato e para o desenvolvimento da imunidade efetiva. Reconhece LPS, um componente presente em muitas bactérias Gram-negativas, e selecionar bactérias Gram-positivas. Seus ligantes também incluem várias proteínas virais, polissacarídeo e uma variedade de proteínas endógenas, como lipoproteína de baixa densidade, beta-defensinas e proteína de choque térmico. O TLR4 também foi designado como CD284 (*cluster* de diferenciação 284). O peso molecular do TLR4 é de aproximadamente 95 kDa.

CHEN *et al.* (2013) analisaram os efeitos de TLR4/7 na via de transdução de sinal *Smad* induzida por TGF- β em queiloide, obtiveram fragmentos de tecido de 10 pacientes (9 do sexo feminino) com queiloide (6 de lóbulo de orelha, um tórax, um no antebraço, um ombro e um desconhecido) e 5 pacientes (4 do sexo feminino) controle com cicatriz normal (3 de abdômen, e antebraço e 1 de antebraço) submetidos a cirurgia plástica. A metodologia constou de imuno-histoquímica, RT-PCR e *Western Blot*. A expressão de TLR4 estava aumentada nos fibroblastos de queiloide e de TLR7 estava diminuída nos fibroblastos de queiloide quando comparados a fibroblastos normais. Em resumo, os autores confirmaram que TLR4/TLR7 exerce seus efeitos no queiloide por diminuir *Smad7* e aumentar *Smad4* pela indução da via de transdução de sinal do TGF β . Segundo os autores, o TLR7 pode inibir a formação de cicatriz. Os resultados do presente estudo mostraram tanto o TLR4 como o TLR7 hipoexpressos, sendo que a metodologia foi diversa dos dois estudos, sendo ressaltado que o presente achado é para somente lóbulo de orelha.

O receptor *Toll-like 4* (TLR4) é uma proteína transmembranar expressa por células inflamatórias, fibroblastos, e queratinócitos. Liga-se a ligantes exógenos, como lipopolissacarídeo, e endógenos, como proteínas de choque térmico e fibronectina. Fisiologicamente, desempenha um papel como um biossensor de dano tecidual inflamação estéril para iniciar o reparo tecidual. No entanto, o TLR4 é superexpresso em fibrose patológica, como queloides, e aumenta a sinalização do fator TGF β , respostas de ativação e proliferação de fibroblastos. A interação entre HSP90 e TLR4 foi recentemente investigada em outros tecidos. A administração de HSP90 induziu a ativação do TLR4. Em contraste, a inibição específica da expressão de TLR4 suprimiu a sinalização induzida por HSP90 extracelular e migração celular associada. Existem evidências consistentes de uma estreita interação entre HSP90 e TLR4, sendo um co-fator importante no aparecimento das vias intracelulares do TLR4. Em uma condição de estresse, como cicatrização de feridas após cirurgia ou trauma, o aumento da HSP90 e a indução da sinalização do TLR4 podem induzir a ativação de fibroblastos, proliferação e migração, além de maior produção e capacidade de resposta ao TGF β . Como consequência, um laço auto-amplificador se desenvolve, sustentando tanto a proliferação e superprodução de colágeno (SEGRETO *et al.*, 2016).

O quelóide é definido como um crescimento excessivo dos tecidos fibrosos densos que se formam ao redor de uma ferida. O quelóide geralmente exhibe condições anóxicas e fator induzível por hipóxia 1α (HIF- 1α) é um fator central que medeia as respostas ao estresse por hipóxia e regula a atividade celular hipóxica e comportamentos biológicos. Dez casos de quelóide foram confirmados e o tecido sem a epiderme foi a

amostra com a correspondente pele normal adjacente, e foi realizada a cultura primária das amostras. Realizado experimentos em modelo de cultura em hipóxia, com transfecção de plasmados, isolamento de RNA e RT-PCR, *Western blot*, Elisa, imuno-histoquímica, e estudo *in vivo* em ratos atímicos. A expressão do HIF-1 α no tecido do quelóide foi significativamente maior do que no tecido normal da pele. Expressão de HIF-1 α induzida por hipóxia inibiu significativamente a apoptose celular e promoveu a proliferação celular em fibroblastos de quelóide, mas não em fibroblastos normais. Especificamente, o HIF-1 α ativou as vias TGF- β /*Smad* e TLR4 / MyD88 / NF- κ B e a interação dessas duas vias pode promover o desenvolvimento de quelóide. Além disso, experimentos *in vivo* mostraram que a inibição do HIF-1 α reduziu significativamente o crescimento de quelóide (LEI *et al.* 2019).

O gene Interleucina-18, IL18, com *fold change* -3,2736, hipoexpresso no grupo quelóide, também conhecido como fator indutor de interferon-gama, codifica uma proteína na qual corresponde a uma citocina pró-inflamatória. Muitos tipos de células, células hematopoiéticas e células não hematopoiéticas têm potencial para produzir IL-18. Foi descrito pela primeira vez em 1989 como um fator que induziu a produção de IFN- γ nas células do baço de camundongo. Originalmente, a produção de IL-18 era reconhecida em células de *Kupffer*, macrófagos residentes no fígado. No entanto, a IL-18 é expressa constitutivamente em células não hematopoiéticas, como células epiteliais intestinais, queratinócitos e células endoteliais. A IL-18 pode modular a imunidade inata e adaptativa e sua desregulação pode causar doenças autoimunes ou inflamatórias. Ela

aumenta a atividade das células NK nas células do baço, e estimula a produção de INF- γ em células Th1.

KÄMPFER *et al.* (1999) investigaram a regulação de IL18 durante o processo de reparo de lesões. Em pele não ferida foram observados altos níveis de mRNA de IL18, enquanto a proteína correspondente IL18 era expressa apenas em níveis basais baixos. Sob injúria, os pesquisadores encontraram uma rápida e grande indução da expressão da proteína IL18, o que está diretamente correlacionada a níveis de mRNA decrescentes na ferida. Análise histoquímica revelou diferentes sítios de expressão na área ferida com os queratinócitos como a fonte principal de produção de IL18. A rápida indução da IL18 durante o processo de cicatrização sugere um papel na fase de reparo inicial ao invés de um papel na coestimulação de INF- γ liberado pelas células T, o que está presente em níveis altos na ferida apenas no final da fase de inflamação do reparo.

A expressão e localização de IL-18 e seu receptor (IL-18R) foram investigados em tecidos normais da pele e de quelóide. 9 amostras de banco de células com linhagens celulares criopreservadas de fibroblastos e queratinócitos de queiloide, sem dados dos pacientes ou do tipo e localização do queiloide ou do doador de pele normal. Foi usado *Western blot*, Elisa, ensaio funcional para secreção de INF- γ e densitometria e imuno-histoquímica. Estudando ainda a expressão do sistema IL-18 em linhagens celulares normais e derivadas de queloides em um modelo de co-cultura, os resultados do *Western blot* e da imuno-histoquímica revelaram que a IL-18, expressão de IL-18Ra e IL-18Rb foi elevada no tecido do queiloide em comparação com o tecido cutâneo normal. Estudos

sobre a expressão de IL-18 e sua antagonista, proteína de ligação a IL-18 (IL-18BP), usando um modelo de cocultura, demonstraram grave desequilíbrio de IL-18BP em coculturas de fibroblasto e de queratinocitos de quelóide (KF/KK) com elevação significativa da IL-18 bioativa, enquanto os níveis de IL-18BP permaneceram os mesmos. Esta superprodução de IL-18 bioativa em coculturas de quelóides pode ser devida ao aumento da caspase-1 e diminuição da expressão da caspase-3 no tecido queloidiano, bem como a diminuição dos níveis de IL-10 solúvel observados nas coculturas de quelóides. Os importantes efeitos indutivos da IL-18 nas KFs foram ainda mais ressaltados pela observação de que a exposição do KF à IL-18 resultou em aumento da síntese de colágeno e componentes da MEC e aumento da secreção de citocinas profibróticas, como IL-6 e IL-8. Finalmente, a adição de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), a ativação de mitógenos proteína quinase (MAPK), especificidade da proteína 1 (Sp1) e alvo de mamíferos inibidores da rapamicina (mTOR) inibiram a secreção de IL-18 em coculturas de quelóides. Os autores demonstraram que o sistema IL-18 desempenha um papel importante papel em sua patogênese por meio de interações epiteliais-mesenquimais. Isso também sugere um potencial terapêutico dos inibidores de PI3K, MAPK, Sp1 e mTOR no tratamento de cicatrizes de quelóides (DO *et al.*, 2012).

Os quelóides são frequentemente descritos como tendo uma margem periférica em crescimento ativo com um centro em regressão. O objetivo do estudo foi examinar a possível heterogeneidade e o envolvimento de diferentes regiões dentro e ao redor dos quelóides usando um modelo *in vitro*. Foram construídos a partir de queratinócitos e fibroblastos da pele normal e de diferentes regiões dentro e ao redor de quelóides: periferia,

centro e regiões adjacentes da pele normal ao redor. Além disso, os fibroblastos foram isolados das regiões superficial central e profunda do quelóide e combinados com queratinócitos centrais. Todas as regiões apresentaram contração aumentada em comparação aos modelos normais de pele, principalmente nas regiões centrais. As amostras de pele foram oriundas de cirurgia estética, de 8 pacientes com idade de 20 a 59 anos, 2 homens, sendo 4 de abdome, 3 de mama e uma de perna com 3 de cor branca, 3 moreno escuro e duas sem referência. As amostras de quelóide foram de 8 pacientes, de 11 a 46 anos, somente um homem, sendo 2 brancos, 5 moreno escuro, 1 moreno e 1 moreno claro; a localização foi 2 de lóbulo de orelha, 1 de orelha, 1 de pescoço, 1 abdome, 1 de região esternal, 1 retroauricular e 1 região pubiana; e 2 com tratamento com corticoide, 3 submetidas a excisão e 5 sem tratamento. Ainda existiram amostras de pele normal ao redor do quelóide, com 5 amostras, 2 de região pubiana, 1 de região esternal, 1 de abdome e 1 de mama. Usado imuno-histoquímica, Elisa e PCR. Os miofibroblastos estavam presentes em todas as regiões dos quelóides, mas eram mais abundantes em modelos contendo fibroblastos de quelóides da profundidade central. A secreção de HGF anti-fibrótico e expressão do gene do colágeno IV da matriz extracelular foi reduzida no quelóide profundo central em comparação com a pele normal. Não foram observadas diferenças significativas entre as regiões periférica e central nos quelóides para a secreção de citocinas inflamatórias CCL20, CCL27, CXCL8, IL-6 e IL-18. Os parâmetros para a pele circundante mostraram semelhanças com a pele normal não lesionada e com o quelóide. Em conclusão, um método simples de cultivar queratinócitos e fibroblastos derivados de quelóides em um modelo

organotípico de cicatriz em 3 dimensões (3D) foi desenvolvido, com o duplo objetivo de estudar a patologia subjacente e, finalmente, testar novas terapêuticas. Neste estudo, esses modelos de cicatrizes de engenharia de tecidos mostram que a região quelóide central mostra um fenótipo de quelóide mais agressivo que a periferia e que a pele normal circundante também compartilha certas anormalidades características dos quelóides (LIMANDJAJA *et al.*, 2018).

ZHANG *et al.* (2016) analisaram o fator 1 do tipo quimiocina (CKLF-1) que é uma nova citocina na qual possui papel crucial nas respostas imunes e inflamatórias. O nível de expressão de CKLF-1 foi medido para avaliar a diferença entre pacientes com quelóides e pessoas sem quelóide. Foram coletadas 50 amostras de 30 pacientes: 10 pacientes quelóides (quelóide e pele normal); 10 pacientes com cicatrizes (cicatriz e pele normal); e 10 pacientes sem cicatrizes óbvias. Não é relatado no artigo as localizações das cicatrizes e quelóides. Os pacientes foram selecionados aleatoriamente entre os pacientes hospitalizados do *Peking Union Medical College Hospital* de setembro de 2013 a julho de 2015. Foram estabelecidos cinco grupos de amostras: amostras quelóides de pacientes quelóides (K); amostras de pele normal de pacientes quelóides (SK); amostras de cicatrizes de pacientes com cicatrizes (C); amostras normais de pele de pacientes com cicatrizes (SC); e amostras de pele normais de pacientes sem cicatrizes óbvias (S). A coloração com hematoxilina e eosina foi usada para observar alterações morfológicas. CKLF-1, IL-6, IL-8, IL-18 e TGF- β foram detectados por imuno-histoquímica e tecnologia de *Western blot*. A expressão do mRNA de CKLF-1 também foi medida pela RT-qPCR. Comparados ao grupo K, os outros 4 grupos apresentaram

infiltração inflamatória significativamente menor e menores níveis de expressão de CKLF-1, IL-6, IL-8, IL-18 e TGF- β . Entre os três grupos de pele normal, o nível de expressão de CKLF-1 foi significativamente maior no grupo KS do que no grupo CS ou S. A expressão do mRNA também foi óbvia nos grupos K e KS. A CKLF-1 e outros fatores inflamatórios foram superexpressos nas amostras de pacientes com queloides, indicando que a formação de queleide pode estar relacionada à inflamação e que a CKLF-1 pode desempenhar um papel importante nesse processo.

O gene antígeno leucocitário humano A, HLA-A com *fold change* -2,9796, hipoexpresso no grupo queleide, é um antígeno do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) específico para humanos. O HLA-A é um dos três principais tipos de receptores de superfície celular MHC classe I humana. Os outros são HLA-B e HLA-C. O receptor é um heterodímero e é composto por uma cadeia α pesada e uma cadeia β menor. A cadeia α é codificada por um gene variante HLA-A, e a cadeia β (β 2-microglobulina) é uma molécula invariante de β 2 microglobulina. A proteína β 2 microglobulina é codificada por uma região separada do genoma humano. Moléculas de MHC Classe I, como o HLA-A, fazem parte de um processo que apresenta polipeptídeos curtos para o sistema imunológico. Estes polipeptídeos têm tipicamente 7-11 aminoácidos de comprimento e originam-se de proteínas expressas pela célula. Existem duas classes de polipeptídeos que podem ser apresentados por uma proteína HLA: aquelas que deveriam ser expressas pela célula (auto) e as de derivação externa (não auto). Em condições normais, as células T citotóxicas, que normalmente patrulham o corpo no sangue, reconhecem o peptídeo apresentado pelo complexo. As células T, funcionando

adequadamente, só se ligam a peptídeos não próprios. Se a ligação ocorrer, uma série de eventos é iniciada, culminando na morte celular por apoptose. Dessa maneira, o corpo humano elimina todas as células infectadas por um vírus ou que expressam proteínas que não deveriam (por exemplo, células cancerígenas).

COHEN *et al.* (1979) analisaram o perfil HLA através de amostras de sangue obtidas de 25 pacientes com quelóide e de 19 sujeitos que não tiveram doença e não tinham histórico familiar de quelóide. Toda amostra foi de pacientes não brancos. Analisado também IgG e IgM do tecido de pele normal, cicatriz normal e de quelóide com e sem tratamento com triamcinolona. Também realizada a detecção de receptores de complemento, formação de rosetas de eritrócitos de ovelha e de rato. Não foram detectadas diferenças de incidência de antígenos HLA-A e B quando comparado aos 200 controles. Esse estudo sugeriu que existe uma resposta imune localizada envolvida na patogênese do quelóide, a qual não está relacionada a qualquer um dos *loci* de histocompatibilidade HLA-A e B, e sim relacionado ao aumento de IgG no tecido do quelóide. Os autores relatam que os achados suportam a hipótese de existência de uma base imunológica para a formação do quelóide.

LU *et al.* (2010) descrevem que quelóides são tumores dérmicos fibroproliferativos benignos de etiologia desconhecida. O conhecimento é de que o HLA humano pode potencializar o desenvolvimento do fenótipo do quelóide. Nenhum relatório foi publicado sobre alelos HLA classe I associados a quelóides em indivíduos chineses Han. Para investigar sua etiologia, o método da Reação em Cadeia da Polimerase em Sequência

Primer Específico (PCR-SSP) foi usado para analisar a distribuição dos alelos HLA classe I em 192 pacientes com queloides e 252 controles saudáveis em uma população chinesa Han. A idade dos pacientes variou de 2 a 70 anos, o queleide foi classificado como localização simples ou múltipla, sendo coletado sangue dos pacientes para as análises. As frequências do HLA-A *03 (6,77% vs 0%, pc 107), A *25 (10,16% vs 4,56%, pc 0,0111), B *07 (7,81% vs 2,58%, pc 0,0080) e Cw * 0802 (19,79% vs 10,32%, pc 0,0004) aumentaram significativamente no queleide dos pacientes, enquanto a frequência de HLA-A *01 (18,75% vs 38,10%, pc 107) diminuiu bastante em comparação com isso em controles saudáveis. O A *03-B *07, A *25-B *07, A *03-Cw * 0802, A * 25-Cw * 0802 e B * 07-Cw * 0802 foram encontrados como haplótipos de alto risco no desenvolvimento de quelóides neste estudo. Não foi encontrado nenhum haplótipo estendido significativamente relacionado aos queloides. Por meio de análise estratificada, a associação de subgrupos (único/múltiplo, gravidade e histórico familiar) de pacientes portadores de queloides com alelos específicos do HLA. Os dados do presente estudo sugerem que estes alelos podem ser genes de suscetibilidade a queloides ou podem estar em estreita ligação com os genes de suscetibilidade.

Conforme o exposto, os estudos sobre HLA-A mostram a importância da hipótese da etiopatogenia do queleide ser imunológica, não existindo estudo mostrando especificamente a expressão do HLA-A em comparação a outros grupos, sendo que o achado no presente estudo é um referencial para queleide de lóbulo de orelha, tornando-se um gene de interesse.

O gene *Fas ligand*, FASLG, com *fold change* -2,9045, hipoexpresso no grupo queiloide, é membro da superfamília do fator de necrose tumoral cuja principal função da proteína transmembrana codificada é a indução de apoptose desencadeada pela ligação à FAS. A via de sinalização FAS/FASLG essencial para a regulação do sistema imunológico, incluindo a morte celular induzida por ativação de células T e morte celular induzida por linfócitos T citotóxicos, tendo relação com a regulação do sistema imune e com a progressão do cancer.

A dinâmica de citocinas inflamatórias durante a cicatrização murina foi analisada por OHSHIMA (2000) nos níveis proteicos e de mRNA. FAS e seu ligante foram detectados imunohistoquimicamente em macrófagos e fibroblastos no processo de cicatrização da pele. O número de células expressando FAS e/ou FAS ligante atingiu seu pico 6 dias após a injúria. Portanto, foi considerado que a apoptose através de FAS e seu ligante pode ter papel importante na redução de células durante a fase proliferativa do processo de cicatrização murino.

MOULIN *et al.* (2004) isolaram e cultivaram miofibroblastos de cicatriz normal e de cicatriz hipertrófica e compararam seus níveis basais de apoptose e sua sensibilidade à ausência de soro e a apoptose induzida pelo anticorpo FAS obtida em fibroblastos dérmicos. Tratamento anti-FAS não modificou os níveis de apoptose, mas aumentou o crescimento celular em cicatriz hipertrófica em comparação a cicatriz normal. Esses resultados confirmaram a hipótese, segundo os autores, de defeitos na apoptose e no crescimento durante a formação de cicatrizes hipertróficas impedindo o desaparecimento de miofibroblastos ao final do processo de cicatrização.

WANG *et al.* (2013) investigaram se o miR-21, um microRNA específico implicado em múltiplos aspectos dos fibroblastos de queloide, e que afeta a expressão do ligante FAS (FASL) na presença do fator de crescimento transformador TGF β 1 através de PCR e verificou-se que os fibroblastos de tecido de queloide expressaram altos níveis de TGF- β 1 e miR-21 em comparação com fibroblastos normais da pele. Além disso, as células transfectadas com inibidor de TGF- β 1 ou inibidor de miR-21 mostraram aumentos significativos nos níveis de proteína FASL e no número de células apoptóticas em comparação com as células de controle enquanto o crescimento e migração celular diminuíram significativamente na qual é indicativo um mecanismo de interação entre TGF β 1 e miR-21 na regulação da proteína FASL envolvida na formação de queloide.

LIU *et al.* (2018) constataram que o miR-21 está regulado positivamente no tecido de queloide e afeta a proliferação e a apoptose de fibroblastos de queloide, além da diminuição do nível da proteína de FASL pela super expressão de miR-21, enquanto foi aumentado pela inibição de miR-21 em fibroblastos de queloide.

Os resultados dos estudos citados não são coincidentes, sendo que os achados de LIU *et al.* (2018) mostra que existe diminuição de FASL assim como no presente estudo.

O gene NFKBIA com *fold change* -2,6606, hipoexpresso no grupo queloide, codifica um membro da família do inibidor NF-kB que contém múltiplos domínios de repetição de anquirina. A proteína codificada interage com os dímeros REL para inibir os complexos NF-kB/REL que estão envolvidos nas respostas inflamatórias.

SONG *et al.* (2018) avaliaram a eficácia e o mecanismo da oxigenoterapia hiperbárica para reduzir a taxa de recorrência do queiloide onde 240 pacientes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos sendo um grupo de pacientes que recebeu oxigênio por câmara hiperbárica após excisão cirúrgica e radioterapia associada e um grupo que foi tratado apenas com excisão cirúrgica e radioterapia. Alguns fatores inflamatórios incluindo o NF-kB foram analisados por imuno-histoquímica e comparado entre os grupos. Verificou-se que os níveis de NF-kB no grupo tratado apenas com excisão cirúrgica e radioterapia estava aumentado em relação ao grupo que foi tratado com oxigênio indicando que o uso do oxigênio em conjunto reduz efetivamente a taxa de recorrência do queiloide após excisão cirúrgica e radioterapia, melhorando o nível de oxigênio do tecido e aliviando o processo inflamatório.

Não existem artigos focando em NFKBIA e queiloide, portanto o achado do presente estudo representa um gene de interesse para queiloide de lóbulo de orelha.

O gene mieloperoxidase MPO com *fold change* -2,3802, hipoexpresso no grupo queiloide, é uma enzima peroxidase que em humanos é codificada pelo gene MPO no cromossomo 17. A MPO é mais abundantemente expressa em granulócitos neutrófilos (um subtipo de glóbulos brancos) e produz ácidos hipo-halos para realizar sua atividade antimicrobiana. É uma proteína lisossômica armazenada em grânulos azurofílicos dos neutrófilos e liberada no espaço extracelular durante a degranulação. A mieloperoxidase de neutrófilos têm um pigmento heme, que causa sua cor verde em secreções ricas em neutrófilos, como pus e

algumas formas de muco. A cor verde contribuiu para seu nome desatualizado, verdoperoxidase.

Não existem artigos focando em MPO e queloide, portanto o achado do presente estudo representa um gene de interesse para queloide de lóbulo de orelha.

O gene *Toll like receptor 7*, TLR7, com *fold change* -2,1068, hipoexpresso no grupo queloide, codifica uma proteína membro da família de TLR que desempenha um papel fundamental no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata reconhecendo os PAMPs que são expressos em agentes infecciosos, e medeiam a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de imunidade efetiva.

Como já citado anteriormente, CHEN *et al.* (2013) demonstraram que o TLR7 pode inibir a formação de cicatriz. Os resultados do presente estudo para o TLR4 diferem à literatura, enquanto são compatíveis com os achados para o TLR7.

Para maior compreensão das *networks* e dos processos, é possível separá-los em três grupos nos quais permitem a associação dos processos e genes envolvidos. As *networks* 1 (Figura 4), 2 (Figura 5) e 3 (Figura 6) compõem um grupo no qual diz respeito às respostas de defesa, respostas a estímulos externos e processos do sistema imunológico.

Nesse primeiro grupo, observa-se intensa atividade dos fatores de transcrição, principalmente STAT3 e NF-κB regulando receptores de membrana e ligantes extracelulares intensamente correlacionados com processos de defesa do sistema imunológico e a inflamação. A hipoexpressão dos genes codificadores desses receptores e ligantes afeta de

forma importante as redes aqui estudadas. É possível que essa hipoexpressão esteja levando a um desbalanço desses processos, o que leva a formação e desenvolvimento do queloide. Intervir nessas vias por estímulos ou inibição de alguma sinalização seria uma opção para o tratamento dessa doença. Como exemplo de gene para intervenção, temos os receptores HLA-A, TLR7, TLR4, ICAM-1, TLR-6, CD8A da rede da Figura 6; os ligantes FasL, IL-18, IL-8 e IL-13 na rede da Figura 7; e receptores de membranas CD8A, TLR7, TLR4, ICAM-1 e ligantes extracelulares FasL, IL-13, IL-1 α , IL-18, CD40L da rede da Figura 8.

Segundo, seria importante analisar a rede 4 (Figura 7) na qual está totalmente envolvida com a apoptose. Nessa rede é possível compreender a importância do Fas e ligantes e receptores e a imersão deles no processo de morte programada da célula.

Foi demonstrado que baixos níveis de expressão do Fas sinalizam proliferação enquanto altos níveis de expressão do Fas sinalizam apoptose em fibroblastos humanos (FREIBERG *et al.*, 1997). Fibroblastos de queloide também apresentam expressão diminuída de genes relacionados a apoptose (MESSADI *et al.*, 1999).

De acordo com estudo de LU *et al.* (2007), queloides são significativamente resistentes a apoptose mediada pelo Fas em comparação com cicatrizes hipertróficas e peles normal. A anormalidade na apoptose mediado pelo Fas poderia ser responsável pelo desbalanço entre proliferação e apoptose no queloide. Além disso, a apoptose mediará uma queda na celularidade durante a transição entre o tecido de granulação e a cicatriz (CHODON *et al.*, 2000).

Na rede desenvolvida pelo *software*, obtida de bibliotecas de vias canônicas, observa-se a importante correlação do FASLG ao processo de apoptose. Sua hipoexpressão poderia estar envolvida com defeitos no sistema de morte programada e conseqüentemente o não remodelamento do tecido, essencial no processo de cicatrização.

Já as *networks* 5 e 6 (Figuras 8 e 9), estão intimamente relacionados com as vias de processamento e apresentação de antígenos, regulação de ativação de células T, regulação de adesão de leucócitos célula-célula, regulação de adesão homotípica célula-célula.

Apesar da formação do queloide ainda ser parcialmente desconhecida, diversos estudos sugerem que fatores sistêmicos, mecânicos, genéticos, epigenéticos e locais podem contribuir para o desenvolvimento e/ou crescimento do queloide. TSAI & OGAWA (2019), realizaram uma revisão para permitir um melhor entendimento dos estudos que temos disponíveis na literatura associados ao queloide e concluíram que pesquisas moleculares e celulares ainda são necessárias para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas. Existem diversas terapias descritas e diversos autores que já relacionaram com a formação de um câncer cutâneo benigno devido sua apresentação fenotípica e características específicas (TAN, KHUMALO, BAYAT; 2019) porém há diversos fatores interferentes no processo de cicatrização e participação do sistema imunológico que ainda necessitam de embasamento.

Avanços no entendimento da biologia molecular promoveriam o uso de ferramentas para auxiliar nesses achados e mostram-se promissores para estudos futuros. Atualmente, o papel potencial dos mecanismos

moleculares na formação do quelóide ainda permanece incerto, porém vários estudos atuais apoiam o envolvimento de miR, Ácido ribonucleico longo não codificado (lncRNA) e outros tipos de RNA (WANG *et al.*, 2019a; WANG *et al.*, 2019b; JIAN *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos no presente estudo são de grande importância pois possibilitam iniciar a construção de um perfil gênico inicial relacionado à imunidade na formação do quelóide de lóbulo de orelha especificamente, além de possibilitar a discussão do envolvimento direto do sistema imunológico e seu papel na cicatrização.

Existem várias limitações dentro do presente estudo, sendo que o uso de um único método de análise RT-PCR *array* com placa produzida pela empresa com os genes mais comuns dentro do processo de imunidade, assim como a realização do *pool* pode apresentar críticas e ainda a necessidade de realização de novos projetos com outras análises para a confirmação dos dados obtidos.

Como perspectivas, existe a necessidade de coleta de sangue que é muito importante para a análise da imunidade no quelóide. Deve ser realizada a análise de quelóide submetido a tratamentos, pois esse estudo somente analisou quelóide de lóbulo de orelha não tratado. Também é necessário o estudo de novas localizações e tipos diferentes de quelóide. O uso da cicatriz de aspecto normal para controle para comparar ao quelóide. Por fim, a realização de sequenciamento de fragmentos de tecido de quelóide separado por diferentes tipos e localizações para termos um mapa completo do quelóide.

7. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Dos 84 genes relacionados a imunidade, 20 genes (24%) foram diferencialmente expressos sendo 100% hipoexpressos no queiloide de lóbulo de orelha; e os genes de maior interesse desse perfil inicial da imunidade foram CXCR3, MX1, FOXP3, SLC11A1, TICAM1, TLR6, ITGAM, IL-8, IL-13, CD40LG, IL1A, ICAM1, TLR4, IL-18, HLA-A, FASLG, NFKBIA, MPO, CD8A e TLR7.

8. REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ashcroft KJ, Syed F, Bayat A. Site-specific keloid fibroblasts alter the behaviour of normal skin and normal scar fibroblasts through paracrine signalling. *PLoS One*. 2013 Dec 9;8(12):e75600.

Abdou AG, Maraee AH, Saif HF. Immunohistochemical evaluation of COX-1 and COX-2 expression in keloid and hypertrophic scar. *Am J Dermatopathol*. 2014 Apr;36(4):311-7.

Arbi S, Eksteen EC, Oberholzer HM, Taute H, Bester MJ. Premature collagen fibril formation, fibroblast-mast cell interactions and mast cell-mediated phagocytosis of collagen in keloids. *Ultrastruct Pathol*. 2015 Apr;39(2):95-103.

Bansal V, Tewhey R, Leproust EM, Schork NJ. Efficient and cost effective population resequencing by pooling and in-solution hybridization. *PLoS One*. 2011 Mar 30;6(3):e18353.

Berman B, Maderal A, Raphael B. Keloids and hypertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment. *Dermatol Surg*. 2017 Jan;43(1):S3-S18.

Bran GM, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis . *Int J Mol Med*. 2009 Sep;24(3):283-93.

Boyce DE, Ciampolini J, Ruge F, Murison MS, Harding KG. Inflammatory-cell subpopulations in keloid scars. *Br J Plast Surg*. 2001 Sep;54(6):511-6.

Brown JJ, Bayat A. Genetic susceptibility to raised dermal scarring. *Br J Dermatol*. 2009; 161:8.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S.

Boulougouris X, Rogiers C, Van Poucke M, De Spiegeleer B, Peelman LJ, Duchateau L, Burvenich C. Distinct neutrophil C5a receptor inflammatory events in cows initiated by chemoattractant C5a and lipopolysaccharide

around parturition and in mid lactation. *J Dairy Sci.* 2019 Feb;102(2):1457-72.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffi MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.

Campaner AB, Ferreira LM, Gragnani A, Bruder JM, Cusick JL, Morgan JR. Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol.* 2006 May;126(5):1168-76.

Campbell JD, Gangur V, Simons FE, HayGlass KT. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3 ligand-mediated Th1 immunity-promoting loop. *FASEB J.* 2004 Feb;18(2):329-31.

Canady J, Arndt S, Karrer S, Bosserhoff AK. Increased KGF expression promotes fibroblast activation in a double paracrine manner resulting in cutaneous fibrosis. *J Invest Dermatol.* 2013a Mar;133(3):647-57.

Canady J, Karrer S, Fleck M, Bosserhoff AK. Fibrosing connective tissue disorders of the skin: molecular similarities and distinctions. *J Dermatol Sci.* 2013b;70(3):151-8.

Castagnoli C, Stella M, Magliacani G, Ferrone S, Richiardi PM. Similar ectopic expression of ICAM-1 and HLA class II molecules in hypertrophic scars following thermal injury. *Burns.* 1994 Oct;20(5):430-3.

Chen J, Zeng B, Yao H, Xu J. The effect of TLR4/7 on the TGF- β -induced Smad signal transduction pathway in human keloid. *Burns.* 2013 May;39(3):465-72.

Chen Z, Zhou L, Won T, Gao Z, Wu X, Lu L. Characterization of CD45RO(+) memory T lymphocytes in keloid disease. *Br J Dermatol.* 2018a Apr;178(4):940-50.

Chen ZY, Yu XF, Huang JQ, Li DL. The mechanisms of β -catenin on keloid fibroblast cells proliferation and apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018b Feb;22(4):888-95.

Chen Y, Jin Q, Fu X, Qiao J, Niu F. Connection between T regulatory cell enrichment and collagen deposition in keloid. *Exp Cell Res.* 2019;383(2):111549.

Chike-Obi CJ, Cole PD, Brissett AE. Keloids: Pathogenesis, Clinical Features, and Management. *Seminars in Plastic Surgery.* 2009;23(3):178-84.

Chodon T, Sugihara T, Igawa HH, Funayama E, Furukawa H. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol.* 2000 Nov;157(5):1661-9.

Cohen IK, McCoy BJ, Mohanakumar T, Diegelmann RF. Immunoglobulin, complement, and histocompatibility antigen studies in keloid patients. *Plast Reconstr Surg.* 1979 May;63(5):689-95.

Cumming G, Fidler F, Vaux DL. Error bars in experimental biology. *J Cell Biol.* 2007 Apr 9;177(1):7-11.

Diaz A, Tan K, He H, Xu H, Cueto I, Pavel AB, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Keloid lesions show increased IL-4/IL-13 signaling and respond to TH2-targeting dupilumab therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019 Nov 20.

Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol.* 2013 Dec 15;25(6):469-84.

Do DV, Ong CT, Khoo YT, Carbone A, Lim CP, Wang S, Mukhopadhyay A, Cao X, Cho DH, Wei XQ, Bellone G, Lim I, Phan TT. Interleukin-18 system plays an importante role in keloid pathogenesis via epithelial-mesenchymal interactions. *Br J Dermatol.* 2012 Jun;166(6):1275-88.

Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, Krilis SA, Stevens RL. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol.* 2014; 122:211-52.

Eming SA, Hammerschmidt M, Krieg T, Roers A. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2009 Jul;20(5):517-27.

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

Freiberg RA, Spencer DM, Choate KA, Duh HJ, Schreiber SL, Crabtree GR, Khavari PA. Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1997 Feb; 108(2):215-9.

Fujita M, Yamamoto Y, Jiang JJ, Atsumi T, Tanaka Y, Ohki T, Murao N, Funayama E, Hayashi T, Osawa M, Maeda T, Kamimura D, Murakami M. NEDD4 Is Involved in Inflammation Development during Keloid Formation. *J Invest Dermatol.* 2019 Feb;139(2):333-41.

Furtado F, Hochman B, Ferrara SF, Dini GM, Nunes JM, Juliano Y, Ferreira LM. What factors affect the quality of life of patients with keloids? *Rev Assoc Med Bras.* 2009 Nov-Dec;55(6):700-4.

Galoian K, Abrahamyan S, Chailyan G, Qureshi A, Patel P, Metser G, Moran A, Sahakyan I, Tumasyan N, Lee A, Davtyan T, Chailyan S, Galoyan A. Toll like receptors TLR1/2, TLR6 and MUC5B as binding interaction partners with cytostatic proline rich polypeptide 1 in human chondrosarcoma. *Int J Oncol.* 2018 Jan;52(1):139-54.

Gauglitz, GG. Hypertrophic scarring and keloids following burn injuries. Wolters Kluwer, 2017 Nov; 18.

Ghoreishi M, Vera Kellet C, Dutz JP. Type 1 IFN-induced protein MxA and plasmacytoid dendritic cells in lesions of morphea. *Exp Dermatol.* 2012 Jun;21(6):417-9.

Goldstein BG, Goldstein AO. Keloids and hypertrophic scars. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Acesso em 10/01/2020).

González N, Goldberg DJ. Update on the Treatment of Scars. *J Drugs Dermatol.* 2019;18(6):550.

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

Gragnani A, Cezillo MVB, Silva IDCG, Noronha SMR, Correa-Noronha SAA, Ferreira LM. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. *Burns.* 2014;40(5):947-56.

Harunari N, Zhu KQ, Armendariz RT, et al. Histology of the thick scar on the female, red Duroc pig: Final similarities to human hypertrophic scar. *Burns.* 2006;32(6):669-77.

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

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):185-9.

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

Hong Y, Zhou L, Xie H, Zheng S. Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Aug 7;463(4):719-25

Huang C, Akaishi S, Hyakusoku H, Ogawa R. Are keloid and hypertrophic scar different forms of the same disorder? A fibroproliferative skin disorder hypothesis based on keloid findings. *Int Wound J.* 2014 Oct;11(5):517-22.

Huen AC, Wells A. The Beginning of the End: CXCR3 Signaling in Late-Stage Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012 Dec;1(6):244-8.

Hultman CS, Yoshida S. Laser therapy for hypertrophic scars and keloids. In: UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA. (Acesso em 04/05/2019).

Jian X, Qu L, Wang Y, et al. Trichostatin A-induced miR-30a-5p regulates apoptosis and proliferation of keloid fibroblasts via targeting BCL2. *Mol Med Rep.* 2019;19(6):5251–62.

Jiang DY, Fu XB, Sheng ZY, Chen W, Sun TZ. Relationship between the proliferation and immunoinduction of epithelial cells and the destruction of hair follicles and sebaceous glands in keloids. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi.* 2006 Mar;22(2):106-8.

Jiao H, Fan J, Cai J, Pan B, Yan L, Dong P, Zong X, Gan C, Xiao R. Analysis of Characteristics Similar to Autoimmune Disease in Keloid Patients. *Aesthetic Plast Surg.* 2015 Oct;39(5):818-25.

Jin Q, Gui L, Niu F, Yu B, Lauda N, Liu J, Mao X, Chen Y. Macrophages in keloid are potent at promoting the differentiation and function of regulatory T cells. *Exp Cell Res.* 2018 Jan 15;362(2):472-6.

Khan FA, Drucker NA, Larson SD, Taylor JA, Islam S. Pediatric earlobe keloids: Outcomes and patterns of recurrence [published online ahead of print, 2019 Jul 24]. *J Pediatr Surg.* 2019;S0022-3468(19)30460-9.

Kämpfer H, Kalina U, Mühl H, Pfeilschifter J, Frank S. Counterregulation of interleukin-18 mRNA and protein expression during cutaneous wound repair in mice. *J Invest Dermatol.* 1999 Sep;113(3):369-74.

Kuwatsuka Y, Murota H. Involvement of Periostin in Skin Function and the Pathogenesis of Skin Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1132:89–98.

Lazic SE. The problem of pseudoreplication in neuroscientific studies: is it affecting your analysis? *BMC Neurosci.* 2010; Jan14; 11:5.

Lei R, Li J, Liu F, Li W, Zhang S, Wang Y, Chu X, Xu J. HIF-1 α promotes the keloid development through the activation of TGF- β /Smad and TLR4/MyD88/NF- κ B pathways. *Cell Cycle.* 2019;18(23):3239-50.

Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, et al. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns*. 2004;30(1):57–64.

Lim CP, Phan TT, Lim IJ, Cao X. Cytokine profiling and Stat3 phosphorylation in epithelial-mesenchymal interactions between keloid keratinocytes and fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2009 Apr;129(4):851-61.

Limandjaja GC, van den Broek LJ, Waaijman T, Breetveld M, Monstrey S, Scheper RJ, Niessen FB, Gibbs S. Reconstructed human keloid models show heterogeneity within keloid scars. *Arch Dermatol Res*. 2018;310(10):815-26.

Liu Y, Ren L, Liu W, Xiao Z. MiR-21 regulates the apoptosis of keloid fibroblasts by caspase-8 and the mitochondria-mediated apoptotic signaling pathway via targeting FasL. *Biochem Cell Biol*. 2018 Oct;96(5):548-55.

Loser K, Beissert S. Regulatory T cells: banned cells for decades. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):864-71.

Love PB, Kundu RV. Keloids: an update on medical and surgical treatments. *J Drugs Dermatol*. 2013 April;12(4):403-9.

Lu F, Gao J, Ogawa R, Hyakusoku H, Ou C. Fas-mediated apoptotic signal transduction in keloid and hypertrophic scar. *Plast Reconstr Surg*. 2007 May;119(6):1714-21.

Lu WS, Cai LQ, Wang ZX, Li Y, Wang JF, Xiao FL, Quan C, He SM, Yang S, Zhang XJ. Association of HLA class I alleles with keloids in Chinese Han individuals. *Hum Immunol*. 2010 Apr;71(4):418-22.

Luo L, Li J, Liu H, Jian X, Zou Q, Zhao Q, Le Q, Chen H, Gao X, He C. Adiponectin Is Involved in Connective Tissue Growth Factor-Induced Proliferation, Migration and Overproduction of the Extracellular Matrix in Keloid Fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2017 May 12;18(5).

Maeda D, Kubo T, Kiya K, et al. Periostin is induced by IL-4/IL-13 in dermal fibroblasts and promotes RhoA/ROCK pathway-mediated TGF- β 1

secretion in abnormal scar formation. *J Plast Surg Hand Surg.* 2019;53(5):288–94.

Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology.* 2011 Jul;216(7):753-62.

Mantel A, Newsome A, Thekkudan T, Frazier R, Katdare M. The role of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3)-mediated prostaglandin D2 (PGD2) metabolism in keloids. *Exp Dermatol.* 2016 Jan;25(1):38-43.

Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Apr 29;60(7):805-12.

McCarty SM, Syed F, Bayat A. Influence of the human leukocyte antigen complex on the development of cutaneous fibrosis: an immunogenetic perspective. *Acta Derm Venereol.* 2010 Nov;90(6):563-74.

Messadi DV, Le A, Berg S, Jewett A, Wen Z, Kelly P, Bertolami CN. Expression of apoptosis-associated genes by human dermal scar fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 1999 Nov-Dec;7(6):511-7.

Mistry A, Savic S, van der Hilst JCH. Interleukin-1 Blockade: An Update on Emerging Indications. *BioDrugs.* 2017 Jun;31(3):207-21.

Moulin V, Laroche S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Vallé CA, Roy M. Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *J Cell Physiol.* 2004 Mar;198(3):350-8.

Murao N, Seino K, Hayashi T, Ikeda M, Funayama E, Furukawa H, Yamamoto Y, Oyama A. Treg-enriched CD4⁺ T cells attenuate collagen synthesis in keloid fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2014 Apr;23(4):266-71.

Nguyen JK, Austin E, Huang A, Mamalis A, Jagdeo J. The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets. *Arch Dermatol Res.* 2019.

Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J Pathol.* 2001; 194(2):207-16.

Nishino M, Ikegami H, Fujisawa T, Kawaguchi Y, Kawabata Y, Shintani M, Ono M, Ogihara T. Functional polymorphism in Z-DNA-forming motif of promoter of SLC11A1 gene and type 1 diabetes in Japanese subjects: association study and meta-analysis. *Metabolism*. 2005 May;54(5):628-33.

Noishiki C, Hayasaka Y, Ogawa R. Sex Differences in Keloidogenesis: An Analysis of 1659 Keloid Patients in Japan. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2019;9(4):747–54.

Ohshima T. The dynamics of cytokines and their related substances in skin wounds. *Nihon Hoigaku Zasshi*. 2000 Nov;54(3):346-55.

Oriente A, Fedarko NS, Pacocha SE, Huang SK, Lichtenstein LM, Essayan DM. Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Mar;292(3):988-94.

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 Jul 7;11:1383-93.

Park G, Yoon BS, Moon JH, Kim B, Jun EK, Oh S, Kim H, Song HJ, Noh JY, Oh C, You S. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate suppresses collagen production and proliferation in keloid fibroblasts via inhibition of the STAT3-signaling pathway. *J Invest Dermatol*. 2008 Oct;128(10):2429-41.

Potter DA, Veitch D, Johnston GA. (2019). Scarring and wound healing. *Brit J Hosp Med*. 2019;80(11):C166–71.

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.

Robles DT, Berg D. Abnormal wound healing: keloids. *Clin Dermatol* 2007; 25:26.

Roerink ME, van der Schaaf ME, Dinarello CA, Knoop H, van der Meer JW. Interleukin-1 as a mediator of fatigue in disease: a narrative review. *J Neuroinflam*. 2017 Jan 21;14(1):16.

Segreto F, Marangi GF, Gigliofiorito P, Briganti F, Persichetti P. HSP90 and TLR4 Interplay in Keloids. *Plast Reconstr Surg*. 2016;137(2):480e–1e.

Seya T, Matsumoto M, Ebihara T, Oshiumi H. Functional evolution of the TICAM-1 pathway for extrinsic RNA sensing. *Immunol Rev*. 2009 Jan;227(1):44-53.

Smith JC, Boone BE, Opalenik SR, Williams SM, Russell SB. Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J Invest Dermatol*. 2008 May;128(5):1298-310.

Song H, Liu T, Wang W, et al. Tension enhances cell proliferation and collagen synthesis by upregulating expressions of integrin $\alpha\beta 3$ in human keloid-derived mesenchymal stem cells. *Life Sci*. 2019; 219:272–82.

Song KX, Liu S, Zhang MZ, Liang WZ, Liu H, Dong XH, Wang YB, Wang XJ. Hyperbaric oxygen therapy improves the effect of keloid surgery and radiotherapy by reducing the recurrence rate. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2018 Nov.;19(11):853-62.

Su H, Rei N, Zhang L, Cheng J. Meta-analyses of IL1A polymorphisms and the risk of several autoimmune diseases published in databases. *PLoS One*. 2018 Jun 7;13(6):e0198693.

Tan S, Khumalo N, Bayat A. Understanding Keloid Pathobiology From a Quasi-Neoplastic Perspective: Less of a Scar and More of a Chronic Inflammatory Disease With Cancer-Like Tendencies. *Front Immunol*. 2019; 10:1810. Published 2019 Aug 7.

Tanaka R, Umeyama Y, Hagiwara H, Ito-Hirano R, Fujimura S, Mizuno H, Ogawa R. Keloid patients have higher peripheral blood endothelial progenitor cell counts and CD34(+) cells with normal vasculogenic and angiogenic function that overexpress vascular endothelial growth factor and interleukin-8. *Int J Dermatol*. 2019 Jul 9.

Tsai CH, Ogawa R. Keloid research: current status and future directions. *Scars Burn Heal*. 2019.

Vaux DL, Fidler F, Cumming G. Replicates and repeats – What is the difference and is it significant? A brief discussion of statistics and experimental design. *EMBO Rep.* 2012;13(4):291-6.

Vaux DL. Know when your numbers are significant. *Nature.* 2012; 492:180.

Vaux DL. Basic statistics in cell biology. *An Rev Cell Dev Biol.* 2014; 30:23-37.

Verstak B, Stack J, Ve T, Mangan M, Hjerrild K, Jeon J, Stahl R, Latz E, Gay N, Kobe B, Bowie AG, Mansell A. The TLR signaling adaptor TRAM interacts with TRAF6 to mediate activation of the inflammatory response by TLR4. *J Leukoc Biol.* 2014 Sep;96(3):427-36.

Wang J, Wu H, Xiao Z, Dong X. Expression Profiles of lncRNAs and circRNAs in Keloid. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2019b;7(6): e2265.

Wang R, Bai Z, Wen X, et al. MiR-152-3p regulates cell proliferation, invasion and extracellular matrix expression through by targeting FOXF1 in keloid fibroblasts. *Life Sci.* 2019a; 234:116779.

Wang X, Liu Y, Chen X, Zhang M, Xiao Z. Impact of MiR-21 on the expression of FasL in the presence of TGF- β 1. *Aesthet Surg J.* 2013 Nov 1;33(8):1186-98.

Wu J, Fang L, Cen Y, Qing Y, Chen J, Li Z. MiR-21 Regulates Keloid Formation by Downregulating Smad7 via the TGF- β /Smad Signaling Pathway. *J Burn Care Res.* 2019 Oct;40(6):809-17.

Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol.* 2013 Aug;22(8):507-10.

Yates CC, Krishna P, Whaley D, Bodnar R, Turner T, Wells A. Lack of CXC chemokine receptor 3 signaling leads to hypertrophic and hypercellular scarring. *Am J Pathol.* 2010 Apr;176(4):1743-55.

Zhang M, Xu Y, Liu Y, Cheng Y, Zhao P, Liu H, Wang Y, Ma X. Chemokine-Like Factor 1 (CKLF-1) is Overexpressed in Keloid Patients:

A Potential Indicating Factor for Keloid-Predisposed Individuals. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Mar;95(11): e3082.

Zhang Q, Cai L, Wang M, Ke X, Zhao X, Huang Y. Identification of a novel mutation in the mechanoreceptor-encoding gene CXCR1 in patients with keloid. *Arch Dermatol Res*. 2018 Sep;310(7):561-6.

Zhang Z, Nie F, Chen X, et al. 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. *Mol Med Rep*. 2015;11(2):857–64.

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

- Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman & Hall; 1991.
- Comitê de Ética em Pesquisa [internet]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM); [citado 2013 Jan 27]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica/>
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir. Bras. 2005;20(2):2-9.
- Passari LMZG, Soares PK, Bruns RE, Scarminio IS. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. Química Nova. 2011;34(5):888-92.

NORMAS ADOTADAS

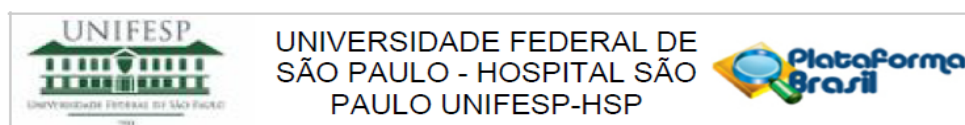
NORMAS ADOTADAS

- Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) [Internet]. São Paulo: Biblioteca Regional de Medicina (Bireme) – citado 2019 Dez 27. Disponível em: <http://decs.bvs.br>
- Ferreira LM. Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático. 1ed. São Paulo: RED, 2017. 118p.
- Houaiss A. Minidicionário Houaiss da Língua Portuguesa. 4 ed. Rio de Janeiro: Objetiva, 2010. 920p.
- Ledur PF. Guia Prático da nova ortografia: as mudanças do Acordo Ortográfico. 7ed. Porto Alegre: AGE, 2009. 95p.
- Resolução nº. 196/96: Pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília: Ministério da Saúde – 1996 [citado 2018 Dez 27]. Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/1996/Reso196.doc>
- Sistema Internacional de Unidades [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro) – 2012 – citado 2018 Dez 27. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/si_versao_final.pdf

APÊNDICE

APÊNDICE 1

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO GÊNICA DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM QUELOIDE

Pesquisador: ALFREDO GRAGNANI FILHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56920716.8.0000.5505

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.681.967

Apresentação do Projeto:

Trata-se de respostas de pendências apontadas no parecer inicial

Nº CEP: 0785/2016

Queloides é uma lesão dérmica que ultrapassa a margem da lesão original, que continua a crescer com o tempo e não regride espontaneamente. Aparece mais frequentemente em certas regiões anatômicas que foram submetidas a trauma na pele. Após uma injúria, inicia-se um processo de reparo imediato e consistente que leva à formação de cicatriz. Quando há distúrbio no balanço do processo de reparação, a cicatrização pode ser afetada, resultando na formação de queloides. Esse processo está associado a diversos fatores da imunidade, como citocinas, fatores de crescimento, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Assim, abre-se uma nova perspectiva de patogênese do queloides, a qual envolve uma resposta imune anormal às injúrias dérmicas. Dadas as correlações entre o processo imune e a formação do queloides é importante estudar o perfil de genes relacionados à resposta imune inata e adquirida de pacientes com queloides em áreas específicas, como lóbulo da orelha.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão de 84 genes mediadores da resposta inata e adaptativa através de PCR Array em fragmento de queloides.

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

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: cepunifesp@unifesp.br

ANEXO

Siglas MetaCore®

	metaloprotease		proteína ligadora genérica		fosfatase genérica
	alfa-G				proteína fosfatase
	superfamília RAS		receptor de ligação		lipídio fosfatase
	canal genérico		glicoproteína de membrana celular		fosfatase genérica
	canal iônico acoplado ao ligante		fator de transcrição		protease genérica
	canal iônico acoplado à voltagem		composto ou molécula		transportador
	metabólito previsto		ion inorgânico		receptor genérico
	reação				GPCR
	adaptador				receptor com atividade enzimática