

**DAYANNE MAYER NEVES RODRIGUES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE  
NEUROTRANSMISSORES EM QUELOIDE DE  
LÓBULO DE ORELHA**

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

SÃO PAULO  
2020

**DAYANNE MAYER NEVES RODRIGUES**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE  
NEUROTRANSMISSORES EM QUELOIDE DE  
LÓBULO DE ORELHA**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alfredo Gragnani Filho

SÃO PAULO  
2020



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

Coordenação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Gragnani Filho

Rodrigues, Dayanne Mayer Neves

**Expressão gênica de receptores de neurotransmissores em queiloide de lóbulo de orelha.**/ Dayanne Mayer Neves Rodrigues. -- São Paulo,2020.

xviii, 69f.

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

Titulo em inglês: *Gene expression of neurotransmitters receptors in earlobe keloid.*

Palavras-chave de acordo com DeCs

1. Expressão Gênica; 2. Receptores de neurotransmissores; 3. Queiloide

## DEDICATÓRIA

Primeiramente à **DEUS** por mostrar a rica experiência que a vida me proporcionou e continua proporcionando.

Aos meus pais, **EDNA FABIANA MAYER NEVES** e **CARLOS ROBERTO BRAGUIM NEVES** que são a minha maior razão de ter chegado até aqui. Sempre sendo meu alicerce.

Ao meu esposo, **YAGO RODRIGUES NASCIMENTO**, por dar suporte e motivação nos momentos mais difíceis.

Ao meu avô, **PEDRO BERNADO DE ALMEIDA** (*in memoriam*), por ensinar que os grandes valores da vida são mais simples do que imaginamos e o quão forte podemos ser mesmo quando não acreditamos sermos mais fortes. Meu eterno herói sem capa.

A todos os meus familiares e amigos, em especial, **NATHALIA MAYER, DANIELA ALMEIDA, RODRIGO TURATO, LUCAS ALCOFORADO, RAQUEL PAGUANIM, DANIELLE TAFNER, JACQUELINE LEITE, MARILIA BAENINGER**, que de alguma forma incentivaram em continuar acreditando em mim mesma quando tudo parecia perdido e por ter partilhado os melhores conselhos.

## **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) e COORDENADORA do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional, pela oportunidade acadêmica, estímulo à minha formação científica, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Ao **PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO**, PROFESSOR ASSOCIADO LIVRE-DOCENTE da Disciplina de Cirurgia Plástica, pela sua atenção, estímulo constante e orientação em todos os estudos realizados neste Programa.

Ao **PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO**, PROFESSOR ASSOCIADO LIVRE-DOCENTE da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, orientador do presente estudo, por ter me acolhido nesta jornada e por toda a sua atenção e dedicação nesta orientação. Eterna gratidão pela oportunidade de aprendizado.

À **PROFESSORA SILVANA APARECIDA ALVES CORREA** e ao **PROFESSOR SAMUEL MARCOS CORREA DE NORONHA**, pelo suporte para obtenção dos resultados do presente estudo e por compartilhar seus conhecimentos com muita clareza.

Aos **PACIENTES**, que participaram desse estudo, por viabilizarem a evolução do conhecimento na área e o aperfeiçoamento no tratamento do queiloide.

**Ao Dr. FELIPE CONTOLI ISOLDI e aos MÉDICOS**

**RESIDENTES** pelos atos operatórios na Casa da Cirurgia Plástica que tornaram possível a obtenção das amostras de queiloide para a realização do presente estudo.

**À TURMA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUACAO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL** pelas sugestões para prosseguir com o presente estudo.

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

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

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)



# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA .....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
LISTA DE TABELAS E QUADROS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XII
RESUMO .....	XVII
<i>ABSTRACT</i> .....	XVIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA .....	8
4. MÉTODO.....	18
5. RESULTADOS .....	28
6. DISCUSSÃO .....	37
7. CONCLUSÃO .....	50
8. REFERÊNCIAS.....	52
9. FONTES CONSULTADAS .....	57
10. NORMAS ADOTADAS .....	59
11. APÊNDICES .....	61
12. ANEXOS .....	71

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Painel de 84 genes humanos relacionados aos neurotransmissores e receptores presentes na placa de PCR <i>Array</i> (PAHS-060Z) .....	24
<b>Quadro 2</b> - Dados de média de idade e gênero dos pacientes incluídos no estudo e que compõe o Banco de RNA e de fragmentos de queiloide.....	29
<b>Quadro 3</b> - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo controle obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.....	29
<b>Quadro 4</b> - Concentração das soluções de RNA provenientes de pacientes do grupo queiloide obtidas por meio de espectrofotometria após purificação das amostras.....	30
<b>Tabela 1</b> - Genes diferencialmente expressos em relação aos receptores de neurotransmissores de queiloide de lóbulo de orelha vs controles.....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Queloides em lóbulo de orelha, área de coleta das amostras de queloides para o presente estudo.....	20
<b>Figura 2</b> - Gráfico representando os 8 genes diferencialmente expressos, relacionados aos neurotransmissores, no grupo queloides de lóbulo de orelha comparado ao grupo controle.....	34
<b>Figura 3</b> - <i>Heat Map</i> , ou mapa de calor, representando a expressão dos genes relacionados aos neurotransmissores no grupo queloides de lóbulo de orelha comparado ao grupo controle.....	35
<b>Figura 4</b> - <i>Scatter Plot</i> , ou gráfico de dispersão, representando a expressão dos genes relacionados aos neurotransmissores do grupo queloides de lóbulo de orelha comparado ao grupo controle.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ACTH** hormônio adrenocorticotrófico (*adrenocorticotropic hormone*)
- AMPARs** receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
- AVPR1** receptor de arginina vasopressina 1 (*arginine vasopressin receptor 1*)
- AVPR1A** receptor de arginina vasopressina 1A (*arginine vasopressin receptor 1A*)
- AVPR1B** receptor de arginina vasopressina 1B (*arginine vasopressin receptor 1B*)
- AVPRV1a** receptor de arginina vasopressina 1a (*arginine vasopressin receptor 1a*)
- Ca<sup>2+</sup>** cálcio
- CaM** calmodulina
- CaMKII** quinase II dependente de cálcio/ calmodulina
- CaMP** 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
- CCK2R** receptor 2 de colecistocinina (*cholecystokinin 2 receptor*)
- CCKAR** receptor A de colecistoquinina (*cholecystokinin A receptor*)
- CCK-B** receptor B de colecistocinina (*cholecystokinin B receptor*)
- CCKBR** receptor B de colecistocinina (*cholecystokinin B receptor*)
- CD163** proteína expressa pelas células de linhagem monócitos
- CD68** proteína expressa pelas células de linhagem monócitos
- cDNA** DNA complementar
- Cq** limiares máximo e mínimo da fase exponencial do ciclo de reação (*quantification cycle*)
- Ct** limiar do ciclo (*threshold cycle*)
- DCP** Disciplina de Cirurgia Plástica
- DCs** células dendríticas
- DNA** ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

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

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

**EPM** Escola Paulista de Medicina

**GASR** receptor B de colecistocinina (*cholecystokinin B receptor*)

**GluK2** subunidade 2 do tipo kainato do receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2*)

**GluK2b** subunidade 2 do tipo kainato do receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2*)

**GluK5** subunidade 2 do tipo kainato do receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2*)

**GPCR1E** receptor metabotrópico 5 do glutamato (*glutamate metabotropic receptor 5*)

**GPCRs** receptores acoplados à proteína G

**GRIN1** subunidade 1 do tipo NMDA de receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*)

**GRM5** receptor metabotrópico 5 do glutamato (*glutamate metabotropic receptor 5*)

**IFN- $\gamma$**  interferon-gama

**IL-1** interleucina 5 (*interleukin 1*)

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

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

**INF- $\beta$**  *interferon*—beta

**INM** membrana nuclear interna

**K<sup>+</sup>** potássio

**KA2** kainato tipo 2

**KAR** receptores de kainato

**KAR-EPSCs** receptores de kainato - correntes elétricas pós sinápticas

**LPS** lipopolissacarídeo (*lipopolysaccharide*)

**LTD** indução a longo prazo

**LTP** potencialização de longo prazo

**MEC** matriz extracelular

**mGlu5** receptor metabotrópico 5 do glutamato (*glutamate metabotropic receptor 5*)

**MGLUR5** receptor metabotrópico 5 do glutamato (*glutamate metabotropic receptor 5*)

**MMP-9** matrix metallopeptidase 9

**MoDCs** células dendríticas derivadas de monócitos

**MRD8** subunidade 1 do tipo NMDA de receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*)

**mRNA** RNA mensageiro

**n** número de pacientes (casuística)

**NDHMSD** subunidade 1 do tipo NMDA de receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*)

**NDHMSR** subunidade 1 do tipo NMDA de receptor ionotrópico de glutamato (*glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1*)

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

**NK1R** receptor de taquicinina 1 (*tachykinin receptor 1*)

**NK2R** receptor de taquicinina 2 (*tachykinin receptor 2*)

**NKA** neurocinina A

**NKNAR** receptor de taquicinina (*tachykinin receptor*)

**NMDA** N-metil D-Aspartato

**NMDA1** N-metil D-Aspartato 1

**NMDAR1** receptor N-metil D-Aspartato

**NMDARs** N-metil D-Aspartatos

**NMD-R1** receptor subunidade 1 do tipo NMDA (*receptor NMDA type subunit 1*)

**NO** óxido nítrico (*nitric oxide*)

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

**OT-R** receptor de oxitocina (*oxytocin receptor*)

**OXTR** receptor de oxitocina (*oxytocin receptor*)

**p** nível de significância estatística

**P53** proteína 53

**PAHS-060Z** placa de 84 genes para neurotransmissores e receptores (*Human Neurotransmitter & Receptors PCR Array*)

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

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

**PKC** proteína quinase C

**PPP1R86** receptor metabotrópico 5 do glutamato (*glutamate metabotropic receptor 5*)

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

**RNA** ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

**RT** transcrição reversa (*reverse transcription*)

**RT<sup>2</sup>** amplificação em tempo real (*real time amplification*)

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

**SFXN1** *sideroflexin 1*

**SKR** receptor de taquicinina 2 (*tachykinin receptor 2*)

**SP** substância P

**SP-NK1R** receptor de SP

**STAT1** transdutor de sinal e ativador de transcrição 1

**TAC2R** receptor de taquicinina 2 (*tachykinin receptor 2*)

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

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

**UNIFESP** Universidade Federal de São Paulo

**V1aR** receptor de arginina vasopressina 1a (*arginine vasopressin receptor 1a*)

**V2R** receptor de arginina vasopressina 2 (*arginine vasopressin receptor 2*)

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

**%** por cento

**>** sinal de maior que

**<** sinal de menor que

**°C** graus Celsius

**g** grama

**kDa** kilodaltons

**kg** quilograma

**mg** miligrama

**ml** mililitro

**nm** nanímetros

**ng/ml** nanogramas por mililitro

**µg** micrograma

**rpm** rotação por minuto

**±** mais ou menos

**-** menos



## RESUMO

**Introdução:** A falta do conhecimento total sobre quelóide tem consequência a falta de um tratamento definitivo. O queiloide é caracterizado pelo excesso de síntese de matriz extracelular, principalmente colágeno e pode estar relacionado a alteração da expressão gênica de receptores de neurotransmissores. **Objetivo:** Avaliar a expressão gênica de receptores de neurotransmissores em queiloide de lóbulo de orelha. **Métodos:** Foram coletadas doze (12) amostras de queiloide e doze (12) amostras de pele normal para o grupo controle. O RNA total foi extraído e purificado com *Qiagen RNeasy Minikit* de *DNAse* e a quantidade e a qualidade do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria. O RNA foi usado para a síntese de cDNA. As reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT2 First Strand Kit da Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante e a RT-qPCR foi realizada usando o *RT2 Profiler® PCR array da Superarray Bioscience*, onde foram analisados 84 genes humanos relevantes envolvidos na síntese de neurotransmissores e seus receptores (PAHS-060Z). **Resultados:** Oito (8/84 ou 9,5%) genes – TACR2, GRIN1, CCKBR, AVPR1A, OXTR, GRIK5, NPY2R e GRM5 foram diferencialmente expressos no queiloide. **Conclusão:** Os genes diferencialmente expressos, 37,5% hipoexpressos e 62,5% hiperexpressos, em queiloide comparado à pele normal, e os genes de interesse são TACR2, GRIN1, CCKBR, AVPR1A, OXTR, GRIK5, NPY2R e GRM5.

## ***ABSTRACT***

**Introduction:** The lack of total knowledge about keloids leads to a lack of definitive treatment. Keloid is characterized by excess synthesis of extracellular matrix, mainly collagen and may be related to alteration of the gene expression of neurotransmitters receptors. **Objective:** To evaluate the gene expression of neurotransmitter receptors in earlobe keloid. **Methods:** Twelve (12) keloid samples and twelve (12) normal skin samples were collected for the control group. Total RNA was extracted and purified with Qiagen RNeasy Minikit DNase and the amount and quality of extracted RNA were evaluated by spectrophotometry. RNA was used for cDNA synthesis. Reverse transcription reactions were performed using the Superarray Bioscience RT2 First Strand Kit according to the manufacturer's protocol and the RT-qPCR was performed using the Superarray Bioscience RT2 Profiler® PCR array where 84 relevant human genes involved were analyzed. in the synthesis of neurotransmitters and their receptors (PAHS-060Z). **Results:** Eight (8/84 or 9.5%) genes - TACR2, GRIN1, CCKBR, AVPR1A, OXTR, GRIK5, NPY2R and GRM5 were differentially expressed in keloid. **Conclusion:** The differentially expressed 37.5% hypoexpressed and 62.5% hyperexpressed genes in keloid compared to normal skin, and the genes of interest are TACR2, GRIN1, CCKBR, AVPR1A, OXTR, GRIK5, NPY2R and GRM5.

## **1. INTRODUÇÃO**

Quando um tecido é lesionado, as células sanguíneas como monócitos são recrutadas ao local da lesão. Os neutrófilos, que são células fagocíticas, são apresentadas inicialmente porém na ausência de microrganismo, ocorre uma redução numérica dessas células e aumento de monócitos os quais são ativados posteriormente, predominando a atuação dos macrófagos, com tempo de vida mais longo que os neutrófilos e portanto ficando no local até o final do processo de cicatrização (SHIMIZU *et al.*, 2006). Conseqüentemente há ativação das citocinas as quais irão ativar e recrutar outras células imunológicas. No entanto, essas células que são recrutadas ao local lesionado, irão atravessar a barreira epitelial degradando a matriz extracelular, que é regulada por metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores de metaloproteinases de tecidos (TIMPs) (RIVERA *et al.*, 2004; SHIMIZU *et al.*, 2006).

Entretanto, ao mesmo tempo que ocorre uma cascata de cicatrização também ocorre uma cascata de coagulação e o processo inadequado destes podem originar conseqüências como uma hiperprodução de colágeno, que é característica do queloide (KASHIYAMA *et al.*, 2012) e essa alteração acarreta na qualidade de vida do indivíduo como a baixo autoestima, a rejeição social, depressão, discriminações, entre outros em pessoas com cicatriz queloidiana (BABALOLA *et al.*, 2013).

Alguns estudos sugerem que a alteração no processo de cicatrização que gera queloide está relacionada a associação de melanócitos com as fibras nervosas e essa associação resulta na formação da rede chamada de sistema neurossensorial cutâneo ou sistema nervoso cutâneo (HOCHMAN *et al.*, 2005). Os melanócitos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais sintetizam hormônios, tais como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o

hormônio estimulador de alfa melanócitos (alfa-MSH), e fatores de crescimento e citocinas pró inflamatórias, a interleucina – 1 (IL-1), a interleucina – 6 (IL- 6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (FURTADO *et al.*, 2012), quanto as fibras nervosas sensoriais estão relacionadas com a homeostasia da pele (FERREIRA *et al.*, 2010) pois o sistema nervoso central (SNC) envia sinal para o sistema nervoso cutâneo, através da liberação de neuropeptídeos e neurotransmissores (HOCHMAN *et al.*, 2015a).

Logo queleioide é o resultado da alteração do processo da cicatrização normal da pele, apresentando inflamação intensa no local lesionado e caracterizado pelo excesso de colágeno depositado no tecido (HSU *et al.*, 2006), ocorrido na fase de remodelação (SHIMIZU *et al.*, 2006) sendo de origem ectodérmica (HOCHMAN *et al.*, 2015a) e alguns pesquisadores enfatizam a hipótese de que essa cicatrização alterada tem um componente genético.

Barão Allibert foi o primeiro a descrever a cicatriz queloidiana em 1806 devido à sua semelhança com as garras de caranguejo, termo derivado do grego *chele*, *khêlê*, pinça (PHILANDRIANOS *et al.*, 2016) e que este se comporta como tumor benigno que se propaga, com características que diferem de cicatrizes hipertróficas (HAUBNER *et al.*, 2014) e exclusiva em seres humanos (HOCHMAN *et al.*, 2005). Embora apresente quadro clínico semelhante a cicatriz hipertrófica com lesões avermelhadas, dolorosas, cicatrizes elevadas e com prurido, o que os diferem é que o queleioide expande além das margens da ferida original e não desaparece com o tempo (ENOSHIRI *et al.*, 2017). Contudo, podem aparecer em várias regiões do corpo, como orelha, pescoço, membros superiores e tórax (BABALOLA *et al.*, 2013), porém sendo mais comum em regiões com maiores tensões na pele (HOCHMAN *et al.*, 2005) e ocorre frequentemente na cicatrização de feridas após tratamento com queimaduras ou operação

de trauma, afetando de 0,3 a 16% da população em todo o mundo (HOU, FAN, LIU, 2019)

Alguns autores sugerem que a toxina botulínica tipo A (BoNT-A), uma neurotoxina capaz de bloquear a liberação de neurotransmissores e regular alguns genes, induzindo o relaxamento muscular e a diminuição da tensão da ferida, sendo uma alternativa terapêutica para quelóide, porém o mecanismo detalhado do BoNT-A no tratamento de quelóides ainda é amplamente desconhecido (XIAOXUE, Xi, ZHIBO, 2014; HOCHMAN *et al.*, 2015<sup>a</sup>; SUN *et al.*, 2019).

Existem diversas maneiras de estudar o perfil de expressão gênica, como estudos com a utilização das técnicas de biologia molecular, com obtenção de muitos dados de genes alterados para uma melhor compreensão dos genes diferencialmente expressos nessa doença (RAMOS, GRAGNANI, FERREIRA, 2009).

Nos últimos anos, há uma vasta gama de procedimentos para o tratamento de cicatrizes queloidianas como laser, 5-fluorouracil, verapamil, corticosteroides, entre outros. Hoje em dia, estas técnicas são frequentemente combinadas para alcançar alguns resultados (GAUGLITZ & PAVICIC, 2012) e embora tenha varias terapias efetivas, no entanto, ainda apresenta taxa de recidiva em todos os tipos de tratamentos, pois não há um conhecimento total de sua etiopatogenia e conseqüentemente a falta de terapia definitiva da mesma, embora existe muitas hipóteses para explicar o desenvolvimento do quelóide, como inflamação neurogênica, psiconeuroimune, genética, endócrina, entre muitas, (HAUBNER *et al.*, 2014; XIAOXUE, XI, ZHIBO, 2014). O desenvolvimento do tratamento é de extrema importância e somente com a compreensão das comunicações dos sistemas nervoso, imunológico e endócrino poderá ser alcançado uma evidência no tratamento (HOCHMAN *et al.*, 2015a).

No presente estudo, tem-se como hipótese que a expressão diferenciada dos genes de receptores de neurotransmissores em queloide de lóbulo de orelha não tratado poderia apresentar um perfil inicial de genes de interesse, os quais estariam presentes no queloide estudado e que tenham alguma referência na literatura com queloide em outros estudos. A partir desses achados, novos estudos serão importantes para maior análise individual do gene, com o uso de substâncias inibitórias ou silenciadoras de genes, ou substâncias que promovam o aumento da expressão gênica de alguns genes de interesse, e dessa forma num futuro possamos obter respostas mais robustas para possíveis marcadores da presença de queloide ou para o seu tratamento.

## **2. OBJETIVO**



## **OBJETIVO**

Avaliar a expressão genica dos receptores de neurotransmissores em queiloide de lóbulo de orelha.

### **3. LITERATURA**

HOCHMAN *et al.* (2005) utilizaram *hamster* ou *Mesocricetus auratus*. Do total de 18 animais, dividiram em seis grupos com três animais cada que foram submetidos à introdução cirúrgica do enxerto com fragmentos de queiloide nas bolsas das bochechas dos animais, provenientes da região mamária de uma paciente não branca de 27 anos. Os grupos foram nomeados conforme os dias nos quais os animais seriam sacrificados, sendo assim: grupo A com 5 dias pós-operatório; grupo B, 12 dias; grupo C, 21 dias; grupo D, 42 dias; grupo E, 84 dias e grupo F, 168 dias. Grupo A e grupo B apresentaram aspecto microscópico com infiltrado inflamatório maior que o grupo D ao grupo F, porém ao analisar os fragmentos de queiloide, os grupos D, E e F houve presença de melanócitos e formações císticas com secreção de queratina no epitélio conjuntivo. Embora a etiologia do queiloide ainda seja desconhecida, a presença de melanócitos sugere a participação do sistema nervoso na formação da cicatrização desta inflamação neurogênica e os autores verificaram que o epitélio manteve vascularização durante os 168 dias.

HSU *et al.* (2006) investigaram a relação do óxido nítrico (ON), produzido pelo ON induzível (iNOS) com a expressão de colágeno em queiloide, também determinaram os níveis de síntese de iNOS e ON. Analisaram seu efeito sobre a síntese de colágeno. Os resultados pela técnica de PCR Real Time (RT-PCR) demonstraram alta expressão de iNOS e ON, também verificaram que houve um aumento significativo de mRNA do iNOS, sendo aproximadamente 8,6 vezes a mais em tecido de queiloide quando comparado a cicatriz normal. Pela técnica de *Western blot* foi revelado que em tecidos normais houve pouca expressão de iNOS, enquanto que em queloides foi muito expresso em queratinócitos na camada basal do tecido lesionado e este aumentou a expressão do colágeno tipo I. O ON, sintetizado pelo iNOS, pode induzir a alta expressão de

colágeno e desempenha papel essencial na proliferação e diferenciação de queratinócitos, os quais são células produtoras de citocinas, e estas são importantes para reações imunológicas e inflamatórias. Portanto, relataram a hipótese de que o excesso de colágeno tem relação ao alto nível de ON, influenciando os fibroblastos a sintetizar colágeno.

SHIMIZU *et al.* (2006) investigaram o efeito do tranilast na produção de MMP através de neutrófilos *in vitro*. Conduziram quatro experimentos, sendo o primeiro para avaliar a influência do tranilast sobre a migração natural de neutrófilos o que permitiu verificar que quando adiciona anti-MMP no meio com LPS expostos a variáveis concentrações de células leucocitárias, ocorre um aumento significativo de migração. O segundo utilizou a técnica ELISA, e esta possibilitou a verificação de produção de MMP e TIMP através de neutrófilos expostos ao LPS, quando a concentração era de 5 ou 10 ml suprimiu a produção de MMP e TIMP. O terceiro examinou o efeito do tranilast sobre a expressão do RNA mensageiro (mRNA) para síntese de MMP e TIMP, entretanto o tranilast desempenhou uma inibição do mRNA. O quarto e ultimo experimento, investigaram os possíveis mecanismos do fármaco, que o fez inibir a expressão do mRNA, para isso utilizaram fator de transcrição, NFB e AP-1. O tranilast suprimiu a expressão do mRNA, concentrações de 5,0 a 10ml, quando há ativação do AP -1 exposto ao LPS e P50, já em concentrações de 2,5 a 10 ml está correlacionado ao P65. Portanto, a fase de remodelação tecidual está relacionada à atividade de MMP e TIMP os quais tem como função, degradar componentes da matriz extracelular, membrana basal, inclusive o colágeno, cogitando assim que tranilast pode ser uma hipótese de ação terapêutica por amenizar a expansão extracelular de inflamação inibindo a remodelação do tecido.

AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU (2008) propuseram a hipótese da inflamação neurogênica para explicar a formação do queuloide. Esta

hipótese postula que o estresse mecânico estimularia a liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas sensoriais da pele. Dentre os neuropeptídeos, estariam a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que se ligariam aos receptores presentes em queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células imunológicas. Com maior concentração dos peptídeos SP e CGRP mais receptores seriam ocupados e ativados em muitos tipos celulares na pele. Queloide e cicatriz hipertrófica teriam suas origens na inflamação neurogênica, e neuroreceptores teriam efeitos na cicatrização, assim como o aumento na concentração de fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Estímulos mecânicos na pele promoveriam maior produção e liberação de neuropeptídeos pelas fibras nervosas que aumentariam a concentração de TGF- $\beta$  e fator de crescimento neural (NGF), sempre presentes em cicatrizes. As cicatrizes fibroproliferativas apresentam maior fluxo sanguíneo devido ao aumento de neuropeptídeos e a inflamação neurogênica induzida por estresse mecânico seria uma causa do queloide.

FURTADO *et al.* (2012) analisaram o estresse psicológico no surgimento de queiloide em 25 pacientes do gênero masculino e feminino, com faixa etária maior que 18 anos, que foram submetidos à cirurgia para retirada de queiloide. No processo pré-operatório, os pacientes responderam questionário baseado em qualidade de vida, estresse percebido, ansiedade, depressão, prurido e dor, indicando assim o parâmetro de estresse psicológico. Destes, 15 pacientes apresentaram o desenvolvimento de queiloide no terceiro mês, três pacientes em seis meses e sete pacientes não apresentaram queiloide em 12 meses pós-operatório. Para a análise da resposta galvânica da pele (GRS), as amostras foram obtidas por higrômetro termo digital, após ambientação dos pacientes por vinte minutos em temperatura ambiente e umidade controlada. Os resultados da GRS dos pacientes que apresentaram queiloide obtiveram valores mínimos

e máximos aumentados, frente ao estresse, portanto, com um patamar menor de ativação do sistema nervoso simpático (SNS). Contudo, ficou demonstrado, por meio da GRS dos pacientes com reincidência de queiloide pós-operatório, que o estresse psicológico desencadeia a recorrência do queiloide.

KASHIYAMA *et al.* (2012) investigaram através da técnica de *microarray*, os micros RNAs (miRNAs) de queiloide comparados aos miRNAs de fibroblastos normais. Verificaram a regulação desses miRNAs onde sete fazem a regulação positiva e 20 fazem a regulação negativa, porém deu ênfase no miRNA-196 por apresentar alteração na síntese de colágeno. Contudo, sugeriram que quando este tem regulação negativa está relacionado ao mecanismo causador do excesso de colágeno depositado sobre o tecido, desencadeando a cicatriz do queiloide. Portanto, o miRNA-196 está envolvido na formação de queiloide.

BABALOLA *et al.* (2013) concluíram em uma revisão bibliográfica que pequenos RNAs classificados como miRNAs tem relação com a proliferação e desenvolvimento celular, diferenciação, controle de crescimento e apoptose. São encontrados nos fluidos corporais e importantes biomarcadores estáveis, cujo fato torna um grande alvo da pesquisa com intuito terapêutico em queiloide. Também alguns artigos cogitam que há interação direta dos níveis de fator de crescimento transformante (TGF) do tipo II com esses marcadores os quais estão associados as cicatrizes fibroproliferativas. Contudo, existem vários tipos de miRNAs correlacionados ao queiloide, sendo alguns fibróticos que regulam a fibrose e outros anti-fibróticos que inibem a fibrose, mas estes para possuírem ações terapêuticas, o miRNA fibrótico tem que ter a expressão inibida enquanto o miRNA anti-fibrótico tem que ser expresso e assim evitando o desenvolvimento do queiloide .

LUO *et al.* (2013) avaliaram a expressão de receptor de melanocortina 1 (MC1R) nos níveis de mRNA e proteína em tecidos normais e cicatrizes anormais com a presença de queloides, efeitos de alfa-MSH em atividade metabólica, síntese de colágeno e miofibroblasto em fibroblastos cultivados à exposição do fator de crescimento transformante beta-1 (TGFβ1). O MC1R é um antagonista do fibrinogênio, sendo assim um anti-inflamatório, inibindo a síntese de colágeno e quando é pouco expresso, contribui para a formação de quelóide. Contudo, relataram que alfa-MSH ao ser exposto ao TGFbeta1 não inibiu a atividade do fibroblasto mesmo exercendo uma inibição dose-dependente nas atividades metabólicas dos fibroblastos normais, pois os dados apontaram que esse hormônio facilita a síntese de colágeno e devido ao declínio da expressão do MC1R, ocorreu a síntese de colágeno por não ter ligação ao alfa-MSH.

HAUBNER *et al.* (2014) investigaram os efeitos do peptídeo semelhante a toxina botulínica (BoNT) em quelóide. Semearam fibroblastos de quelóide *in vitro* em placa com 96 poços e em triplicata, após 24h substituíram o meio por BoNT e relataram que este não estimulou e nem inibiu a proliferação celular, entretanto inibiu a liberação de acitolol na junção neuromuscular e outras sinapses. Em um estudo em ratos o qual enfatizou que o BoNT modula a expressão de citocinas, uma vez que a IL-6 é muito importante no tecido inflamatório, reação e processos de cicatrização. Propuseram que a modulação da expressão deste marcador pode ser útil no tratamento do quelóide. A expressão de IL-6 descontrolada potencializa a atividade dos fibroblastos. Outros marcadores são IL-1 que estimula a produção de colágeno, fator de crescimento transformante (TGF - b) que está frequente em quelóide por regular a função do fibroblasto, mas neste estudo não verificaram uma ação terapeutica da BoNT em quelóide.

XIAOXUE, XI, ZHIBO (2014) investigaram o efeito da BoNT sobre os genes diferenciais relacionados ao crescimento invasivo de fibroblasto em quelóide, através de *microarray* por RT-qPCR, e relataram que quando a cicatriz de quelóide foi exposta ao BoNT-A expressou esses genes e após 48 horas houve uma diminuição de fibroblasto. Contudo, enfatizaram que sua ação ainda é desconhecida, no entanto é sugestivo o efeito terapêutico seguro e eficiente para quelóide.

HOCHMAN *et al.* (2015b) analisaram a localização de quelóide na orelha com a inserção de brincos e outras joias e suas respectivas composições. Foram submetidos 100 pacientes, com faixa etária entre 11 e 56 anos, sendo 56% mulheres, e que 79% eram não brancas. Nestes 100 pacientes haviam 141 quelóides e apareceram depois da lesão, sendo assim, 41% apareceram após um ano, 31% após seis meses e 28% antes de seis meses. Dos quelóides na orelha, 82% estavam localizados no lóbulo e 18% estavam na região da cartilagem, porém 61% estavam na superfície posterior, 30% estavam na superfície anterior e 15% estavam em ambos os lados do lóbulo. 75% dos casos que utilizavam os objetos com fixadores na região posterior do lóbulo, os quelóides apareceram tanto na superfície anterior quanto de superfície posterior do lóbulo, entretanto 100 % dos casos houve surgimento de quelóide em ambos os lados do lóbulo, também provenientes do uso de brincos ou joias com fixador na região posterior, assim como foi 100% nos casos de quelóides de regiões cartilaginosas da orelha. Quanto à composição dos objetos, 84% eram de prata, 9% eram de ouro e 7% de aço inoxidável. Os autores concluíram com estes dados que o fixador metálico de brincos teria relação com a maior incidência de quelóide na região posterior da orelha, por estímulos bioelétricos e alterações neurosecretórias, dando indicio a inflamação neurogênica.

ENOSHIRI *et al.* (2017) propuseram alguns métodos para combater o quelóide. Foram selecionados 45 pacientes com implantação de



marcapasso. Destes, 12 pacientes desenvolveram cicatrizes anormais inseridos no grupo queiloide e 33 pacientes desenvolveram cicatrizes normais, pertencentes ao grupo controle. As amostras foram analisadas 1 a 2 anos após a implantação do marcapasso. Os autores obtiveram dois resultados, primário e secundário. O primário baseou-se no uso de betabloqueadores (carvedilol, bisoprolol e atenolol), por serem receptores inibitórios à formação de queiloide, pois sintetizam o NO e ativam a quinase que tem ligação ao sinal extracelular, inibindo a apoptose ou acelerando a migração e proliferação celular em processos inflamatórios, contudo foi manipulado pré e pós implantação do marcapasso. O secundário averiguou a taxa de anti-hipertensivos em queiloide, mas houve uma seleção dos pacientes submetidos a essa análise, já que pacientes hipertensos são propícios a desenvolver queiloide ou administram medicamentos anti-hipertensivos, diminuindo a probabilidade de desenvolver a cicatriz fibroproliferativa. Utilizaram a escala de cicatriz de Kyoto para discernir cicatriz normal de anormal, avaliando sintomas objetivos como vermelhidão, elevação e consistência; e sintomas subjetivos como prurido e dor; analisados por três cirurgiões os quais classificaram que cicatrizes parcialmente ou totalmente avermelhadas eram cicatrizes anormais e a ausência da vermelhidão era cicatriz normal. Concluíram, que betabloqueador é um tratamento viável para queiloide e cicatriz hipertrófica.

HSIEH et al. (2019) investigaram o efeito do NO com nitroprussiato de sódio (SNP) o qual é um doador de NO, na proliferação de fibroblastos em cicatrizes queloidianas através de cultura de células, utilizando passagem cinco a 12, provenientes de pacientes submetidos a retirada de queiloide sem tratamento. Os resultados demonstraram ter um nível elevado de NO em cicatrizes queloidianas quando comparado a cicatrizes normais e os autores acreditam que isso possa estar relacionado a

característica patológica do quelóide através de múltiplas vias de sinalização, sendo a Erk e Akt, reguladoras importantes para a proliferação celular. Em um levantamento literário, verificaram que estudos anteriores, demonstraram que Erks são necessárias para a proliferação de fibroblastos e a inibição desta acarreta no bloqueio da proliferação de fibroblastos e então pela técnica de Western blot verificaram que ao utilizarem inibidores de Erk e Akt, inibiu a proliferação de fibroblastos e o SNP aumentou os níveis de fosforilação de Erk e Akt, revelando assim que o NO estimulou a proliferação de fibroblastos através das vias Erk e Akt.

## **4. MÉTODO**

#### 4.1 Delineamento da Pesquisa

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa primária observacional, transversal, experimental *in vitro*, analítico, controlado e realizado em centro único. Foram coletadas as amostras de queleide no lóbulo de orelha de 12 pacientes para o grupo estudo e pele normal de 12 pacientes submetidos a mamoplastia redutora sem histórico de cicatrização patológica para o grupo controle.

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

Os pacientes do grupo controle foram atendidos no Setor de mama da Disciplina de Cirurgia Plástica (DCP) da UNIFESP/EPM. Esses pacientes sem queleide e/ou histórico de cicatrização patológica e com indicação de procedimento operatório estético, mamoplastia redutora, doaram a pele que seria descartada durante o procedimento padrão, para o presente estudo. O procedimento operatório desses pacientes foi realizado no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP).

A fase laboratorial foi realizada no Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica, localizado no Edifício Acadêmico Prof. Dr. Horácio Kneese de Mello (Edifício de Pesquisa 1), na Rua Pedro de Toledo, 781 – 4o andar / Fundos– Vila Clementino – São Paulo-SP.

Os pacientes que foram incluídos neste estudo assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP sob o número 820.141 (Apêndice 1).

## **4.2 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, apresentando queiloide de lóbulo de orelha sem atividade (Figura 1), sem tratamento anterior para o queiloide nos últimos 6 meses, com idade de 18 a 45 anos, tinham indicação de tratamento cirúrgico para retirada do queiloide na Casa da Cirurgia Plástica da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM, e concordaram em participar da pesquisa após ser convidado, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

## **4.3 Critérios de Não Inclusão**

Não foram incluídos pacientes que não concordaram em participar da pesquisa, ou que apresentavam doença prévia de pele, em especial lesões inflamatórias, ou doenças clínicas descontroladas como diabetes, hipertensão arterial, entre outras, as quais podem interferir diretamente no processo inflamatório e o processo de cicatrização de feridas.

## **4.4 Critérios de Exclusão**

Amostras tanto do grupo controle, quanto do grupo estudo, foram excluídas quando o RNA extraído foi considerado insuficiente, sendo o valor de referência maior que 1 µg ou ocorresse perda da amostra ou do RNA extraído.

## **4.5 Procedimento Operatório**

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



**Figura 1** - Queloide em lóbulo de orelha, área de coleta das amostras de queloide para o presente estudo.

#### **4.6 Obtenção das amostras de tecidos**

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

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

Os pacientes do grupo controle foram operados no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (HU – HSP) sob anestesia geral,

segundo a técnica padrão utilizada na Disciplina de Cirurgia Plástica para mamoplastia redutora. A pele excedente, que normalmente seria descartada no procedimento, foi enviada ao laboratório, após o consentimento livre e esclarecido do paciente.

Os fragmentos de queiloide e pele da mama obtidos foram armazenados em tubo de ensaio e enviados ao laboratório imediatamente após a sua retirada em recipiente de isopor com gelo para manter o fragmento resfriado. Estes fragmentos foram submetidos à extração do RNA e análise por reação em cadeia da polimerase (PCR). A degradação do fragmento não foi realizada de imediato, o mesmo foi dividido em pedaços menores para armazenamento em temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para melhor conservação. O manuseio dessas amostras foi realizado com o uso de luvas para que as amostras não tivessem contato com as nucleases liberadas pelas mãos dos pesquisadores.

#### **4.7 Extração de RNA das amostras de tecidos**

Foi pesado quantidades da amostra, entre 200 mg e 1000mg as quais foram adicionadas a uma solução-tampão de degradação (Anexo 1), na proporção de 1,2 ml de tampão para cada 100mg de tecido, e colocadas em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$ , para a eficiência da degradação da membrana celular. O tempo de incubação foi de doze horas, ou até que a amostra apresentasse totalmente digerida, apresentando um aspecto viscoso.

A amostra digerida foi homogeneizada com 500 $\mu\text{l}$  reagente Trizol (*Invitrogen*, CA, EUA) e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, permitindo a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Foi adicionado 100 $\mu\text{l}$  do reagente clorofórmio (Sigma, St. Louis, USA) e incubada à temperatura ambiente por 2-3 minutos e centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para obter a eficiência da separação de fases, sendo a fase aquosa, a fase localizada na parte superior do microtubo

utilizado, contendo o RNA; interfase, fase intermediária do microtubo utilizado, contendo o ácido desoxiribonucleíco (DNA) e fase orgânica, localizada na parte inferior do microtubo utilizado, contendo restos celulares e proteínas. Posteriormente o RNA, proveniente da fase aquosa, foi transferido para um novo microtubo estéril e adicionado 250µl de isopropanol, incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C formando um *pellet* e este foi lavado com 500µl de etanol 75% por centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. O microtubo contendo RNA e resquícios de etanol 75% ficou aberto dentro do fluxo laminar, em temperatura ambiente, por 5-10 minutos, para evaporar todo etanol 75% presente e ficar apenas o RNA. Após, esse RNA seco foi dissolvido em 50µl água livre de RNase purificado com *Qiagen RNeasy Minikit* (Qiagen, Valencia, EUA) de DNase e submetidos as técnicas de biologia molecular.

#### **4.8 RT-qPCR Array quantitativo**

O RNA total foi primariamente isolado usando-se o reagente Trizol (*Invitrogen, CA, EUA*), seguido pelo *kit* de membrana de sílica da *Super Array Bioscience (Array Grade® Total RNA Isolation Kit)* e após esse procedimento, o RNA total foi purificado com *Qiagen RNeasy Minikit* de DNase e submetidos as técnicas de biologia molecular subsequentes.

A quantificação e a avaliação da pureza do RNA total extraído de todos os fragmentos obtidos das amostras de ambos os grupos, foram avaliadas por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoVue Plus GE (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA)* e ao verificar tanto a quantificação, quanto a pureza dentro dos valores de referências sendo a quantidade maior que 1µg e a pureza estando dentro do intervalo de 1,8 – 2, foram reunidos 1µg do volume final de RNA total de cada amostra dos dois grupos e esse *pool* de amostras, tanto para o grupo controle como



para o grupo estudo, foi usado para a síntese de DNA complementar (cDNA). As amostras foram tratadas com tampão oriundo do *kit*, e reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* da *Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante e então foram submetidos a PCR quantitativa a partir da transcrição reversa (RT-qPCR) usando-se o *RT<sup>2</sup> Profiler® PCR array* da *Superarray Bioscience* (<http://www.sabiosciences.com/howpcrarrayworks.php>).

Para o estudo, foi utilizado uma placa de 96 poços, onde 84 genes eram genes humanos envolvidos na síntese de receptores de neurotransmissores – *Human Neurotransmitter & Receptors PCR Array* (PAHS-060Z) (Quadro 1), frequentes em patologias envolvendo o sistema nervoso. A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas foram realizadas em um equipamento *ABI Prism 7500 SequenceDetection System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) utilizando a metodologia *RT<sup>2</sup> SYBR® Green qPCR Mastermix*.

O equipamento para a qPCR Array possui um sistema óptico para excitar a fluorescência e detectar a emissão de fótons, assim os dados adquiridos são enviados a um computador que os analisa com um programa *software*. Os limiares máximo e mínimo da fase exponencial do ciclo de reação são denominados *quantification cycle* (Cq) e as médias de Cq geram, com uma equação matemática, a taxa de expressão relativa fornecendo o *fold change*, ou mudança de razão, da amostra do grupo estudo em relação ao grupo controle. O controle interno é feito com genes endógenos de referência para identificar variações dos resultados obtidos e a mudança de razão, dos genes diferencialmente expressos, podendo apresentar-se hipoexpressos (*fold change* < -2), hiperexpressos (*fold change* > 2) ou sem diferença significativa (-2 < *fold change* < 2). Os testes estatísticos utilizados em RT-qPCR permitem fazer comparações entre dois grupos de amostras (PAGE & STROMBERG, 2011).

**Quadro 1** – Painele de 84 genes humanos relacionados aos receptores de neurotransmissores presentes na placa de PCR Array (PAHS-060Z).

*RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array System Human Neurotransmitter & Receptors* (Qiagen, Valencia, EUA)  
(nº no catálogo: PAHS-060Z)

**Adrenergic Receptors**

Alpha Adrenergic Receptors: ADRA1A, ADRA1D, ADRA2A.

Beta Adrenergic Receptors: ADRB2, ADRB3.

**Cholinergic Receptors**

Muscarinic Receptors: CHRM1, CHRM4, CHRM5.

Nicotinic Receptors: CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNE.

**Dopaminergic Receptors**

DRD1, DRD2, DRD5.

**GABAergic Receptors**

GABAA Receptors: GABRA1, GABRA2, GABRA4, GABRA5, GABRA6, GABRB1, GABRB3, GABRD, GABRE, GABRG1, GABRG2, GABRG3, GABRQ.

GABAB Receptors: GABBR1, GABBR2.

GABAC Receptors: GABRR1, GABRR2.

**Glutamate Receptors**

AMPA Receptors: GRIA1, GRIA2, GRIA3.

Kainate Receptors: GRIK1, GRIK2, GRIK4, GRIK5.

NMDA Receptors: GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIN2C.

Metabotropic Receptors: GRM1, GRM3, GRM4, GRM5, GRM6, GRM7, GRM8.

**Serotonin Receptors**

HTR1A, HTR1B, HTR1D, HTR1F, HTR2A, HTR2C, HTR3A, HTR4, HTR7.

**Other Neurotransmitter Receptors**

Vasopressin Receptor: AVPR1A, AVPR1B.

Histamine Receptors: HRH1, HRH4.

Neuropeptide Y Receptors: NPY2R, NPY5R.

Somatostatin Receptors: SSTR1, SSTR2, SSTR4.

Substance P (Neurokinin) Receptors: TACR1, TACR2, TACR3.

Other Neurotransmitter Receptors: BRS3, CCKBR, CNR1, GCGR, GRPR, HCRT2, NTSR2, OXTR, PROKR2 (GPR73L1), SCTR, TSPO (BZRP).

Portanto, no presente estudo, foi utilizado 12µg de RNA total de cada *pool* de ambos os grupos por placa de qPCR Array, realizado em triplicata para a síntese de cDNA, utilizando o *kit RT<sup>2</sup> First Strand*

(*SABioscience Corporation*) para as reações de transcrição reversa e completa eliminação do DNA genômico e o *kit RT<sup>2</sup> Profiler® PCRarray* (*SABioscience Corporation*) (<http://www.sabiosciences.com/howpcrarrayworks.php>), composto por uma placa com 96 poços, sendo 84 poços referentes aos genes de receptores de neurotransmissores, 5 poços para genes endógenos de referência, 1 poço para controle de amplificação do DNA genômico, 3 poços para o controle da transcrição reversa e 3 poços para o controle positivo da PCR (PAHS-060Z), para a análise global e relativa da qPCR *Array*. As condições dos ciclos térmicos foram: 30 segundos a 48°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos, desnaturação a 95°C e 60 segundos de anelamento a 60°C.

As reações foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística. Também foi optado por realizar a análise em *pool*, após a obtenção do RNA total e verificado a quantificação e pureza de cada amostra [n=24], o material de cada grupo foi reunido para realizar a análise do conjunto dos pacientes sendo n= 12 do grupo estudo e n=12 do grupo controle. Para a análise dos resultados do qPCR *Array*, foi considerado o parâmetro amplificação de expressão mudança de razão (*fold change*) > 2, hiperexpresso, ou < -2, hipoexpresso, na expressão relativa do grupo estudo, queiloide de lóbulo de orelha versus o grupo controle, pele da mama, logo o resultado foi a expressão de todos os pacientes do grupo e não a análise individual de cada paciente, tornando a análise da expressão gênica relativa, onde o resultado do queiloide é em relação a pele da mama.

O próprio *software* do equipamento utilizado apresentou os resultados de duas formas, mapa de calor e gráfico de dispersão. O mapa de calor representa os resultados de cada poço em cores onde vermelho indica que o gene está hiperregulado ou hiperexpresso, verde indica que o gene está hiporregulado ou hipoexpresso e preto e/ou tons de cinza indica que o

gene não apresenta 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, representados em vermelho, indicam que os genes estão hiperregulados ou hiperexpressos e os pontos que ultrapassam a linha inferior, representados em verde, indicam que os genes estão hiporregulados ou hipoexpressos e os pontos que aparecem dentro das linhas, com *fold change*, ou mudança de razão, entre 2 e -2, aparecem em colorações próximas ao preto os quais indicam que os genes não apresentam diferença na expressão gênica relativa.

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

#### 4.9 Análise Estatística

O programa RT<sup>2</sup> *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 foi utilizado o teste T de *Student* e foi considerado significativo o valor  $p \leq 0,05$ .

## **5. RESULTADOS**

Os fragmentos obtidos das amostras do grupo controle as quais foram coletadas de 12 pacientes do grupo controle e todas eram mulheres, com média de idade de 36,75 anos; e os fragmentos obtidos das amostras do grupo estudo as quais foram coletas de 12 pacientes, sendo que sete eram mulheres e cinco eram homens e com média de idade de 25,5 anos. (Tabela 1).

**Quadro 2** - Dados de média de idade e sexo dos pacientes incluídos no grupo estudo com os fragmentos de queiloide de lóbulo de orelha e do grupo controle com os fragmentos de pele normal.

<b>Grupos/Dados</b>	<b>n</b>	<b>Idade (Média ± DP)</b>	<b>Sexo</b>
<b>Grupo Controle</b>	12	36,75 anos	12 F
<b>Grupo Estudo</b>	12	25,5 anos	5M 7F

n= casuística ; F=feminino; M=masculino

O RNA total obtido de todas as amostras apresentou índice de pureza adequada para o uso nas análises subsequentes, pois as amostras de RNA total extraído do grupo controle (Quadro 3) e do grupo estudo (Quadro 4) apresentaram medidas da razão de absorbância entre os comprimentos de ondas de 260 nanômetros por 280 nanômetros com valores que variaram próximo a dois.

**Quadro 3** - Concentração das soluções de RNA provenientes das amostras do grupo controle detectados por espectrofotometria (n=12).

<b>AMOSTRA</b>	<b>CONC (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>RAZÃO 260/280</b>
<b>Amostra 1 Grupo Controle</b>	62,6	1,9
<b>Amostra 2 Grupo Controle</b>	145,6	1,9
<b>Amostra 3 Grupo Controle</b>	181,2	1,8
<b>Amostra 4 Grupo Controle</b>	112,8	1,9
<b>Amostra 5 Grupo Controle</b>	198	1,9
<b>Amostra 6 Grupo Controle</b>	162,4	1,8
<b>Amostra 7 Grupo Controle</b>	126	1,8
<b>Amostra 8 Grupo Controle</b>	64	1,9
<b>Amostra 9 Grupo Controle</b>	128,4	1,9
<b>Amostra 10 Grupo Controle</b>	198,8	1,9
<b>Amostra 11 Grupo Controle</b>	86,4	1,9
<b>Amostra 12 Grupo Controle</b>	76,4	1,9

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

**Quadro 4** - Concentração das soluções de RNA provenientes das amostras do grupo estudo detectados por espectrofotometria (n=12).

<b>AMOSTRA</b>	<b>CONC (<math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>RAZÃO 260/280</b>
<b>Amostra 1 Grupo estudo</b>	247,6	2
<b>Amostra 2 Grupo estudo</b>	68,4	2
<b>Amostra 3 Grupo estudo</b>	56	2
<b>Amostra 4 Grupo estudo</b>	34	2
<b>Amostra 5 Grupo estudo</b>	68	2
<b>Amostra 6 Grupo estudo</b>	73,2	2
<b>Amostra 7 Grupo estudo</b>	432	2
<b>Amostra 8 Grupo estudo</b>	566,8	2
<b>Amostra 9 Grupo estudo</b>	112,8	2
<b>Amostra 10 Grupo estudo</b>	208,4	2
<b>Amostra 11 Grupo estudo</b>	417,2	2
<b>Amostra 12 Grupo estudo</b>	77,6	2

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

Na análise do perfil de expressão gênica de pacientes com queiloide de lóbulo de orelha (Apêndice 2), foram obtidos os genes diferencialmente expressos, hiperexpressos, o receptor 2 de taquicinina (TACR2), receptor de glutamato; inotrópico, N- metil D- aspartato (GRIN1); receptor  $\beta$  colecistoquina (CCKBR); receptor 1 A de argenina vasopressina (AVPR1A); e o receptor de oxitocina (OXTR). Os genes diferencialmente expressos, hipoexpressos foram o receptor de glutamato, inotrópico, kainate (GRIK5); receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY2R); e receptor de glutamato, metabotropico (GRM5) (Tabela 4).



**Tabela 1** - Genes diferencialmente expressos relacionados aos receptores de neurotransmissores de queloide de orelha vs controles.

NOME DO GENE	SIGLA	FOLD CHANGE	p
Receptor 2 de taquicinina	TACR2	2,0799	0,002659
Receptor de glutamato, inotrópico, N- metil D- aspartato	GRIN1	2,0678	0,002993
Receptor $\beta$ colecistoquina	CCKBR	20523	0,003011
Receptor 1 A de argenina vasopressina	AVPR1A	2,181	0,000897
Receptor de oxitocina	OXTR	2,0113	0,003828
Receptor de glutamato, inotrópico, kainate	GRIK5	-2,4197	0,00235
Receptor Y2 do neuropeptídeo Y	NPY2R	-2,9493	0,001094
Receptor de glutamato, metabotropico	GRM5	-7,2333	0,000627

p=significância estatística  $\leq 0,05$

O gene TACR2 apresentou um *fold change* de 2,0799 com  $p=0,002659$ , hiperexpresso no queloide. O gene TACR2 pertence a uma família de genes que atuam como receptores de taquiquininas, expresso amplamente no esôfago e endométrio. Interage com a proteína G e sete regiões transmembranas hidrofóbicas e, este gene codifica uma proteína da substancia K do neurocinina A.

O gene GRIN1 apresentou um *fold change* de 2,0678 com  $p=0,002993$ , hiperexpresso no queloide. O gene GRIN1 codifica uma proteína cuja subunidade é de receptor de N – metil – D – aspartato, expresso região restrito em direção ao cérebro. O gene GRIN1 é

fundamental na plasticidade sináptica que está subjacente à memória e ao aprendizado.

O gene CCKBR apresentou um *fold change* de 2,0523 com  $p=0,003011$ , hiperexpresso no queloide. O gene CCKBR codifica o receptor acoplado à proteína G para gastrina e colecistoquinina, expresso no estômago, cérebro e pâncreas. Tem alta afinidade para análogos CCK sulfatados e não sulfatados encontrados no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal.

O gene AVPR1A apresentou um *fold change* de 2,181 com  $p=0,000897$ , hiperexpresso no queloide. O gene AVPR1A codifica a proteína que atua como receptor arginina vasopressina, expresso em adrenal, endométrio e fígado. Atua regulando a contração e proliferação celular, agregação plaquetária, liberação do fator de coagulação e glicogenólise.

O gene OXTR apresentou um *fold change* de 2,0133 com  $p=0,003828$ , hiperexpresso no queloide. O gene OXTR codifica a proteína pertencente à família de receptores acoplados à proteína G, expresso no ovário, endométrio e cérebro e medeia a proteína G.

O gene GRIK5 apresentou um *fold change* de -2,4197 com  $p=0,00235$ , hipoexpresso no queloide. O gene GRIK5 codifica a proteína pertencente à família de canais iônicos com glutamato, expresso amplamente nos testículos, ovários e cérebro. Os receptores GRIK5 são neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central através dos canais iônicos de membranas acopladas à proteína G.

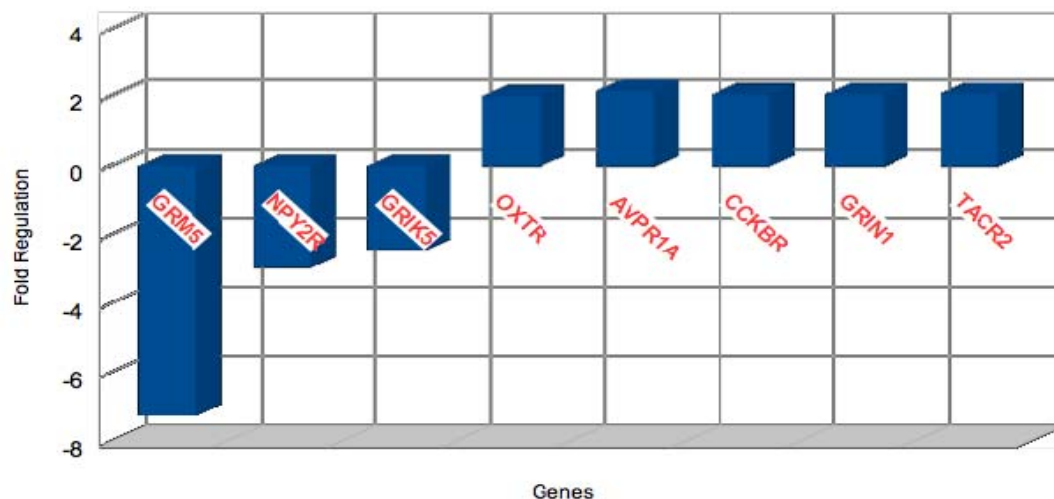
O gene NPY2R apresentou um *fold change* de -2,9493 com  $p=0,001094$ , hipoexpresso no queloide. O gene NPY2R codifica a proteína que forma o receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY), expresso principalmente em células nervosas, é amplamente presente no sistema

nervoso central e é muito abundante no hipotálamo tendo funções na regulação do apetite. Também estão envolvidos em muitas funções biológicas, como na transmissão de sinal de dor, na modulação do ritmo cardíaco e no controle da liberação do hormônio pituitário.

O gene GRM5 apresentou um *fold change* de  $-7,2333$  com  $p=0,000627$ , hipoexpresso no queuloide. O gene GRM5 codifica um membro da família de proteína do receptor 3 acoplado à proteína G, expresso em região restrita em direção ao cérebro. Esta envolvido na regulação da atividade neural, plasticidade sináptica e tem participação na função cerebral normal, pois uma neuropatologia estressam esses receptores.

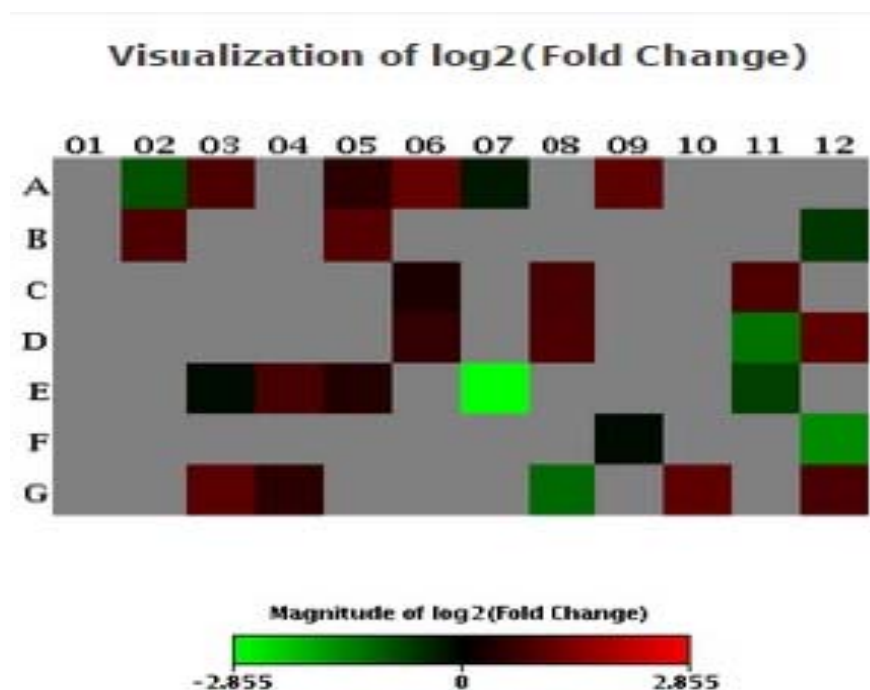
Os genes citados (Apêndice 3) foram consultados no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> e <https://www.wikigenes.org>.

Em resumo, dos 84 genes analisados no presente estudo, 8 (9,5%) apresentaram—se diferencialmente expressos, sendo que desses 3/8 (37,5%) apresentaram-se hipoexpressos e 5/8 (62,5%) hiperexpressos no grupo estudo em relação ao grupo controle (Figura 2).



**Figura 2** - Gráfico representando os 8 genes diferencialmente expressos, relacionados aos receptores de neurotransmissores do grupo estudo, queuloide de lóbulo de orelha, [n= 12] comparado ao grupo controle de pele normal [n= 12].

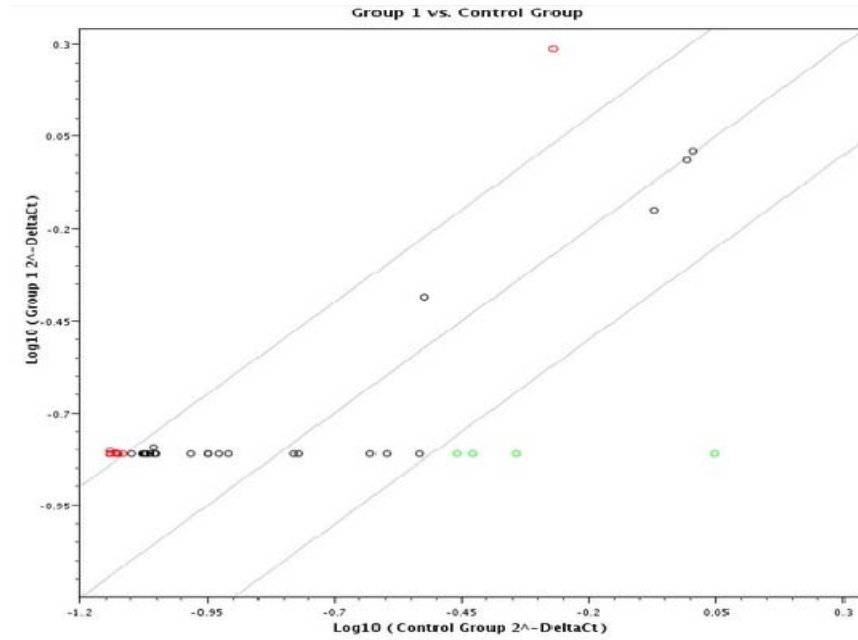
O mapa de calor, ou *heat map* demonstrou os genes diferencialmente expressos, representando-os em cores, os quadrados verdes representam genes hipoexpressos do grupo estudo em relação ao grupo controle (*fold change* ou mudança de razão  $< -2$ ), os quadrados vermelhos representam genes hiperexpressos no grupo estudo em relação ao grupo controle (*fold change* ou mudança de razão  $> 2$ ), os quadrados na cor preta e cinza representam genes não diferencialmente expressos entre os dois grupos (*fold change* ou mudança de razão entre  $< 2$  e  $> -2$ ) (figura 3)



**Figura 3** - *Heat Map*, ou mapa de calor, representando a expressão genica relacionados aos receptores de neurotransmissores no grupo estudo, quelóide de lóbulo de orelha, [n=12] em relação ao grupo controle de pele normal [n=12].

O gráfico de dispersão, ou *scatter plot*, onde os resultados da expressão dos genes diferencialmente expressos são pontos representados em cores. Os pontos vermelhos são os genes hiperexpressos, os verdes os

genes hipoeexpressos e pretos os gene não diferencialmente expresso do grupo estudo em relação ao grupo controle representado pela diagonal (Figura 4).



**Figura 4** - *Scatter plot*, ou gráfico de dispersão, representando a expressão genica relacionados aos receptores de neurotransmissores do grupo estudo de lóbulo de orelha [n= 12] em relação ao grupo controle [n=12].

## **6. DISCUSSÃO**

O estudo do perfil da expressão gênica de receptores de neurotransmissores no queiloide de lóbulo de orelha é original e torna-se essencial para o maior entendimento da fisiopatogenia, já que apresenta, por enquanto, várias hipóteses de seu desenvolvimento, porém, sem uma compreensão maior e um tratamento definitivo. Assim, foi realizada essa análise do perfil da expressão gênica de receptores de neurotransmissores de queiloide de lóbulo de orelha, resultando em 8 (9,5%) dos 84 genes analisados no presente estudo, diferencialmente expressos, sendo 3 (37,5%) hipoeexpressos e 5 (62,5%) hiperexpressos.

O grupo estudo incluiu pacientes sem tratamento prévio para o queiloide no lóbulo de orelha (n= 12), a média da faixa etária 25 anos e ambos os sexos, sendo 5 homens e 7 mulheres. No grupo controle a média da faixa etária foi de 36 anos e pacientes com encaminhamento de cirurgia plástica, de mamoplastia redutora (n= 12) sendo todas do sexo feminino. A mamoplastia redutora foi escolhida, pois ao lado da abdominoplastia, são procedimentos operatórios onde existe a retirada de grande extensão de pele excedente, que normalmente é desprezada. No presente estudo foi utilizada como parâmetro de ausência de doenças o qual foi critério para indicação cirúrgica e no caso do estudo representa paciente normal sem histórico de alterações clínicas, de cicatrização ou de qualquer natureza.

Quanto à escolha da região anatômica para o grupo controle, mama, não ter sido a mesma região onde foi coletado o fragmento do grupo estudo, lóbulo de orelha, pela pequena extensão da região e pela escassez de procedimentos operatórios nesta região em pacientes dentro da faixa etária em que se retira pele, o qual foi critério de inclusão no presente estudo, possibilitando a retirada sem deformação estética do lóbulo para a realização do estudo. Sabe-se que a expressão gênica dos fibroblastos apresenta variações e similaridades em diferentes regiões anatômicas do corpo, sendo que existem estudos defendendo várias hipóteses, como a

região da derme superficial apresenta expressão diferente da derme profunda e diferenças em relação ao local do organismo.

RINN *et al.* (2006) descreveram que os fibroblastos são células mesenquimais presentes em todos tecidos, com muitas funções vitais durante o desenvolvimento, no 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 de célula; 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 de 43 locais anatômicos únicos que abrangem 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. Portanto, estes achados conferem suporte científico para a escolha das amostras utilizadas no presente estudo como 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.

Embora o mapa de calor e o gráfico de dispersão apresentaram mais genes diferencialmente expressos, ao realizar a análise estatística foi verificado que apenas 8 genes, sendo que os hiperexpressos no presente estudo foram receptor 2 de taquicinina (TACR2) [2,0799], receptor de glutamato, inotrópico, N- metil D- aspartato (GRIN1) [2,0678], receptor  $\beta$  colecistoquina (CCKBR) [2,0523], receptor 1 A de argenina vasopressina (AVPR1A) [2,181] e receptor de oxitocina (OXTR) [2,0133]; e os genes hipoexpressos no presente estudo foram receptor de glutamato, inotrópico, kainate (GRIK5) [-2,4197], receptor Y2 do neuropeptídeo Y (NPY2R) [-2,9493] e receptor de glutamato, metabotrópico (GRM5) [-7,2333], apresentaram expressão relevante ao *fold change* ( $< -2$  e  $> 2$ ), ao valor de  $p \leq 0,05$  e ao comentário gerado pelo próprio *software* do equipamento utilizado, baseado ao valor do limiar do ciclo ou *threshold cycle* (Ct) classificados como *OKAY*.

O gene TACR2 com *fold change* de 2,0799 ( $p=0,002659$ ), sendo um gene hiperexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 10 (NC\_000010.11), é também conhecido como SKR, NK2R, NKNAR e TAC2R, codifica receptor para a substância neuropeptídica de taquicinina K ou neurocinina A.

GONZÁLEZ-SANTANA *et al.* (2016) relataram que o gene TACR2 é composto por cinco exons e quatro introns, apresentando *splicings* alternativos e esse gene codifica receptores de neurocininas NK1R, NK2R, NK3R os quais são receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e contribuem para a homeostase do sistema respiratório, cardiovascular, imunológico, endócrino, gastrointestinal e urinário. Além disso o receptor

NK2R é um regulador do ciclo celular e ao acoplar a proteína G a neurocinina, ativa a p53 a qual liga se a região promotora do TACR2. No estudo, os autores avaliaram níveis de expressão de taquicininas e seus receptores em leiomiomas uterinos e miométrio pareado. Leiomioma é uma neoplasia benigna composta por vários tipos celulares, inclusive os fibroblastos e verificaram a expressão diferenciada dos membros da taquicininas e seus receptores são superiores quando comparados com o miométrio normal. Levando em conta que as taquicininas estão envolvidas na proliferação angiogenese, inflamação e dilatação dos vasos sanguíneos e estão presentes, inclusive, em fibroblastos, concluíram que a expressão diferenciada da taquicininina poderia estar envolvida no desenvolvimento da fisiopatologia.

Segundo OHTAKE *et al.* (2015) os neurotransmissores, incluindo a substancia P (SP) e neuroquinina A (NKA), são expansivos no sistema nervoso central e periférico, e seus receptores, NK1R e NK2R, também são expressos nas células imunológicas como MoDCs e macrófagos CD68 ou CD163, promovendo respostas imunológicas inatas e adaptativas. Referem que a ligação NKA-NK2R esteja envolvida na apresentação de antígeno das células dendríticas (DCs) e após essas células serem estimuladas por interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT-1) regulam a expressão de NK2R e assim acarretando na sinalização de neurotransmissores em DCs humanas. Embora, tenha sido investigado os efeitos desta sinalização na asma, os autores sugerem que a conversa cruzada neuroimune pode estar associada a outras patologias, incluindo as inflamatórias.

No presente estudo o TACR2 mostrou-se hiperexpresso, achado este que é importante por ser inicial, sem dado anterior na literatura relacionado a queiloide. O TACR2 promove resposta imunológica e como mencionam OHTAKE *et al.* (2015), sendo um alvo importante a ser investigado em

pesquisas usando antagonista desse receptor no intuito de diminuir a inflamação local. Porém, como aponta o estudo de GONZÁLEZ-SANTANA *et al.* (2016) o TACR2 além de estar envolvido no processo inflamatório, também está envolvido na proliferação da angiogenese e dilatação dos vasos sanguíneos, sendo este o quadro frequente dos pacientes com queiloide. Como não há estudo na literatura que relacione diretamente o gene TACR2 ao queiloide fica do presente estudo a contribuição ao conhecimento científico da hiperexpressão deste em queiloide de lóbulo de orelha não tratado comparado à pele normal.

Quanto ao gene GRIN1 com *fold change* de 2,0678 ( $p=0,002993$ ), sendo um gene hiperexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 9 (NC\_000009.12), é também conhecido como NR1; MRD8; GluN1; NMDA1; NDHMSD; NDHMSR; NMD-R1 e NMDAR1. A proteína codificada por esse gene é uma subunidade crítica dos receptores NMDA os quais formam um canal iônico dependente de ligante. Desempenham um papel fundamental na plasticidade das sinapses, estando relacionado à memória e ao aprendizado.

MASHKINA *et al.* (2010) referiram que o GRIN1 não é expresso apenas em células neuronais, mas em diversos tipos celulares, dentre elas, as células imunológicas como linfócitos T ativados. Após uma lesão ocorre uma sinalização para produção de inúmeras proteínas e fatores de crescimento como interleucinas, fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) e quimiocinas por macrófagos teciduais. Os autores sugeriram que a expressão deste receptor no sistema imunológico é induzida no cérebro como uma das principais mudanças nas células sinalizadoras, sendo este o ligante chave mediando a transmissão da sinalização entre o sistema nervoso e o sistema imunológico. Então acredita-se que a presença de linfócitos ativados aumentam drasticamente a expressão do receptor GRIN1.

TAM *et al.* (2015) descreveram que a angiogênese é de grande importância no processo de cicatrização; a formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura e cascata de sinalização a qual começa no momento da lesão, para restaurar o fluxo sanguíneo nos tecidos da ferida após a lesão para troca de nutrientes e metabólitos. Sabendo isso, os autores identificaram os genes responsáveis pelo processo de cicatrização de feridas, bem como vias associadas à angiogênese em diferentes períodos de tempo. Verificaram que a ativação do GRIN1 nas células cerebrais humanos promove estresse oxidativo intracelular.

A hiperexpressão do GRIN1 encontrada no presente estudo demonstrou-se como no gene anterior importante por ser um dado inicial, por não haver na literatura uma correlação desse receptor diretamente ao queiloide.

Quanto ao gene CCKBR com *fold change* de 2,0523 ( $p=0,003011$ ), sendo um gene hiperexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 11 (NC\_000011.10), é também conhecido como GASR; CCK-B; CCK2R. Esse gene codifica um receptor GPCRs para gastrina e colecistoquinina, peptídeos reguladores do cérebro e trato gastrointestinal encontrada principalmente no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal.

ROY *et al.* (2016) e FINO *et al.* (2012) relataram que o gene CCKBR apresenta relação com vários tipos de câncer, dentre eles, o pancreático e o colorretal, o qual está relacionado à gastrina, e esta, está presente apenas na fase fetal. No entanto, a mesma é expressa novamente em quadros neoplásicos. Porém, na literatura não há associação do gene CCKBR com queiloide, novamente com mesmo padrão dos genes anteriores.

Quanto ao gene AVPR1A, com *fold change* de 2,181 ( $p=0,000897$ ), sendo um gene hiperexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo

12 (NC\_000012.12), é também conhecido como V1aR; AVPR1; AVPRV1a. A proteína codificada por esse gene atua como receptor da arginina vasopressina, pertencente à subfamília dos receptores GPCRs, incluindo os receptores AVPR1B, V2R e OXT e medeia a contração e proliferação celular, agregação plaquetária, liberação do fator de coagulação e glicogenólise.

Não foi encontrada na literatura este gene relacionado ao queloide, com mesmo padrão inicial original como os genes anteriores, cruzando os descritores queloide ou cicatrização com o nome dos genes.

Quanto ao gene OXTR com *fold change* de 2,0113 ( $p=0,003828$ ), sendo um gene hiperexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 3 (NC\_000003.12), é também conhecido como OT-R. A proteína codificada por esse gene pertence à família de receptores GPCRs e atua como um receptor para a ocitocina.

Segundo BUSNELLI *et al.* (2012) em diferentes sistemas celulares, as múltiplas vias de sinalização ativadas por OTRs podem agir sinergicamente pelo acoplamento à proteína G. Este gene também pode ter efeitos opostos sobre a mesma função celular, como no caso de células neuronais em que a OT-R pode inibir ou estimular canais de potássio ( $K^+$ ). Da mesma forma, quando OT-R está acoplada a uma subunidade da proteína G ocorre a inibição do crescimento celular, também pode estimular o crescimento celular por sinalização da proteína G.

Para DEING *et al.* (2013) o OT-R é capaz de promover, inibir ou não ter nenhum efeito na proliferação de tipos celulares, mas os efeitos proliferativos são alterados por depleção de colesterol das membranas ou alterações do receptor OT-R. Os efeitos inibitórios deste receptor é mediado pela ativação de uma proteína dependente de calmodulina (CaMP) por via kainato (KA), enquanto os efeitos mitogênicos estão associados a

um aumento da fosforilação intracelular de cálcio e tirosina. Além disso também está associado as respostas neuroendócrinas ao estresse e processos inflamatórios. Verificaram que os fibroblastos dérmicos e queratinócitos expressam OT-R e seu receptor na dermatite atópica e os efeitos da sinalização deste receptor apontou correlação ao processo inflamatório cutâneo.

Os achados de SZETO *et al.* (2017) verificaram que esse receptor é expresso em células imunológicas como macrófagos derivados de monócitos e sua expressão é regulada pelos linfócitos B. Os autores relataram que a sua expressão acarreta na ativação de diversos fatores, dentre eles, a ativação da proteína quinase C, a qual irá fosforilar proteínas alvos como os receptores de glutamato.

No presente estudo, o gene OT-R, hiperexpresso, pode apresentar alguma similaridade com os achados de DEING *et al.* (2013), indicando relevância clínica para doenças inflamatórias da pele, como dermatite atópica no caso desses autores, e no caso do quelóide no presente estudo, que é definido com uma intensa reação inflamatória local e sistêmica no paciente portador do quelóide.

Quanto ao gene GRIK5 com *fold change* de -2,4197 ( $p=0,00235$ ), sendo um gene hipoexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 19 (NC\_000019.10), é também conhecido como KA2; EAA2; GRIK2 e GluK5. A proteína codificada pertence à família de canais iônicos dependentes de glutamato. O glutamato funciona como o principal neurotransmissor excitatório no Sistema Nervoso Central através da ativação de canais iônicos dependentes de ligantes e receptores de membrana acoplados à proteína G.

Os achados de CARTA *et al.* (2013) revelaram o mecanismo da fosforilação dependente de quinase II dependente de cálcio/calmodulina

(CaMKII), o qual é um constituinte importante para a regulação das sinapses glutamatérgicas e para a indução de potencialização de longo prazo (LTP) que também medeia a regulação deste receptor, leva à depressão a longo prazo dos receptores de kainato (KAR-EPSCs). Os autores verificaram que na ativação condicionante de NMDARs ocorre a depressão das respostas nativas mediadas por KAR de maneira rápida e reversível mediando uma forma de plasticidade de curto prazo dos KARs sinápticos, e para que isso ocorra depende da ativação da fosfatase calcineurina que interage com GluK2b resultando na indução a longo prazo (LTD) quando há um aumento da mobilidade do KAR a partir de locais sinápticos e estes são dependentes do GRIK5 independentemente do aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os KARs apesar de compartilharem muitas semelhanças estruturais e biofísicas com os AMPARs, também são específicos funcionais marcados que podem ter profundas consequências em sua capacidade de moldar a transmissão sináptica dos KARs, provavelmente compostos do GRIK5 mediam KAR-EPSCs envolvidas na integração de sinais sinápticos. Ainda relataram que outros estudos indicam que a ativação da proteína quinase C (PKC) regula o tráfego de KAR para a membrana e está envolvido na depressão sináptica dependente da atividade dos KARs e sugeriram que a fosforilação de GluK5 dependente de CaMKII resulta na dissociação do GRIK5 e retira os KARs de locais sinápticos.

Como foi observado por VERHIEL *et al.* (2015) a utilização de verapamil é uma opção de tratamento para o queiloide por ser um antagonista de cálcio. Observaram em seis estudos *in vitro* que ao bloquear o canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , reduz a produção de matriz extracelular (MEC), induz a síntese de procolagenase e inibe a interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e proliferação de fibroblastos como boa eficácia e sem efeitos colaterais. Embora o uso de corticosteroide

associado à cirurgia quando possível e à betaterapia como tratamento padrão para o queiloide, os achados de CARTA *et al.* (2013) podem explicar o uso de verapamil como uma opção terapêutica em alguns casos. No presente estudo gene GRIK5 foi hipoexpresso, sendo um dado a ser adicionado à literatura, e colocar esse gene como de interesse para novas investigações sobre a real função dos canais de Cálcio na gene do queiloide.

Quanto ao gene NPY2R com *fold change* de -2,9493 ( $p=0,001094$ ), sendo um gene hipoexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 4 (NC\_000004.12), e também conhecido como NPY2-R.

No estudo de PETECOF *et al.* (2018) o resultado foi condizente com o do presente estudo, onde NPY2R apresentou-se também hipoexpresso para queiloide de lóbulo de orelha não tratado. Na literatura anterior ao seu estudo não existe correlação do gene NPY2-R com queiloide e portanto torna esse gene como os anteriores de grande interesse para novos estudos.

Quanto ao gene GRM5 com *fold change* de -7,2333 ( $p=0,000627$ ), sendo um gene hipoexpresso no grupo estudo, localizado no cromossomo 11 (NC\_000011.10), também é conhecido como mGlu5; GPRC1E; MGLUR5 e PPP1R86. Sua expressão está restrita na região cerebral e codifica proteínas que estão envolvidas na regulação da atividade da rede neural e plasticidade simpática, sendo assim sua neurotransmissão está envolvida na maioria dos aspectos da função cerebral seja em condições normais ou neuropatológicas, além de serem GPCRs.

LEURQUIN-STERK *et al.* (2016) descreveram que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro e seu receptor está localizado principalmente nos terminais pós sinápticos e modula positivamente o receptor NMDA. SERGIN *et al.* (2017) relataram que os GPCRs são capazes de sinalizar de diferentes maneiras no interior das células através de um estímulo externo. Um deles é o GRM5, que está na



membrana plasmática e 60 a 90 % está associado com membranas intracelulares regulando o cálcio nucleoplasmático. Por isolamento farmacológico e por manipulação genética determinaram que quando o GRM5 está GPCR na membrana nuclear interna (INM) ocorre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosforilação da energia nuclear *Erk1/2* e ativação de genes precoces imediatos como *Elk-1* o qual é alvo nuclear da cascata MAPK/ERK, *Fos*, *Fosl1* e *fosl2*, os quais são proteínas reguladoras da proliferação, diferenciação e transformação celular.

KO *et al.* (2012) verificaram em cultura de células neuronais hipocampais que a ativação do GRM5 é regulada pela CaM quando há liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  por este receptor e a CaM regula a plasticidade sináptica das sinapses excitatórias e interage funcionalmente com os receptores NMDA. Quando O receptor GRM5 é ativado, desencadeia a fosforilação da PKC e essa fosforilação interrompe a ligação do CaM ao receptor e a alta afinidade da CaM por  $\text{Ca}^{2+}$  livre intracelular, diminui a expressão do GRM5. Referiram que o controle rigoroso da atividade deste receptor é crítico para a prevenção de doenças neurológicas e psicológicas.

Como todos genes diferencialmente expressos no presente estudo não foram encontrados na literatura estando relacionados ao queiloide, permite constatar que esse perfil inicial da expressão gênica de receptores de neurotransmissores de queiloide de lóbulo de orelha é original, e coloca todos esses 8 genes como genes de interesse para futuros estudos enfocando sua ação, sendo que alguns apresentam relação com o funcionamento de canais de cálcio.

Existem limitações desse 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 receptores de neurotransmissores, assim como a realização do *pool* pode apresentar

críticas. Ainda poderia ser confirmado a expressão gênica por análise da expressão proteica, assim como apresentar análise de vias canônicas por diferentes softwares.

Como perspectivas desse estudo, existe a necessidade de coleta de fragmentos e análise da expressão gênica de receptores de neurotransmissores em queiloide de lóbulo de orelha submetido ao tratamento com verapamil, antagonista de Cálcio; com corticosteroide intralesional; outras substâncias usadas no tratamento como toxina botulínica, entre outras, e comparar com os resultados obtidos no presente estudo. Avaliar o perfil inicial da expressão gênica em queiloides de outros tipos de apresentação como o plano ou os múltiplos, e em outras localizações. Também é necessário avaliar genes individuais de interesse obtidos no presente projeto. Assim, um completo perfil do padrão da expressão gênica do queiloide e futuramente desenvolver drogas que possam estimular ou silenciar genes para o tratamento definitivo do queiloide.

## **7.CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

O perfil inicial de expressão gênica de receptores de neurotransmissores de queiloide de lóbulo de orelha não tratado apresentou 8 genes diferencialmente expressos, sendo 5 hiperexpressos, TACR2, GRIN1, CCKBR, AVPR1A e OXTR, e 3 hipoexpressos, GRIK5, NPY2R e GRM5, sendo todos de interesse para pesquisa.

## **8. REFERÊNCIAS**

- Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):32-8.
- Babalola O, Mamalis A, Lev-Tov H, Jagdeo J. The role of microRNAs in skin fibrosis. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(9):763-76.
- Busnelli M, Saulière A, Manning M, Bouvier M, Galés C, Chini B. Functional selective oxytocin-derived agonists discriminate between individual G protein family subtypes. *J Biol Chem*. 2012;287(6):3617-29.
- Carta M, Opazo P, Veran J, Athané A, Choquet D, Coussen F, Mulle C. CaMKII-dependent phosphorylation of GluK5 mediates plasticity of kainite receptors. *EMBO J*. 2013;32(4):496-510.
- Deing V, Roggenkamp D, Kühnl J, Gruschka A, Stüb F, Wenck H, Bürkle A, Neufang G. Oxytocin modulates proliferation and stress responses of human skin cells: implications for atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2013;22(6):399-405.
- Enoshiri T, Naitoh M, Yamawaki S, Kawaguchi A, Aya R, Noda K, Katayama Y, Doi T, Kawaji T, Suzuki S.  $\beta$ -Adrenergic receptor blockers reduce the occurrence of keloids and hypertrophic scars after cardiac device implantation: A Single-Institution case-control study. *Plast Reconstr Surg*. 2017;139(5):1248-56.
- Ferreira AC, Hochman B, Furtado F, Bonatti S, Ferreira LM. Keloids: a new challenge for nutrition. *Nutrition Reviews*. 2010;68(7):409-17.
- Fino KK, Matters GL, McGovern CO, Gilius EL, Smith JP. Downregulation of the CCK-B receptor in pancreatic cancer cells blocks proliferation and promotes apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(11):1244-52.
- Furtado F, Hochman B, Farber PL, Muller MC, Hayashi LF, Ferreira LM. Psychological stress as a risk factor for postoperative keloid recurrence. *J Psychosom Res*. 2012;72(4):282-7.
- Gauglitz GG, Pavicic T. Emerging strategies for the prevention and therapy of excessive scars. *MMW Fortschr Med*. 2012;154(15):55-8
- González-Santana A, Marrero-Hernández S, Dorta I, Hernández M, Pinto FM, Báez D, Bello AR, Candenás L, Almeida TA. Altered expression of the tachykinins substance P/neurokinin A/hemokinin-1 and their preferred neurokinin 1/neurokinin 2 receptors in uterine leiomyomata. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1521-9.
- Haubner F, Leyh M, Ohmann E, Sadick H, Gassner HG. Effects of botulinum toxin A on patient-specific keloid fibroblasts in vitro. *Laryngoscope*. 2014;124(6):1344-51.

- Hochman B, Isoldi FC, Furtado F, Ferreira LM. New approach to the understanding of keloid: psychoneuroimmune-endocrine aspects. *Clin Cosm Investig Dermatol*. 2015a;8:67-7.
- Hochman B, Isoldi FC, Silveira TS, Borba GC, Ferreira LM. Does ear keloid formation depend on the type of earrings or piercing jewellery? *Australas J Dermatol*. 2015b;56:77-9.
- Hochman B, Vilas Bôas FC, Mariano M, Ferreira LM. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch, Brazil. *Acta Cir Bras*. 2005;20(3):200-12.
- Hou Z, Fan F, Liu P. BTXA regulates the epithelial-mesenchymal transition and autophagy of keloid fibroblasts via modulating miR-1587/miR-2392 targeted ZEB2. *Biosci Rep*. 2019;39(10).
- Hsieh SC, Lai CS, Chang CH, Yen JH, Huang SW, Feng CH, Chen YW, Li ZY. Nitric oxide: Is it the culprit for the continued expansion of keloids? *Eur J Pharmacol*. 2019;854:282-8.
- Hsu YC, Hsiao M, Wang LF, Chien YW, Lee WR. Nitric oxide produced by iNOS is associated with collagen synthesis in keloid scar formation. *Nitric Oxide*. 2006;14(4):327-34.
- Kashiyama K, Mitsutake N, Matsuse M, Ogi T, Saenko VA, Ujifuku K, Utani A, Hirano A, Yamashita S. miR-196a downregulation increases the expression of type I and III collagens in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 2012;132(6):1597-604.
- Ko SJ, Isozaki K, Kim I, Lee JH, Cho HJ, Sohn SY, Oh SR, Park S, Kim DG, Kim CH, Roche KW. PKC phosphorylation regulates mGluR5 trafficking by enhancing binding of Siah-1A. *J Neurosci*. 2012;32(46):16391-401.
- Leurquin-Sterk G, Van den Stock J, Crunelle CL, de Laat B, Weerasekera A, Himmelreich U, Bormans G, Van Laere K. Positive Association Between Limbic Metabotropic Glutamate Receptor 5 Availability and Novelty-Seeking temperament in Humans: An 18F-FPEB PET Study. *J Nucl Med*. 2016;57(11):1746-52.
- Luo LF, Shi Y, Zhou Q, Xu SZ, Lei TC. Insufficient expression of the melanocortin-1 receptor by human dermal fibroblasts contributes to excess collagen synthesis in keloid scars. *Exper Dermatol*. 2013;22(11):764-6.
- Mashkina AP, Cizkova D, Vanicky I, Boldyrev AA. NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. *Cell Mol Neurobiol*. 2010;30(6):901-7.
- Ohtake J, Kaneumi S, Tanino M, Kishikawa T, Terada S, Sumida K, Masuko K, Ohno Y, Kita T, Iwabuchi S, Shinohara T, Tanino Y, Takemura

- T, Tanaka S, Kobayashi H, Kitamura H. Neuropeptide signaling through neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors augments antigen presentation by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(6):1690-4.
- 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.
- Petecof RM, Gragnani A, Isoldi FC, Munoz GEH, de Noronha SMR, Corrêa SAA, Ferreira LM. Gene Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Keloids. *Ann Plast Surg*. 2018;81(6):646-2.
- Philandrianos C, Kerfant N, Jaloux C Jr, Martinet L, Bertrand B, Casanova D. Keloid scars (part I): Clinical presentation, epidemiology, histology and pathogenesis. *Ann Chir Plast Esthet*. 2016;61(2):128-35.
- Ramos ML, Gragnani A, Ferreira LM. Microarray as a new tool to study hypertrophic and keloid scarring. *Intern Wound J*. 2009;21(2):57-63
- Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*. 2006;2(7):e119.
- Rivera S, Jourquin J, Ogier C, Bernard A, Charton G, Tremblay E, Khrestchatisky M. The MMP/TIMP system in the nervous system. *Medic Scien*. 2004;20(1):55-60.
- Roy J, Putt KS, Coppola D, Leon ME, Khalil FK, Centeno BA, Clark N, Stark VE, Morse DL, Low PS. Assessment of holecystokinin 2 receptor (CCK2R) in neoplastic tissue. *Oncotarget*. 2016;7(12):14605-15.
- Sergin I, Jong YI, Harmon SK, Kumar V, O'Malley KL. Sequences within the C Terminus of the Metabotropic Glutamate Receptor 5 (mGluR5) are responsible for inner nuclear membrane localization. *J Biol Chem*. 2017;292(9):3637-55.
- Shimizu T, Kanai K, Kyo Y, Asano K, Hisamitsu T, Suzaki H. Effect of tranilast on matrix metalloproteinase production from neutrophils in-vitro. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(1):91-9.
- Sun P, Lu X, Zhang H, Hu Z. The Efficacy of Drug Injection in the Treatment of Pathological Scar: A Network Meta-analysis. *Aesthetic Plast Surg*. 2019.
- Szeto A, Sun-Suslow N, Mendez AJ, Hernandez RI, Wagner KV, McCabe PM. Regulation of the macrophage oxytocin receptor in response to inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;312(3):183-9.
- Tam JC, Ko CH, Koon CM, Cheng Z, Lok WH, Lau CP, Leung PC, Fung KP, Chan WY, Lau CB. Identification of Target Genes Involved in Wound



Healing Angiogenesis of Endothelial Cells with the Treatment of a Chinese 2-Herb Formula. PLoS One. 2015;10(10):0139342.

Verhiel S, Piatkowski de Grzymala A, van der Hulst R. Mechanism of Action, Efficacy, and Adverse Events of Calcium Antagonists in Hypertrophic Scars and Keloids: A Systematic Review. Dermatol Surg. 2015;41(12):1343-50.

Xiaoxue W, Xi C, Zhibo X. Effects of botulinum toxin type A on expression of genes in keloid fibroblasts. Aesth Surg J. 2014;34(1):154-9.

## **9. FONTES CONSULTADAS**

Wikigenes – Collaborative Publishing [Internet]. Disponível em

<https://www.wikigenes.org/>

PubMed [Internet]. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

DeCS: Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: Centro Latino Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde.

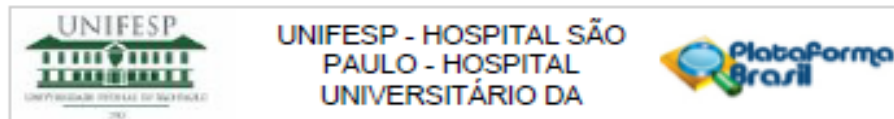
Disponível em <http://decs.bvs.br/>

## **10. NORMAS ADOTADAS**

Ferreira LM, organizadora. Projetos, dissertações e teses: orientação normativa: guia prático. São Paulo: Red Publicações; 2017.

## **11. APÊNDICES**

# APÊNDICE 1



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES DE NEUROTRANSMISSORES EM

**Pesquisador:** ALFREDO GRAGNANI FILHO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 43197915.7.0000.5505

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/IEPM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.905.870

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de emenda ao protocolo

**CEP 0256/2015**

O quelóide se desenvolve exclusivamente em humanos e está associado a uma alteração na cicatrização da pele. É uma lesão fibrosa dérmica com crescimento progressivo além da margem da ferida original e não regride espontaneamente. Estímulos na pele podem modificar o sistema nervoso cutâneo podendo haver, dessa forma, a exacerbação da inflamação neurogênica próxima a uma ferida traumática ou cirúrgica, que está sob tensão em suas margens. Isso é acompanhado pelo aumento nas concentrações de neuropeptídeos, que promovem o desenvolvimento de neurônios na pele. Dessa forma a inflamação neurogênica se constitui como fator importante na patogênese do quelóide.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a expressão de 84 genes relacionados aos receptores de neurotransmissores em quelóide

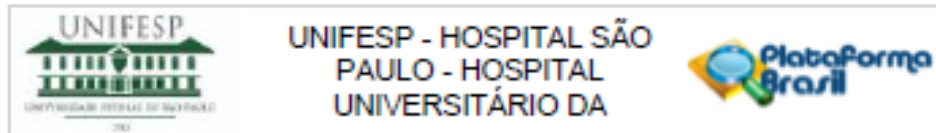
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

envio de emenda ao protocolo

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

emenda ao protocolo -

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.025-060  
 UF: SP Município: SÃO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.905.870

o número de fragmentos de quelóide de pacientes inicialmente estabelecido foi o de 16, que foi o número obtido junto aos pacientes, mas após a extração de RNA somente 12 amostras se mostraram adequadas para uso para o qRT-PCR, portanto deseja-se a alteração do n final do projeto, sendo que não muda estatisticamente a significância essa alteração, os experimentos foram realizados em triplicata.

2. foi adicionado aos métodos a ferramenta METACORE, que é um software que congrega bibliotecas de vias canônicas de genes e redes de genes em processos conhecidos, e foi utilizada e não estava no projeto inicial. Não modifica nada na obtenção dos fragmentos de quelóide e pele dos pacientes, somente nova metodologia que se usa com os resultados dos genes alterados obtidos na análise de RT-PCR.

3. O projeto dependia de fomento e inicialmente foi usado verba de projeto FAPESP do responsável número 2013/10905-0, mas como existiam outros projetos concomitantes ocorrendo dentro do escopo desse fomento, esse projeto em análise ficou para realização posterior, e uma nova aluna que foi responsável pelos procedimentos do mesmo que tem agora o projeto como dissertação de mestrado não tinha seu nome incluído no projeto ou no parecer do CEP quando da aprovação do mesmo, e solicitamos a inclusão do nome da aluna DAYANNE MAYER no mesmo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

emenda /carta apresentada

**Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:**

emenda aprovada

**Considerações Finais a critério do CEP:**

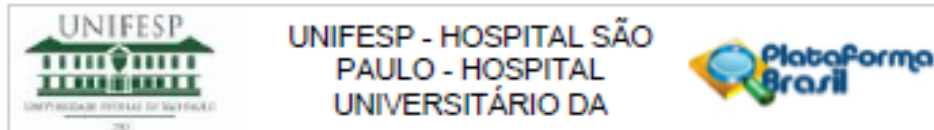
Parecer acatado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_602186_E1.pdf	08/09/2018 17:55:13		Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	08/09/2018	ALFREDO	Aceito

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
 Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-080  
 UF: SP Município: SÃO PAULO  
 Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br





Continuação do Parecer: 2.905.670

Outros	Carta_CEP.pdf	17:51:59	GRAGNANI FILHO	Aceito
Outros	Projeto_Corrigido.pdf	13/08/2018 12:03:55	ALFREDO GRAGNANI FILHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/04/2015 10:18:09		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	22/03/2015 19:12:39		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	expressao de neurotransmissores em quelolde.doc	22/03/2015 19:12:25		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Setembro de 2018

---

Assinado por:  
Miguel Roberto Jorge  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55  
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br

## APÊNDICE 2

Position	Symbol	Fold Regulation	Comments	p ≤0,05
A01	ADRA1A	2,1302	C	0,002267
A02	ADRA1D	-1,9036	OKAY	0,007157
A03	ADRA2A	1,8377	OKAY	0,021401
A04	ADRB2	2,1302	C	0,002267
A05	ADRB3	1,3754	OKAY	0,039332
A06	AVPR1A	2,181	OKAY	0,000897
A07	AVPR1B	-1,1961	B	0,497355
A08	BRS3	2,1302	C	0,002267
A09	CCKBR	2,0523	OKAY	0,003011
A10	CHRM1	2,1302	C	0,002267
A11	CHRM4	2,1302	C	0,002267
A12	CHRM5	2,1302	C	0,002267
B01	CHRNA3	2,1302	C	0,002267
B02	CHRNA4	1,8252	OKAY	0,009371
B03	CHRNA5	2,1302	C	0,002267
B04	CHRNA6	2,1302	C	0,002267
B05	CHRNA7	1,9323	OKAY	0,005845
B06	CHRNE	2,1302	C	0,002267
B07	CNR1	2,1302	C	0,002267
B08	DRD1	2,1302	C	0,002267
B09	DRD2	2,1302	C	0,002267
B10	DRD5	2,1302	C	0,002267
B11	GABBR1	2,1302	C	0,002267
B12	GABBR2	-1,5216	OKAY	0,021691
C01	GABRA1	2,1302	C	0,002267
C02	GABRA2	2,1302	C	0,002267
C03	GABRA4	2,1302	C	0,002267
C04	GABRA5	2,1302	C	0,002267
C05	GABRA6	2,1302	C	0,002267

C06	GABRB1	1,2457	B	0,937079
C07	GABRB3	2,1302	C	0,002267
C08	GABRD	1,7489	OKAY	0,007004
C09	GABRE	2,1302	C	0,002267
C10	GABRG1	2,1302	C	0,002267
C11	GABRG2	1,8356	OKAY	0,02974
C12	GABRG3	2,1302	C	0,002267
D01	GABRQ	2,1302	C	0,002267
D02	GABRR1	2,1302	C	0,002267
D03	GABRR2	2,1302	C	0,002267
D04	GCGR	2,1302	C	0,002267
D05	GRIA1	2,1302	C	0,002267
D06	GRIA2	1,4746	B	0,69923
D07	GRIA3	2,1302	C	0,002267
D08	GRIK1	1,8167	OKAY	0,007546
D09	GRIK2	2,1302	C	0,002267
D10	GRIK4	2,1302	C	0,002267
D11	GRIK5	-2,4197	OKAY	0,00235
D12	GRIN1	2,0678	OKAY	0,002993
E01	GRIN2A	2,1302	C	0,002267
E02	GRIN2B	2,1302	C	0,002267
E03	GRIN2C	-1,1023	B	0,568127
E04	GRM1	1,7334	B	0,107472
E05	GRM3	1,3039	B	0,785049
E06	GRM4	2,1302	C	0,002267
E07	GRM5	-7,2333	OKAY	0,000627
E08	GRM6	2,1302	C	0,002267
E09	GRM7	2,1302	C	0,002267
E10	GRM8	2,1302	C	0,002267
E11	GRPR	-1,6404	OKAY	0,003937
E12	HCRTR2	2,1302	C	0,002267
F01	HRH1	2,1302	C	0,002267
F02	HRH4	2,1302	C	0,002267
F03	HTR1A	2,1302	C	0,002267
F04	HTR1B	2,1302	C	0,002267

F05	HTR1D	2,1302	C	0,002267
F06	HTR1F	2,1302	C	0,002267
F07	HTR2A	2,1302	C	0,002267
F08	HTR2C	2,1302	C	0,002267
F09	HTR3A	-1,0789	B	0,504586
F10	HTR4	2,1302	C	0,002267
F11	HTR7	2,1302	C	0,002267
F12	NPY2R	-2,9493	OKAY	0,001094
G01	NPY5R	2,1302	C	0,002267
G02	NTSR2	2,1302	C	0,002267
G03	OXTR	2,0113	OKAY	0,003828
G04	PROKR2	1,3763	B	0,060032
G05	SCTR	2,1302	C	0,002267
G06	SSTR1	2,1302	C	0,002267
G07	SSTR2	2,1302	C	0,002267
G08	SSTR4	-2,2584	B	0,070395
G09	TACR1	2,1302	C	0,002267
G10	TACR2	2,0799	OKAY	0,002659
G11	TACR3	2,1302	C	0,002267
G12	TSPO	1,7846	OKAY	0,043934
H01	ACTB	-1,016	B	0,851727
H02	B2M	1,016	B	0,840543
H03	GAPDH	1,3682	B	0,213611
H04	HPRT1	2,0928	OKAY	0,002799
H05	RPLP0	3,5997	B	0,067882
H06	HGDC	2,1302	C	0,002267
H07	RTC	5,4851	OKAY	0,00036
H08	RTC	5,4435	OKAY	0,000307
H09	RTC	5,4893	OKAY	0,000271
H10	PPC	1,7717	OKAY	0,071398
H11	PPC	1,7888	OKAY	0,048929
H12	PPC	1,6867	OKAY	0,052673

### APÊNDICE 3

#### TACR2: receptor de taquicinina 2 (*tachykinin receptor 2*)

Também conhecido como: SKR; NK2R; NKNAR; TAC2R. Esse receptor é específico para variação 5' da sequência, interage com a proteína G e sete regiões transmembranas hidrofóbicas e codifica o receptor da substância K da neuroquinina A ou neuropeptídeo de taquicinina [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

#### GRIN1: subunidade 1 do tipo NMDA do receptor inotrópico de glutamato (*glutamate inotropic receptor NMDA type subunit 1*)

Também conhecido como: NR1; MRD8; GluN1; NMDA1; NMD – R1; NMDAR1. Esse gene codifica uma proteína cuja subunidade crítica é de receptor de N – metil – D – aspartato. São complexos de proteínas heterométricas com múltiplas unidades que forma um canal de íons com ligando – gated. Essas subunidades tem um papel crucial na plasticidade das sinapses a qual está implícita à memória e ao aprendizado. Como forma alternativa, variantes de transcrição emendadas foram descritas. Fatores específicos de células são utilizados para controlar a expressão de diferentes genes, contribuindo para a diversidade funcional das subunidades. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

#### CCKBR: receptor B de colecistoquinina (*cholecystokinin B receptor*)

Também conhecido como: GASR; CCKB; CCK2R. Este gene codifica o receptor acoplado à proteína G para gastrina e colecistoquinina, peptídeos reguladores do cérebro e trato gastrointestinal. É um receptor das gastrina do tipo B a qual tem grande afinidade tanto para análogos CCK sulfatados, quanto para os não sulfatados. Encontrada no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal. Splicing alternativo resulta em múltiplas variáveis de transcrição e uma variável de transcrição errada, observa – se em células tumorais coloretais e pancreáticas. [Fornecida por RefSeq, Dez 2015]

#### AVPR1A: receptor de arginina vasopressina 1A (*arginine vasopressina receptor 1A*)

Também conhecido como: V1Ar; AVPR1; AVPR; V1a. A proteína codificada por este gene atua como receptor de arginina vasopressina. Pertence a subfamília dos receptores acoplados à proteína G, incluindo os receptores AVPR1B, V2R e OXT. É estimulante de um sistema de segundo mensageiro de fosfatidilinositol e cálcio. Regula a contração e proliferação

celular, agregação plaquetária, liberador do fator de coagulação e glicogenólise. [fornecido por RefSeq, Jul de 2008]

OXTR: receptor de oxitocina (*oxytocin receptor*)

Também conhecido como: OT-R. Este gene codifica a proteína que pertence à família de receptores acoplados a proteína G. Esta proteína atua como receptor de oxitocina. O sistema receptor oxitocina – oxitocina tem um papel importante no útero durante o parto. Sua atividade é mediada por proteínas G que ativam o sistema segundo mensageiro fosfatidilinositol e cálcio. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

GRIK5: subunidade de tipo kainato de receptor ionotrópico de glutamato 5 (*glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 5*)

Também conhecido como: KA2; EAA2; GRIK2; GluK5. Este gene codifica a proteína pertencente à família dos canais iônicos com glutamato. Splicing alternativo resulta em múltiplas variáveis de transcrição. O glutamato é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central pelos canais de íons com receptores de membrana acoplados à proteínas G. A proteína que é codificada por este gene forma canais iônicos, principalmente, de kainato heterométrico que funciona com as subunidades dos genes relacionados. [fornecido por RefSeq, Jul 2008]

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

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

GRM5: receptor de metabotrópico de glutamato 5 (*glutamate metabotropic receptor 5*)

Também conhecido como: mGlu5; GPRC1E; MGLUR5; PPP1R86. Este gene codifica um membro da família de proteína G. Esta proteína é um receptor metabotrópico de glutamato a qual ativa um sistema segundo mensageiro de fosfatidilinositol e cálcio. Podendo estar envolvida na regulação da atividade neural e plasticidade da sinapse. A neurotransmissão glutamatérgico é de grande importância à função cerebral normal e na presença de neuropatologia pode ser estressada. [fornecido por RefSeq, Maio 2014]

## **12. ANEXOS**



**Solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M (pH 8,0):**

- a) Dissolver 186,1 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O em 700 mL de água.
- b) Ajustar o pH para 8,0 com solução de NaOH 10 M.
- c) Adicionar água ultrapura, q.s.p. 1000 mL.
- d) Esterilizar em autoclave a 121°C por quinze minutos.

Observações:

1) O EDTA é um agente quelante que impede a ação de enzimas sobre o material genético.

2) O EDTA é insolúvel em pH inferior a 8,0; por essa razão, é importante ajustar o pH antes de completar o volume.

**Solução-tampão tris-HCl (hidroximetilaminometano-ácido clorídrico) 1 M:**

- a) Dissolver 121 g de tris-base em 800 mL de água ultrapura.
- b) Ajustar o pH com HCl concentrado. Cerca de 70 mL de HCl são necessários para pH 7,4; e 42 mL, para pH 8,0.
- c) Adicione água ultrapura até completar 1000 mL.
- d) Autoclavar a 121°C por quinze minutos.

Obs.: O tris tem a função de manter constante o pH das soluções.

**Tampão de degradação**

NaCl 100 mM

Tris-HCl, com pH 8,0 10 mM

EDTA, com pH 8,0 25 mM

SDS 0,5%

Proteinase K 0,1 mg/mL