

RELATÓRIO FINAL

TÍTULO DO PROJETO: FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DA CICATRIZAÇÃO EM CÉLULAS-TRONCO DA PELE DE PACIENTES QUEIMADOS.

Nome do Aluno de Pós Doutorado: SAMUEL MARCOS RIBEIRO DE NORONHA

Nome do Supervisor: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO

RESUMO DO PROJETO PROPOSTO

As queimaduras atingem cerca de um por cento da população mundial e é a quarta principal causa de morte por lesões não intencionais nos Estados Unidos. Os pacientes com queimaduras possuem alta susceptibilidade à infecções, fator determinante na evolução da área afetada e no sucesso do tratamento clínico, pois está diretamente relacionada às taxas de morbidade e de mortalidade do grupo. A fim de se evitar a entrada e a proliferação de patógenos o organismo desencadeia uma resposta imune inata e/ou adquirida. A resposta inata é responsável pelas reações iniciais a qualquer infecção e desencadeia a resposta dos linfócitos e de seus produtos humorais, desencadeando uma resposta tardia específica e duradoura. As queimaduras produzem mudanças no padrão da resposta imune do paciente, representadas pelo estímulo à produção de genes ligados à resposta imune inata e pela supressão de genes relacionados à resposta imune adaptativa. Avaliar a expressão de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa é fundamental para o entendimento da evolução do trauma. Infecção e evolução clínica interferem na cicatrização da área queimada, e analisar em diferentes subpopulações celulares envolvidas na reepitelização e que compõem a epiderme desses pacientes queimados, torna-se um ponto chave para melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à resposta produzida por células-tronco da epiderme. Ademais, investigar o contexto destas subpopulações celulares, incapazes de gerar uma resposta imune competente para debelar o ataque de micro-organismos, como *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros, logo após o trauma, poderá nos trazer preciosas informações acerca de queimaduras e, com isto, propor possíveis mecanismos de se evitar a disseminação da infecção nestes pacientes. Ressaltando-se ainda, que após extensiva busca na literatura não existe artigo sobre expressão gênica nas células da pele, tronco ou não, em relação ao sistema imunológico e à cicatrização, processo onde as células da pele são fundamentais, existindo somente estudos em células sanguíneas quanto à imunidade em queimados. Além disso, adicionar outra variável que tem ação na imunidade e na cicatrização que é o fator de crescimento de queratinócitos, que pode ser utilizado no paciente queimado se sua ação benéfica for melhor entendida, é um avanço no tratamento desse complexo e grave trauma.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do KGF na expressão de 84 genes mediadores da resposta imune e de outros 84 genes associados à cicatrização em células diferenciadas e em células tronco de queratinócitos humanos primários provenientes de dois grupos, pacientes sem queimadura - controle - e pacientes com grande queimadura, e validar os dados de expressão gênica, com a expressão de proteínas traduzidas por alguns dos genes encontrados com expressão diferencialmente alterada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e cultivar queratinócitos humanos primários a partir de fragmentos de pele íntegra, viável, descartada das margens da pele queimada durante o desbridamento, e como grupo controle teremos pele descartada de cirurgia estética;

Tratar e não tratar os queratinócitos primários dos dois grupos com o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) com o intuito de avaliar o efeito deste fator de crescimento na expressão de genes relacionados ao sistema imune e de genes da cicatrização;

Separar as subpopulações tronco e não-tronco que compõem as culturas primárias de queratinócitos dos dois grupos, tratados e não tratados, do grupo controle e queimadura, por meio do ensaio de Aldefluor, que requer uso de citometria tipo FACS;

Extrair amostras de RNA total por meio de Trizol, de queratinócitos primários provenientes das amostras de pele submetidas a tratamento ou não dos diferentes grupos; e sintetizar DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNA total (1ug) para cada uma das condições (grandes queimados e pele normal; tratadas e não tratadas; células tronco e diferenciadas) por transcrição reversa, utilizando-se o Kit *RT2 First Stand (SABioscience)*;

Avaliar a expressão gênica por meio de RT-PCR *Array* quantitativo para cada amostra (em *pool*) de acordo com o protocolo do fabricante, realizado em triplicata;

Realizar a análise por Metacore® das vias canônicas principais envolvidas nos dois processos, imunidade e cicatrização (Objetivo foi adicionado, não estava no projeto original).

Avaliação da expressão proteica por Western Blot do meio de cultura de queratinócitos primários de pacientes queimados e normais, tratados ou não, células tronco ou diferenciadas (Objetivo não obteve sucesso por dificuldades técnicas relacionadas aos marcadores comprados e pelo final do prazo).

MÉTODOS

Casuística

Foram incluídos vinte pacientes neste estudo, sendo dez no grupo controle e dez no grupo experimento. Critérios de inclusão: 1.Grupo Queimado - Pacientes de ambos os sexos; Idade acima de 18 anos; Concordar em participar da pesquisa e assinar o termo de consentimento; Estar internado na UTQ-DCP-UNIFESP-HU-HSP; Necessidade de procedimento(s) operatório(s); Queimaduras de 2º grau profundo ou 3º grau acometendo entre 25% e 50% da superfície corpórea queimada ou que necessitem de enxertia de pele parcial em 10% de superfície corpórea queimada. 2.Grupo Controle: Idade acima de 18 anos; Ambos os sexos; Concordar em participar da pesquisa e assinar o termo de consentimento; Necessidade de procedimento operatório – cirurgia estética – abdominoplastia ou mamoplastia, com retirada de pele que seria descartada; Não apresentar doenças prévias; Não fumante.

O desbridamento do tecido necrosado de um paciente com queimadura de II grau profundo ou de III grau normalmente acontece 3 dias após a queimadura. As amostras de pele de adulto normal e com queimadura foram obtidas e a epiderme foi separada da derme por digestão enzimática através de dispase. O isolamento dos queratinócitos foi finalizado após tratamento com tripsina, centrifugação e sementeada das células em garrafas preparadas com camada sustentadora de J2-3T3. Após a terceira passagem, as células foram tratadas com 40 ng/ml de KGF em meio de cultura nos grupos experimentais onde esta programada a suplementação do fator de crescimento, sendo utilizada nas trocas de meio de cultura que ocorreram a cada dois dias, até ser atingida a sub-confluência (80%), após esse momento o meio de cultura foi armazenado em freezer -80°C para estudo da expressão proteica e as células foram destacadas da garrafa para ser extraído o RNA para análise da expressão gênica.

O kit Aldefluor (StemCell Technologies, Durham, NC, USA) foi utilizado para isolar populações com alta atividade enzimática de ALDH. Após separar subpopulações de queratinócitos provenientes da pele de pacientes queimados e normais por meio de FACS, tratadas ou não com KGF, estas células foram submetidas à extração de RNA total. Para cada paciente, 84 genes foram analisados e eram relacionados à cicatrização (PAHS-121Z), e também 84 genes que estão envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (PAHS-052) e em células-tronco e nas células não-tronco da epiderme, tratados ou não com KGF. A amplificação, a aquisição dos dados e a análise de curvas foram realizadas em um *ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

Análise de networks por meio do programa Metacore®

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

Estes dados experimentais foram carregados na página inicial do programa Metacore® (*Thonson Reuters*). Em seguida as redes foram construídas em tempo real e é única para os dados enviados. Neste fluxo de trabalho as redes são priorizadas com base no número de fragmentos de vias canônicas na rede. Esta é uma variante do algoritmo mais curto com caminhos principais cujos parâmetros são: 1) Enriquecimento relativo com os dados enviados, e 2) A saturação relativa de redes com vias canônicas. Esse programa é pago, e permite focar em vias mais alteradas frente aos genes diferencialmente expressos encontrados nos experimentos.

Análise Estatística

As alterações na expressão gênica na Cicatrização e na Imunidade Inata e Adaptativa induzidas pela queimadura foram analisadas por meio do *RT²-Profiler™ PCR Array (SA Biosciences)* e avaliadas por meio do teste t de *Student* no site da *SA Biosciences (Data Analysis v3.5)*. Os gráficos de Mapa de Calor e de Dispersão para cada uma das condições também foram gerados gratuitamente nesta página da empresa, assim como as comparações entre todos os grupos é realizada pelo programa. O nível de significância estatística foi fixado em 0,05 e os genes apresentados nos resultados apresentavam $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os pacientes incluídos no estudo foram num total de vinte (20), sendo dez (10) do grupo controle com média de idade de 41,1 e todas do gênero feminino, e dez (10) no grupo queimado com média de idade de 37,6 sendo 6 do gênero feminino e 4 do masculino (Tabela 1).

Tabela 1. Dados dos pacientes incluídos no estudo para cultura de queratinócitos.

Grupo	n	Média de Idade	Gênero
Controle	10	41,1	10F
Queimado	10	37,6	6F/4M

n= número de pacientes; F= feminino; M= masculino.

Após suplementação ou não de todos grupos, cultivo, separação de células tronco das não tronco, foi extraído o RNA e realizada a corrida das duas placas de *PCR Array* e obtenção dos dados por meio de curvas de amplificação em aparelho Real Time PCR, foram obtidos os dados brutos para a análise dos 84 genes estudados da via de cicatrização e outros 84 genes para a via de expressão de imunidade inata e adaptativa. Foram realizados os diversos cruzamentos entre as diferentes condições do experimento dentro de cada processo analisado, cicatrização ou imunidade, e para células não tronco e tronco.

CICATRIZAÇÃO CÉLULAS NÃO TRONCO

Quando realizado o cruzamento para marcadores de cicatrização para células não tronco entre controle e queimadura, ambas sem suplementação de KGF, foi encontrado 1 gene diferencialmente expresso, hipoexpresso, sendo o gene COL1A1 com -2,28 (Figura 1 e 2).

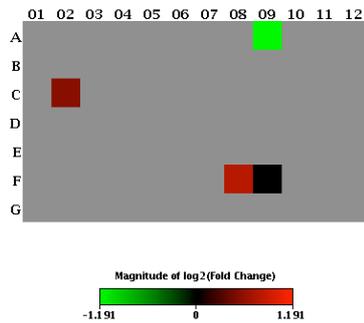


Figura 1 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de paciente controle (n=10) versus grande queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

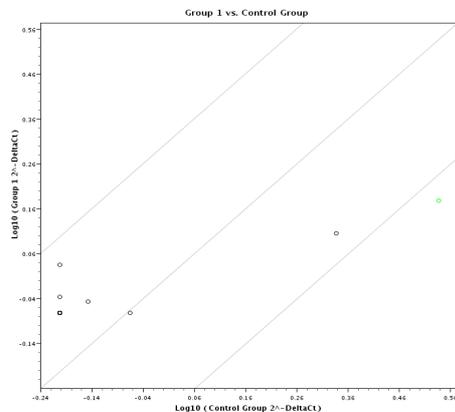


Figura 2 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de paciente controle (n=10) versus grande queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle sem suplementação de KGF e controle com suplementação de KGF, foram encontrados 4 genes diferencialmente expressos, hipoexpressos, sendo o gene CTNNB1 com -2,22; FGF2 com -3,74; IL10 com -4,53 e SERPINE1 com -3,44 (Figura 3 e 4).

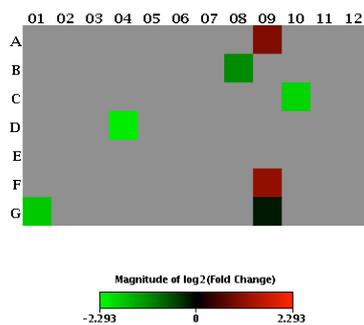


Figura 3 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

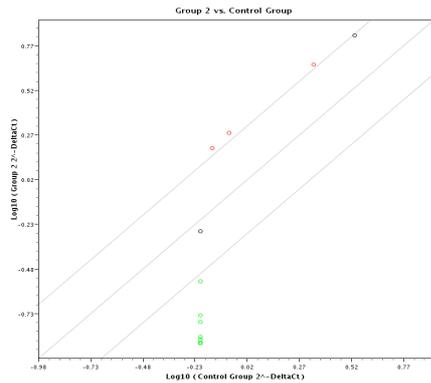


Figura 4 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, não foram encontrados genes diferencialmente expressos.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, foi encontrado 1 gene diferencialmente expresso, hipoxpresso, sendo o gene FGF10 com -3,55 (Figura 5 e 6).

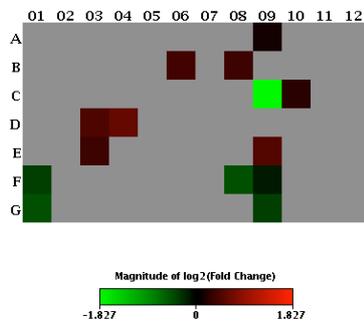


Figura 5 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

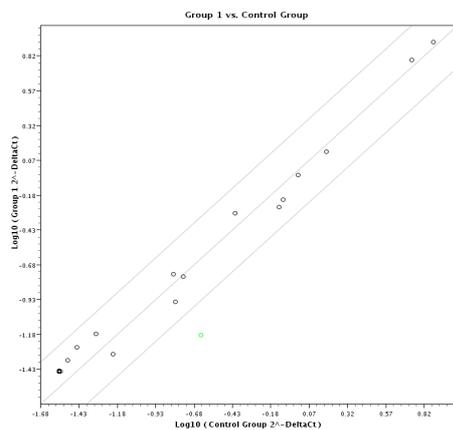


Figura 6 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre queimado sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 4 genes diferencialmente expressos, hiperexpresso, sendo o gene CSF3 com 3,46; IGF1 com 3,00; ITGA6 com 3,35 e MAPK1 com 1,97 (Figura 7 e 8).

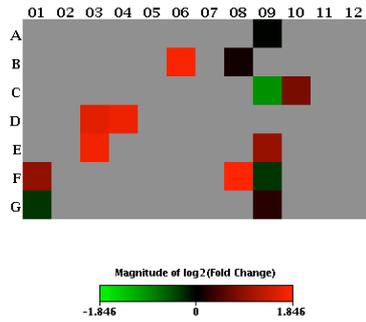


Figura 7 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) com suplementação de KGF.

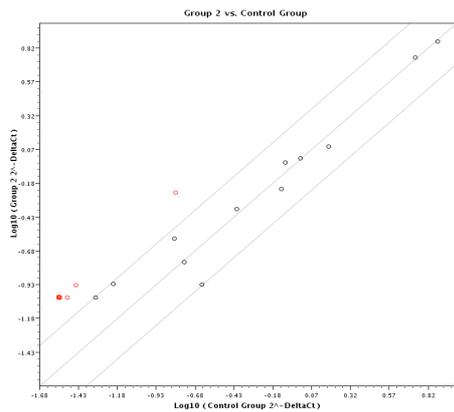


Figura 8 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 3 genes diferencialmente expressos, 2 hiperexpressos e 1 hipoexpresso, sendo o gene ITGA6 com 4,35; PLG com 3,32; e COL1A1 com -2,82 (Figura 9 e 10).

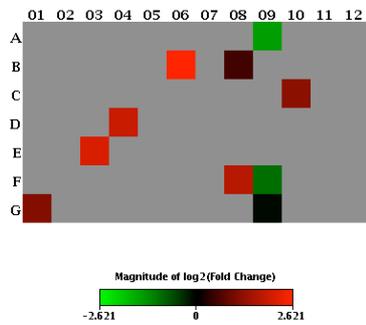


Figura 9 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) com suplementação de KGF.

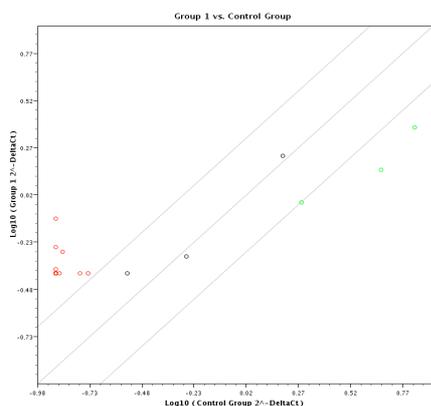


Figura 10 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus grande queimado (n=10) com suplementação de KGF.

CICATRIZAÇÃO CÉLULAS TRONCO

Quando realizado o cruzamento para marcadores de cicatrização para células tronco entre controle sem suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, não foram encontrados genes diferencialmente expressos.

Quando realizado o cruzamento entre controle sem suplementação de KGF e controle com suplementação de KGF, foram encontrados 2 genes diferencialmente expressos, 1 hiperexpresso e 1 hipoexpresso, sendo o gene CSF3 com 2,05; e FGF10 com -2,70 (Figura 11 e 12).

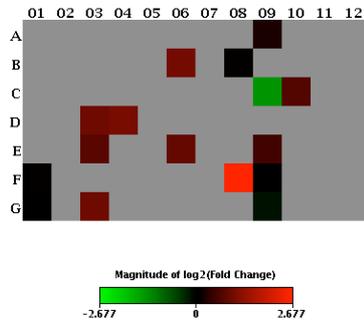


Figura 11 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

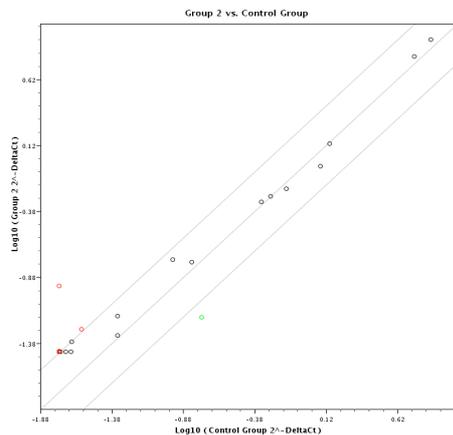


Figura 12 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 9 genes (11%) diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CSF3 com 5,42; FGF2 com 2,36; IGF1 com 4,38; IL10 com 4,57; ITGA6 com 4,44; ITGB3 com 4,81; MAPK1 com 2,08; MMP2 com 2,63; e TAGLN com 5,21 (Figura 13 e 14).

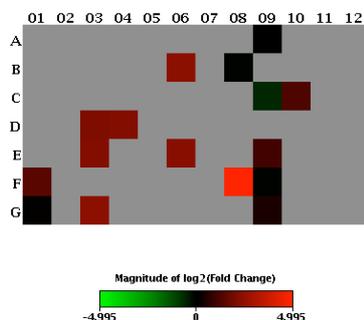


Figura 13 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

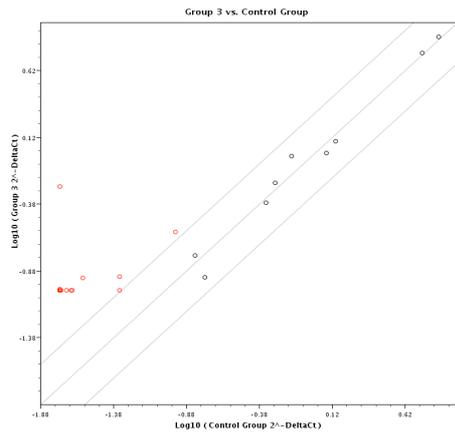


Figura 14 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, foi encontrado 1 gene diferencialmente expresso, hipoexpresso, sendo o gene FGF10 com -3,55 (Figura 15 e 16).

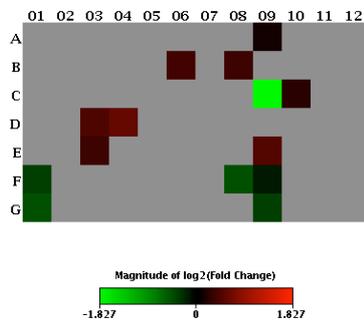


Figura 15 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

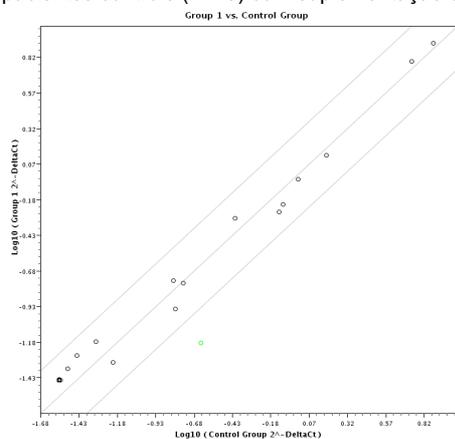


Figura 16 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre queimado sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 4 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CSF3 com 3,46; IGF1 com 3,00; ITGA6 com 3,35; e MAPK1 com 1,97 (Figura 17 e 18).

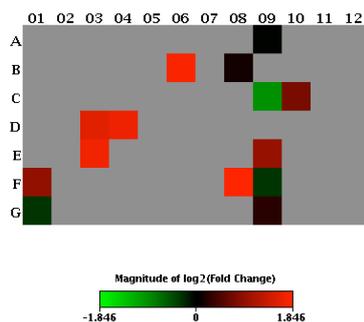


Figura 17 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

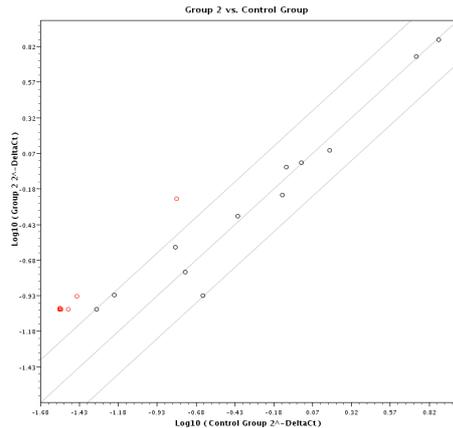


Figura 18 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 3 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CSF3 com 2,64; IGF1 com 2,20; e MMP2 com 2,49 (Figura 19 e 20).

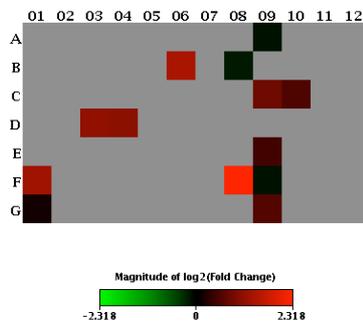


Figura 19 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

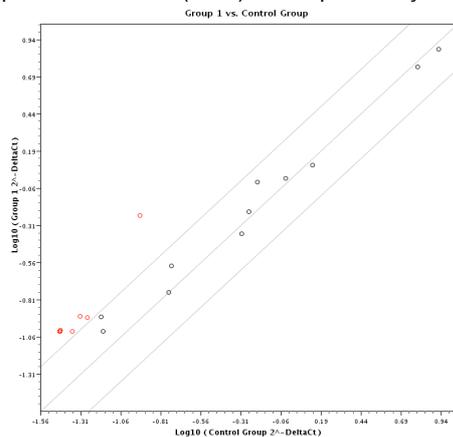


Figura 20 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica de cicatrização para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

IMUNIDADE CÉLULAS NÃO TRONCO

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células não tronco entre controle sem suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, não foram encontrados genes diferencialmente expressos.

Quando realizado o cruzamento entre controle sem suplementação de KGF e controle com suplementação de KGF, foram encontrados 2 genes diferencialmente expressos, hipoexpressos, sendo que o gene CD80 com -3,31; e CXCL8 com -3,16 (Figura 21 e 22).

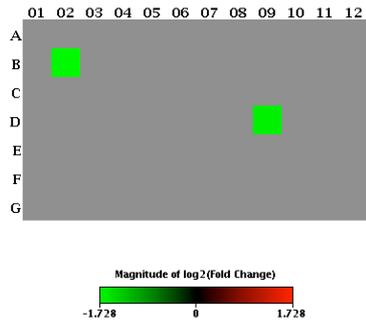


Figura 21 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

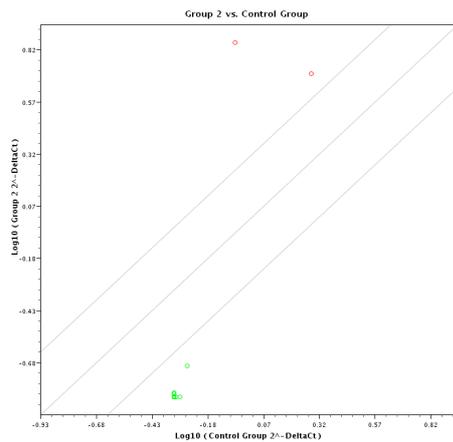


Figura 22 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células não tronco entre controle sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, não foram encontrados genes diferencialmente expressos.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, foram encontrados 4 genes diferencialmente expressos, hipoexpressos, sendo que o gene CCR4 com -5,12; IL6 com -4,57; CXCL8 com -4,17; e TLR9 com -5,42 (Figura 23 e 24).

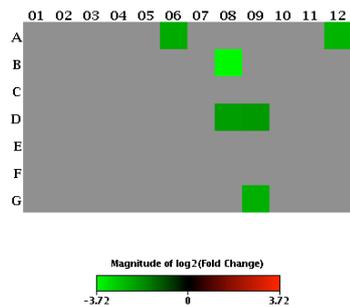


Figura 23 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

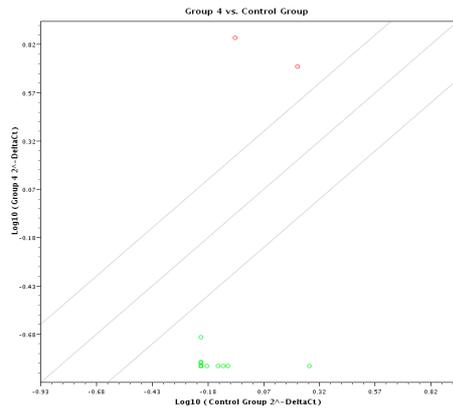


Figura 24 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre queimado sem suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, foram encontrados 3 genes diferencialmente expressos, hiporexpressos, sendo que o gene CRP com -1,93; IL6 com -2,13; e TLR9 com -2,52 (Figura 25 e 26).

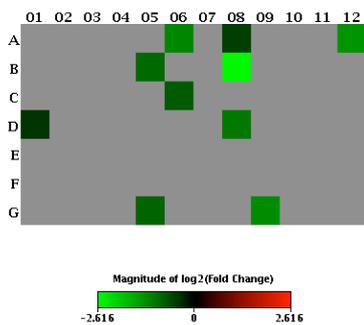


Figura 25 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

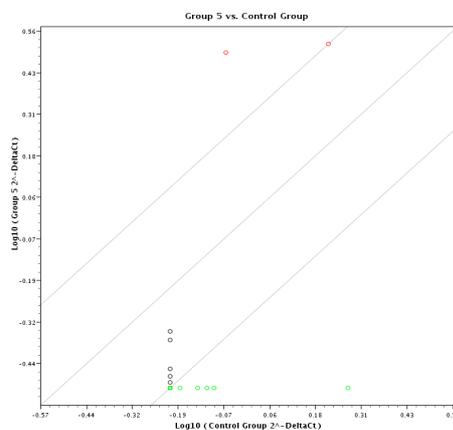


Figura 26 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos não célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento entre controle com suplementação de KGF e queimado com suplementação de KGF, não foram encontrados genes diferencialmente expressos.

IMUNIDADE CÉLULAS TRONCO

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre controle sem suplementação de KGF e queimado sem suplementação de KGF, foram encontrados 8 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CCR5 com 5,50; IL1R1 com 5,82; IL2 com 5,45; IL5 com 4,54; IRAK1 com 5,25; MAPK1 com 2,39; MAPK8 com 5,21; e TRAF6 com 5,40 (Figura 27 e 28).

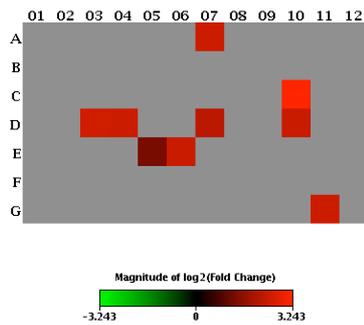


Figura 27 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

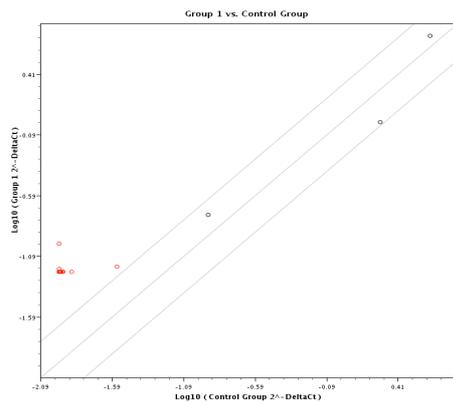


Figura 28 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre controle sem suplementação de KGF e controle com suplementação de KGF, foram encontrados 8 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CCR5 com 2,36; IL2 com 2,34; IL5 com 1,95; IRAK1 com 2,26; MAPK8 com 2,24; TLR7 com 2,87; TLR9 com 2,58; e TRAF6 com 2,32 (Figura 29 e 30).

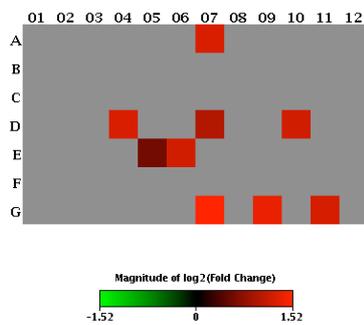


Figura 29 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

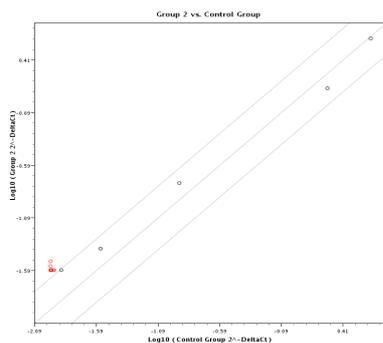


Figura 30 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus controle (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre controle sem suplementação de KGF e queimados com suplementação de KGF, foram encontrados 11 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene CCR5 com 25,17; IL17A com 25,60; IL2 com 24,96; IL23A com 26,01; IL5 com 20,78; IRAK1 com 24,03; MAPK1 com 9,98; MAPK8 com 23,86; RAG1 com 25,83; TLR7 com 25,77; e TRAF6 com 24,75 (Figura 31 e 32).

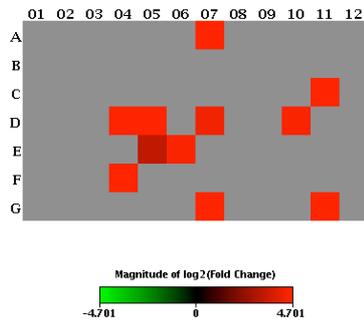


Figura 31 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

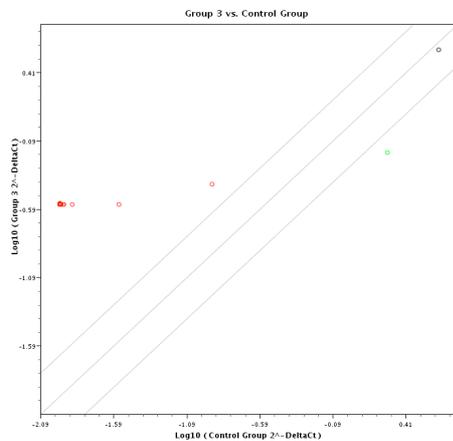


Figura 32 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre controle com suplementação de KGF e queimados sem suplementação de KGF, foram encontrados 3 genes diferencialmente expressos, 100% hipoexpressos, sendo o gene IL1R1 com -2,44; TLR7 com -1,93; e TLR9 com -2,14 (Figura 33 e 34).

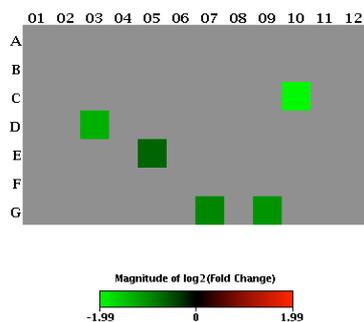


Figura 33 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

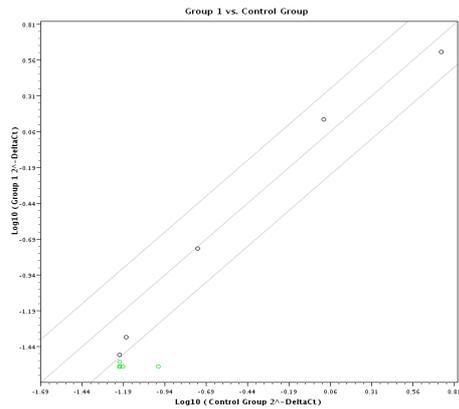


Figura 34 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) sem suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre queimado sem suplementação de KGF e queimados com suplementação de KGF, foram encontrados 6 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene IL17A com 4,62; IL1R1 com 4,36; IL23A com 4,70; MAPK1 com 4,17; RAG1 com 4,66; e TLR7 com 4,65 (Figura 35 e 36).

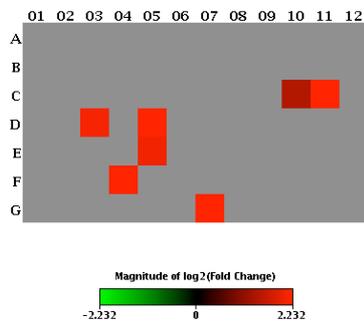


Figura 35 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

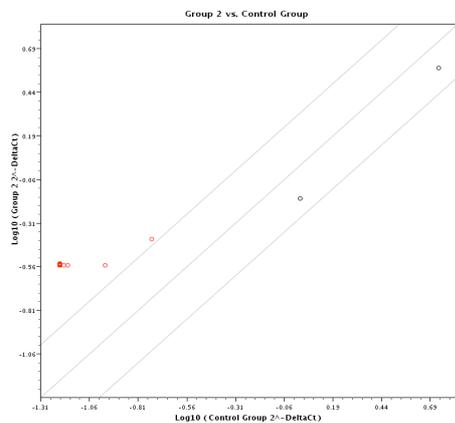


Figura 36 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes queimado (n=10) sem suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

Quando realizado o cruzamento para marcadores de imunidade para células tronco entre controle com suplementação de KGF e queimados com suplementação de KGF, foram encontrados 6 genes diferencialmente expressos, 100% hiperexpressos, sendo o gene IL17A com 10,74; IL23A com 10,92; MAPK1 com 6,65; RAG1 com 10,84; TLR7 com 8,98; e TLR9 com 9,81 (Figura 37 e 38).

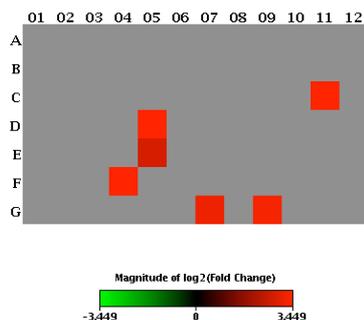


Figura 37 – Mapa de calor para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

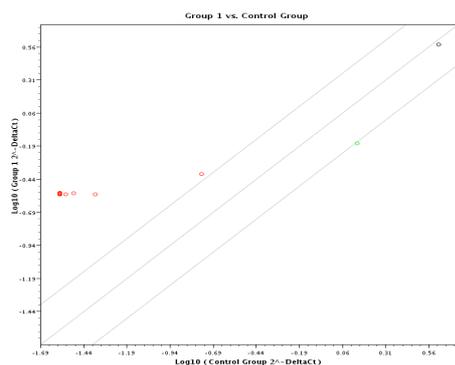


Figura 38 – Gráfico de dispersão para o cruzamento dos dados de expressão gênica da imunidade para queratinócitos célula-tronco de pacientes controle (n=10) com suplementação de KGF versus queimado (n=10) com suplementação de KGF.

DISCUSSÃO

A análise dos genes no presente estudo revelou um número menor de genes diferencialmente expressos relacionados à cicatrização do que à imunidade. Em relação aos dois processos, cicatrização e imunidade, os resultados da análise em células-tronco apresentou maior número de genes diferencialmente expressos. A seguir serão discutidos os genes alterados na cicatrização, e ressalta-se que 13 genes foram diferencialmente expressos em células não tronco, enquanto em células-tronco foram 19 genes. A discussão é baseada nos genes que se repetem em diferentes condições.

O gene COL1A1 codifica a cadeia pró-alfa 1 do colágeno tipo I, cuja tripla hélice compreende duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2. A redução na expressão desse gene em fibroblastos está associada ao envelhecimento cutâneo e mutações nesses gene estão associadas à osteogênese imperfeita tipo I-IV, Síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA e tipo clássico e osteoporose idiopática. No presente estudo o gene COL1A1 revelou-se hipoexpresso sem a suplementação de KGF no cruzamento do controle com queimado, somente em células diferenciadas. Portanto, a expressão desse gene não esteve relacionada com KGF, queimadura, pele normal, mas sim com a fase de diferenciação celular, sendo que quando foi estimulada por KGF, que tem como função deixar o queratinócito num estado proliferativo, mostrou que não foi expressa.

TAN et al. (2010) investigaram o papel do gene P311 em cicatrizes hipertróficas provenientes de pacientes queimados. Os pesquisadores notaram que houve expressão de P311 em fibroblastos mas não em células mononucleares do sangue, células da medula óssea e células epidérmicas. Foi realizada transferência do gene P311 em fibroblastos normais e foi observado que houve estímulo da expressão de alfa-actina de músculo liso (αSMA), TGFβ e alfa e COL1A1. O aumento na produção de COL1A1 e TGFβ em fibroblastos humanos induzido por P311 deve ser um dos mecanismos envolvidos na patogênese das cicatrizes hipertróficas e pode ser um novo alvo terapêutico.

O gene da metaloproteinase de matriz -2 (MMP-2) pertence a família de enzimas dependentes de zinco capazes de degradar componentes da matriz extracelular e moléculas envolvidas na transdução de sinal. Esse gene codifica a proteína gelatinase A, a colagenase tipo IV, que contém três repetições de fibronectina tipo II em seu sítio catalítico, permitindo a desnaturação de colágeno tipo IV e V e elastina. Além disso, MMP-2 está envolvida em processos no sistema nervoso, na regulação da vascularização e em metástase. O gene MMP-2 apresentou-se hiperexpresso no presente estudo em queimados suplementados por KGF em células-tronco, portanto em áreas de restauração da queimadura com maior número de células-tronco e estimuladas por KGF é sugerido que esse gene auxilie na migração e reepitelização.

KUBO et al. (2014) a fim de encontrar mecanismos para analisar o tempo da queimadura, principalmente em crianças que sofrem abusos, decidiram comparar as alterações temporais no processo de cicatrização com a expressão de 13 genes que participam desse processo. Para isso, foi analisado a expressão de citocinas (IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ), quimiocinas (KC, MCP-1), fatores de crescimento

(TGF- β , VEGF), proteases (MMP-2, 9, 13) e colágeno tipo I em amostras de pele de rato que sofreram queimaduras. As amostras foram analisadas por RT-PCR após 3, 6, 9, 12hs e 1, 2, 3, 5, 7 e 14 dias após queimadura e por histologia para avaliar as fases: inflamatória (3h a 1 dia), proliferativa (1 a 7 dias) e maturação (7 a 14 dias). As expressões de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ e KC aumentaram significativamente em padrão bifásico de 3hs a 1 dia e de 3 a 7 dias. A expressão de MCP-1 aumentou significativamente de 9h a 5 dias. Expressões de IL-10 e TGF- β aumentaram de 12hs a 7 dias e expressões de VEGF, MMP-2, MMP-13 e colágeno tipo I aumentaram de 3 a 14 dias. Expressões de MMP-9 aumentaram significativamente de 6 hs a 14 dias. Esses resultados sugerem que é possível avaliar a expressão de genes combinada com a estimativa da idade da queimadura. Esses resultados são compatíveis com o presente estudo.

WU *et al.* (2016) estudaram como o protooncogene Src participa da migração de queratinócitos durante o processo de cicatrização. Foi feita a hipótese de que as vias de sinalização extracelular regulada por quinase (ERK) e c-Jun N-terminal kinase (JNK) exercem papel na ativação de Src durante a migração de queratinócitos. O estudo demonstrou ainda que Src induz a expressão da proteína MMP-2 e diminui a expressão da proteína e-caderina. A expressão de MMP-2 mediada por Src parece ser regulada por ERK, evidenciando que a regulação de MMP-2 tem importante papel na migração de queratinócitos promovida por Src e é possível o estudo de um potencial terapêutico de Src no processo de cicatrização.

O gene da IL-10 codifica uma proteína que é uma citocina produzida principalmente por monócitos e, em menor grau pelos linfócitos. Esta citocina tem efeitos pleiotrópicos na imunoregulação e inflamação. O gene regula negativamente a expressão de citocinas Th1, antígenos MHC de classe II, e moléculas co-estimulatórias em macrófagos. Ela também aumenta a sobrevivência de células B, proliferação e produção de anticorpos. Esta citocina pode bloquear a atividade de NF-kappa B, e está envolvido na regulação da via de sinalização de JAK-STAT. Estudos em ratos knockout sugeriu a função desta citocina como um imunoregulador essencial no trato intestinal. Mutações neste gene estão associadas com um aumento da susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 e a artrite reumatoide. No presente estudo o gene IL-10 mostrou-se hiperexpresso em células-tronco de queimadura com KGF, portanto sugere que o KGF nessa linhagem celular estimula o aumento da expressão da IL-10, com função imunomoduladora, ao passo que em células diferenciadas mesmo estimuladas por KGF apresentou hipoexpressão, mostrando uma possível restrição à resposta imune.

KANG *et al.* (1994) demonstraram que, apesar de os queratinócitos humanos acumularem IL-10 *in vivo* intracelular após exposição aos raios UV, a produção e secreção mais potente de IL-10 na epiderme parece ser de macrófagos induzido por UV. Pele infiltrada de secreção de macrófagos de tal potente citocina imunoreguladora pode contribuir para o retardo do ambiente imunossupressor de queimaduras solares e a atividade de APC alterada dos macrófagos infiltrantes. KAWAKAMI *et al.* (1997) investigaram os níveis de citocinas no tecido local após a lesão térmica para identificar os tecidos responsáveis pelo aumento das mesmas. As amostras constaram de 6 ratos, cada um recebeu uma lesão por queimadura de 20% de espessura total e foram posteriormente cultivadas. As concentrações de fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-6 (IL-6), e IL-10 no meio de cultura foram medidos usando um ensaio ELISA. IL-6 em níveis não queimados de pele foram significativamente aumentados em 1 hora e diminuídos após 24 horas, em comparação com o controle. IL-6 no músculo subjacente à queimadura foram reduzidos em 8 horas. Nenhuma elevação do plasma de IL-6 foi observado após a lesão. Nem o fator de necrose tumoral-alfa e IL-10 foi detectada em qualquer tecido. Os resultados indicam que a pele não queimada pode ser uma importante fonte de produção de IL-6 após a lesão térmica e pode contribuir para as alterações fisiológicas que ocorrem após essa lesão.

O gene fator de crescimento de fibroblastos-10 (FGF-10), também conhecido como fator de crescimento de queratinócitos-2 (KGF-2) localiza-se no cromossomo 5 (5p13-p12) e é responsável por codificar a proteína de mesmo nome. A proteína FGF-10 atua em atividades mitogênicas, na queratinização de células epidérmicas e no aumento da deposição de tecido de granulação e colágeno sem agir diretamente em fibroblastos, exibindo papel semelhante à proteína FGF-7.

PLICHTA & RADEK (2012) estudaram a ação do FGF-10 e do dermatan sulfato (DS) na cicatrização de pacientes queimados. O FGF-10 encontra-se aumentado no microambiente da ferida e atua no processo de cicatrização, assim como o DS é o principal glicosaminoglicano (GAG) presente em feridas. Estudos demonstraram que a adição de DS poderia aumentar a habilidade do FGF-10 em promover a migração e proliferação de queratinócitos e a consequente reepitelização. Assim, DS atua como um cofator para a máxima responsividade do FGF-10 durante a reparação tecidual e a combinação dos dois pode servir como novo agente terapêutico para estimular a reepitelização. No presente estudo o FGF-10 apresentou-se hipoexpresso em células-tronco ou não, com ou sem KGF e em queimados e controles, portanto não existindo nenhum fator relacionado à sua expressão diferencial.

SEEGER & PALLER (2015) realizaram uma revisão a respeito do papel dos fatores de crescimento na migração de queratinócitos durante o processo de cicatrização. Foi encontrado que a família dos fatores de crescimento de fibroblastos apresenta pelo menos 22 representantes, e que o FGF-7 e o FGF-10 parecem ser os principais representantes que exercem efeitos mitogênicos e motogênicos (migração) nos queratinócitos. Também foi sugerido que níveis elevados de IL-1b e TNF-a presentes em feridas crônicas

levam ao aumento na expressão das MMPs, que degradam componentes da matriz extracelular e secretam fatores de crescimento como os FGFs.

O gene Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) codifica a proteína que está envolvida no crescimento e desenvolvimento do corpo humano. Estudos demonstraram que o efeito de uma queimadura grave tem como consequência alteração dos níveis sanguíneos de IGF-I (ABRIBAT et al., 1993). A redução do IGF-1 após queimaduras graves pode contribuir para prejudicar a cicatrização nestes pacientes (MULLER et al., 1991). No presente estudo o IGF-1 apresentou-se hiperexpresso, relacionado à queimadura e à suplementação do KGF. O KGF mostra aqui uma ação importante para ser analisada e utilizada na clínica como possível agente tópico para melhorar a cicatrização do queimado.

STROCK et al. (1990) examinaram os efeitos do IGF-1 no estado hipermetabólico pós queimadura. O estudo foi realizado com ratos que tiveram 50% de superfície corpórea queimada por escaldamento comparados com ratos que não sofreram queimadura. Metade dos ratos de cada grupo receberam doses de 1000 mcg/dia de IGF-1 e a outra metade recebeu volume equivalente de placebo por 14 dias. As taxas metabólicas foram medidas pelo consumo de oxigênio nos dias 3, 7, 10 e 14 após o trauma, pelo peso dos animais no mesmo intervalo e pela quantidade de IGF-1 sérica. Os resultados demonstraram que os níveis séricos de IGF-1 diminuíram significativamente após 14 dias nos ratos queimados comparados com aqueles que não sofreram queimadura. Além disso, os ratos tratados com IGF-1 tiveram um menor consumo de oxigênio e um aumento no peso comparados aos ratos queimados que receberam placebo. Isso sugere que IGF-1 provoca alterações na resposta metabólica pós queimadura e aponta um possível papel no tratamento de queimados.

SINGH et al. (1998) avaliaram a terapia com hormônio de crescimento em pacientes queimados. Foram selecionados 13 pacientes com queimaduras de segundo e terceiro grau que receberam rhGH (0,5IU/kg) por duas semanas e 9 pacientes que receberam apenas o tratamento conservador. Os resultados demonstraram que os pacientes que receberam rhGH apresentaram melhor cicatrização, menor formação de escaras, aumentos de hematócrito, cálcio, fósforo, taxa de filtração glomerular e elevação de IGF-1 sérico. Também houve menor perda de peso, menor produção de nitrogênio, diminuição da taxa catabólica e na duração da sepse e diminuição de 40% no período de internação dos pacientes. Por fim, a mortalidade dos pacientes que receberam tratamento com rhGH foi de 8,3% comparada com 44,5% do grupo não rhGH, demonstrando grande benefício desse tratamento.

AMIRI et al. (2014) realizaram um estudo experimental a fim de analisar os efeitos da terapia gênica de IGF-1 em feridas de rato. Foi feita cultura de fibroblastos, realizada transferência de IGF-1 nesses fibroblastos por meio do reagente Lipofectamina 2000 e os níveis de expressão gênica foram medidos por ELISA. Posteriormente, 15 ratos foram divididos em três grupos e foram criadas feridas no dorso de todos eles. Os fibroblastos com IGF-1 foram injetados na ferida de um dos grupos e foram comparados com feridas tratadas com fibroblastos nativos e com solução salina. Os resultados demonstraram que a terapia com IGF-1 provocou um aumento no número de queratinócitos durante o processo de cicatrização e que a formação de tecido de granulação foi mais organizada no grupo que recebeu fibroblastos com IGF-1 quando comparado com os outros grupos.

O gene fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2), também conhecido como bFGF, codifica a proteína FGF-2 que atua no desenvolvimento do sistema nervoso e no crescimento tumoral. Também exerce um importante papel no processo de cicatrização e na indução de angiogênese. Devido a presença de sítios de iniciação alternativos no gene, ele é capaz de codificar diferentes isoformas da proteína que variam em tamanho (18-24kDa). No presente estudo o FGF-2 apresentou-se hipoexpresso em células não tronco de controle, enquanto estava hiperexpresso em célula-tronco, estando relacionado à queimadura e à suplementação de KGF.

CHENG et al. (2002) estudaram os efeitos do bFGF em miofibroblastos de queimaduras durante o processo de cicatrização. O estudo foi realizado com 72 ratos que foram submetidos à água quente (98°C) e tiveram 30% de área corpórea queimada. Metade dos ratos recebeu tratamento com bFGF administrado a cada dois dias e a outra metade não sofreu nenhuma intervenção terapêutica. Foram utilizadas técnicas de hibridização *in situ* e imunohistoquímica para avaliar a expressão de caspase-3, alfa-actina de músculo liso (aSMA) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β). Os resultados demonstraram um aumento na expressão de aSMA significativamente maior no grupo bFGF do que no grupo sem tratamento ao 7º dia. No 14º dia, a expressão de aSMA permaneceu maior no grupo bFGF em comparação ao grupo controle porém houve uma redução da expressão comparada ao 7º dia. A expressão de TGF β também foi maior no grupo que recebeu bFGF. Em relação à caspase-3, sua expressão atingiu seu pico no 7º dia e inicialmente houve maior expressão no grupo sem tratamento, porém ao 7º dia ela apresentava-se maior no grupo com bFGF. Logo, o tratamento com bFGF aumenta a expressão de TGF- β e tem um efeito ativador nos outros fatores de crescimento que podem estimular a apoptose de miofibroblastos durante a cicatrização.

FU et al. (2003) investigaram a sequência na expressão de protooncogenes c-fos, c-myc e fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) em tecidos queimados e analisaram os efeitos que as alterações nesses genes podem provocar no processo de cicatrização. Amostras de queimadura de rato foram coletadas e analisadas por hibridização *in situ* e por imunohistoquímica e comparadas com tecidos não queimados durante 3h, 6h, 1 dia, 3 dias, 7 dias e 14 dias após queimadura. Os resultados demonstraram aumento na expressão gênica de c-fos no grupo queimado com pico às 6 hs e presença desse tanto no

núcleo de fibroblastos quanto de monócitos. A expressão de bFGF também foi maior no grupo queimado, atingiu seu pico no primeiro dia e foi encontrado no citoplasma de fibroblastos. O protooncogene c-myc apresentou seu pico no terceiro dia e também encontrava-se no citoplasma de fibroblastos. Assim, esses resultados mostram que a queimadura pode induzir a hiperexpressão desses genes, o que sugere importante papel na cicatrização e que as diferentes expressões de c-fos e c-myc atuam na regulação de bFGF. Foi hiperexpresso na queimadura no presente estudo.

O gene integrina subunidade alfa 6 (ITGA6), também conhecido como CD49f, VLA-6 e ITGA6B, codifica um membro da família das integrinas de cadeia alfa. As integrinas codificadas são proteínas integrais de membrana compostas por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, responsáveis pela adesão celular e sinalização. A subunidade alfa pode se associar com uma subunidade beta 1 ou beta 4 para formar uma integrina que interage com proteínas da matriz extracelular, como as lamininas. A integrina alfa 6 beta 4 pode promover tumorigênese enquanto a integrina alfa 6 beta 1 pode regular a sinalização de erbB2/HER2. O gene ITGA6 é um dos três genes cuja alteração está associada à epidermólise bolhosa e à atresia de piloro (EB-PA) (MUTLU et al., 2015). No presente estudo a ITGA6 apresentou-se hiperexpressa, relacionada à suplementação do KGF em queimados, nos dois tipos celulares.

A proteína codificada pelo gene CSF3 é uma citocina que controla a produção, a diferenciação e a função dos granulócitos. A proteína ativa é encontrada no meio extracelular, e variantes de *splicing* alternativo de transcritos foram descritos para este gene. As células estromais mesenquimais (MSCs) desempenham um papel importante na regeneração do tecido, principalmente através da secreção de fatores tróficos que melhoram a reparação de tecidos danificados. MIRANDA et al. (2015) estudaram os mecanismos parácrinos pelo qual uma população de MSC derivadas de cordão umbilical (UCX®) promove a capacidade de migração de fibroblastos dérmicos humanos e queratinócitos, que é altamente relevante para a regeneração da pele. Além disso, as diferenças entre as atividades parácrinas de MSCs a partir do tecido do cordão umbilical e da medula óssea (BM-MSCs) também foram avaliadas. Os ensaios de *scratch in vitro* revelou que meios condicionados (CM) obtidos a partir cultura de queratinócitos (HaCaT) e UCX®, e fibroblastos dérmicos humanos (HDF). Estes ensaios mostraram que a atividade mitogênica das células UCX (®) em a HaCaTs foi significativamente mais elevada do que a HDFs, em oposição ao efeito observado com CM produzido pela BM-MSCs que preferencialmente induzida migração HDF. Assim, a quantificação comparativa dos fatores-chave de importância vital nos estágios consecutivos de cicatrização de feridas revelaram perfis muito diferentes entre UCX (®) e BM-MSCs. As células UCX (®) apresentaram expressão relativamente mais elevada de EGF, FGF-2, KGF e apoia fortemente a indução precoce da migração dos queratinócitos e sua função, enquanto que o UCX (®) apresenta expressão do FEC-G sugerido por resultados adicionais na mobilização de células relacionadas com a cura incluindo CD34 (-)/CD45 (-) precursores (MSCs) que se sabe estarem envolvidas na regeneração do tecido. Deste modo, *in vitro*, ensaios de quimiotaxia e um modelo *in vivo* de transplante por quimiotaxia confirmou que UCX (®), são quimiotáticas para CD34 (-)/CD45 (-) BM-MSCs através de um mecanismo específico na mobilização de células mediadas por G-CSF. No geral, os resultados sugerem fortemente diferentes atividades parácrinas entre MSCs derivadas de diferentes fontes de tecido, revelando o potencial de UCX (®) para estender a capacidade de regeneração do organismo, complementando o papel endógena do BM-MSCs.

A seguir serão discutidos os genes alterados na imunidade, e ressalta-se que 9 genes foram diferencialmente expressos em células não tronco, enquanto em células-tronco foram 42 genes. A discussão é baseada nos genes que se repetem em diferentes condições.

O gene CCR-5 que codifica um membro da família de receptores de quimiocina beta, que é uma proteína transmembrana semelhante aos receptores acoplados à proteína G. Esta proteína é expressa por células T e macrófagos, e é conhecida por ser um importante co-receptor para o vírus macrófago-trópico, incluindo o HIV, para entrar nas células hospedeiras. Alelos defeituosos neste gene têm sido associados com a resistência à infecção por HIV. A expressão deste gene também foi detectada em uma linha de células pró-mieloblásticas, o que sugere que esta proteína pode ter um papel na proliferação e diferenciação da linhagem de granulócitos.

ISHIDA et al. (2012) mostraram em camundongos que a ausência de CCR5 reduziu a acumulação vascular de células progenitoras endoteliais derivadas da membrana basal (EPCs) e neovascularização, mas não o recrutamento de macrófago, e, eventualmente, a cura atrasada de feridas da pele. Quando transferidos para o CCR5 - / - ratos, células MB T CCR5 + / +, mas não CCR5 - / -, as células acumuladas no local da ferida, foram incorporadas na vasculatura, e restaurada a neovascularização normal. Consistente com estas observações, CCL5 induziu a migração de EPCs *in vitro* de uma forma dependente de CCR5. Além disso, a expressão de VEGF e TGF- β foi substancialmente reduzido em locais de feridas em CCR5 - / - ratos, o que sugere que EPCs são importantes, não só como os progenitores de células endoteliais, mas também como fonte de fatores de crescimento durante a reparação de tecidos. Tomados em conjunto, estes dados identificam a interação CCL5 / CCR5 como o que acredita-se ser um alvo molecular novo para a modulação da neovascularização e eventual reparação dos tecidos. No presente estudo CCR-5 foi diferencialmente expressa em células-tronco em queimado suplementado com KGF, que pode sugerir um estímulo a CCR-5 e neovascularização necessária ao processo de cicatrização.

O gene CXCL8 que codifica uma proteína da família quimiocina CXC, um dos principais mediadores da resposta inflamatória. Esta quimiocina é secretada por vários tipos de células e funciona como um

quimioatraente, e também como potente fator angiogênico. SPIEKSTRA et al. (2007) investigaram quais mediadores de cicatrização são liberados por substitutos da pele, epidérmicos ou dérmicos se as interações entre queratinócitos e fibroblastos estão envolvidas nesse processo. Foi usado ELISA, anticorpos neutralizantes e meio de cultura sobrenadante condicionado. Substitutos de pele total e autoenxertos produzem altas quantidades de mediadores inflamatórios e angiogênicos, IL-6, CCL2, CXCL1, CXCL8 e sST2. Substitutos epidérmicos ou dérmicos produzem menos desses mediadores. A IL-1 α e o TNF α realizam a mediação sinérgica da secreção desses mediadores, com exceção do sST2, de fibroblastos nos substitutos dérmicos. O substituto de pele total tem maior potencial de estímulo da cicatrização do que substitutos epidérmicos ou dérmicos.

O gene IL1-R1 codifica uma proteína que é receptor de um membro da família das citocinas interleucina-1 (IL-1). Esta citocina é uma citocina pleiotrópica envolvida em várias respostas imunitárias, processos inflamatórios, e na hematopoiese. Esta citocina é produzida por monócitos e macrófagos como uma pró-proteína, que é processada proteoliticamente e liberada em resposta à lesão celular e, assim, induz apoptose. Este gene e oito outros genes da família da IL-1 formam um grupo de genes de citocina no cromossomo 2. Tem sido sugerido que o polimorfismo deste gene está associada com a artrite reumatoide e doença de Alzheimer.

MAN *et al.* (1999) viu que em resposta a ruptura da barreira existe um aumento acentuado na epiderme de TNF- α e IL-1 e, para determinar o papel de TNF- α e IL-1 na mediação das alterações cutâneas, foram comparadas as cinéticas de recuperação de barreira e o grau de hiperplasia epidérmica e inflamação cutânea em receptor de TNF (p55) do receptor e IL-1 I tipo I (p80) em camundongos deficientes. A recuperação de barreira foi ligeiramente mais significativamente acelerada independente do método de ruptura da barreira em ratos deficientes do receptor de IL-1. O grau de hiperplasia epidérmica e inflamação cutânea seguinte a ruptura da barreira foi semelhante em controle, receptor de TNF, e os ratinhos deficientes em IL-1 do receptor. O estudo demonstra que o grau de hiperplasia epidérmica e inflamação não são alterados em ratinhos deficientes em ambos os receptores do TNF ou receptores de IL-1, indicando que nem o TNF nem a IL-1 por si só são essenciais para qualquer reparação da barreira ou patologia cutânea induzida pela perturbação da barreira.

No presente estudo a IL1-R1 mostrou-se somente em células-tronco, hiperexpressa em queimadura com e sem estímulo do KGF, e hipoexpressa em queimadura sem o estímulo do KGF, sugerindo que a célula indiferenciada responde diferentemente ao estímulo do KGF, necessitando um estudo mais detalhado para definir sua função específica na reepitelização e defesa do queimado.

O gene IL-2 codifica a proteína que é uma citocina importante para a proliferação de linfócitos T e B. O receptor dessa citocina é um complexo de proteína heterotrimérica cuja cadeia gama é também compartilhada por interleucina 4 (IL-4) e interleucina 7 (IL-7). A expressão deste gene em tímócitos maduros é monoalélica, o que representa um modo de regulação anormal para controlar a expressão precisa de um único gene. A ruptura direcionada de um gene semelhante em ratos conduz a doença colite ulcerativa, o que sugere um papel essencial deste gene na resposta imune aos estímulos antigênicos.

A imunossupressão que ocorre após lesão por queimadura causa um aumento na suscetibilidade à infecção. O objetivo de JAFARZADEH *et al.* (2013) foi o de investigar alterações relacionadas com o tempo de várias citocinas após lesão térmica e citocinas para modular o uso de um imunomodulador, a cimetidina. Os ratos foram anestesiados e uma área de 10% da superfície corporal total foi submetida à queimadura por imersão em água a 90°C durante 9s. Os níveis séricos de citocinas IL-2, IL-10, IL-12, IL-17 e TGF- β foram então avaliadas vários dias pós-queimadura. Em comparação com os ratos controle, não-queimados e saudáveis, os níveis de IL-2 e IL-17 estavam significativamente diminuídos em 3, 5, 10, e 14 dias após queimadura, os níveis de IL-10, 1, 3, 5, e 10 dias após queimadura, e os de IL-12 em 1, 3, 5, 10, e 14 dias após queimadura. A administração de cimetidina aumentou significativamente os níveis de IL-2 (em 3, 5, e 10 dias), IL-10 (em 1 e 5 dias), IL-12 (em 3, 5, 10, e 14 dias), e IL-17 (em 3 e 14 dias) em comparação com os queimados que não receberam drogas. Assim, a cimetidina foi capaz de aumentar significativamente a IL-2, IL-10, IL-12, e os níveis de IL-17.

JU *et al.* (2012) resumiram descobertas recentes baseado em microarray, q-PCR e estudos funcionais de 10 ratos mutantes duplos Scurfy (Sf), que são deficientes em FOXP3. Estes estudos revelaram funções pró-inflamatórias novas de IL-2 na regulação da inflamação de uma forma específica de órgão. IL-2 exerce a sua função pró-inflamatória órgão específico, regulando a migração e retenção de células T CD4 (+) células-T (Th1 e Th2), especificamente para a pele e pulmão. Além disso, a IL-2 também é necessária para a regulação da resposta de citocinas Th2 durante a ativação de células-T. Outros estudos sobre estes genes regulados de IL-2 vai ajudar a identificar novos alvos para intervenção em doenças inflamatórias da pele e do pulmão.

No presente estudo a IL-2 mostrou-se somente em células-tronco, hiperexpressa em queimadura com e sem estímulo do KGF, com um valor muito maior de expressão quando estimulada pelo KGF, e uma pequena hiperexpressão no grupo controle com estímulo do KGF, sugerindo que a célula indiferenciada responde diferentemente ao estímulo do KGF, também necessitando de um estudo mais detalhado para definir sua função específica na defesa do queimado.

O gene IL-5 codifica uma citocina que atua como um fator de diferenciação e crescimento de células B e eosinófilos. A citocina codificada desempenha um papel importante na regulação da formação de

eosinófilos, maturação, sobrevivência e recrutamento. O aumento da produção de citocina pode ser relacionada com a patogênese de doenças inflamatórias dependentes de eosinófilos. Esta citocina funciona por meio da ligação ao seu receptor, o que é um heterodímero, cuja subunidade beta é compartilhada com os receptores para a interleucina 3 (IL-3) e fator estimulante de colônia 2 (QCA-2/GM-CSF). Não foi encontrado na literatura estudos específicos da IL-5 e queimaduras.

No presente estudo obtivemos IL-5 somente em células-tronco, hiperexpressa em queimadura com e sem estímulo do KGF, com um valor muito maior de expressão quando estimulada pelo KGF, e uma pequena hiperexpressão no grupo controle com estímulo do KGF, sugerindo que a célula indiferenciada responde diferentemente ao estímulo do KGF, também necessitando de um estudo mais detalhado para definir sua função específica na defesa do queimado.

O gene IL-6 codifica uma citocina que atua na inflamação e na maturação de células B. Além disso, a proteína codificada foi descrita como pirógeno endógeno capaz de induzir febre em pessoas com doenças auto-imunes ou infecções. A proteína é produzida principalmente em locais de inflamação aguda e crônica, em que é secretada no soro e induz uma resposta inflamatória através de transcrição do receptor de IL-6 alfa. O funcionamento deste gene está implicado numa ampla variedade de estados de doença associados à inflamação, incluindo suscetibilidade a diabetes mellitus e artrite reumatoide juvenil sistêmica.

LI et al. (2016) referiram que as células mesenquimais (MSCs) podem promover a reparação epitelial pulmonar após a lesão inflamatória, no entanto, o mecanismo que medeia este efeito permanece obscura. Os autores examinaram o papel de MSCs (células AT-II) a restauração de células epiteliais na sequência de um insulto inflamatório alveolar tipo II. As células AT-II foram expostas às citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral-alfa, IL-6 e IL-1beta, em seguida, foram co-cultivadas com MSC durante 72 h. A proliferação celular, expressão de proteína tensioativa A (SP-A) e a expressão da subunidade alfa1 foram avaliadas respectivamente pela contagem celular, Western blot e PCR semiquantitativa. O siRNA do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) foi aplicado para animais knockdown os principais fatores citoprotetores em células MSC. Na sequência do insulto inflamatório, as células AT-II foram observadas, exibindo as características de morfologia celular lesionada, reduziu a proliferação celular e reduzida expressão de SP-A e a subunidade alfa1. A co-cultura com MSCs melhorou significativamente essas deficiências celulares, enquanto que estes benefícios foram enfraquecidos pela aplicação de KGF siRNA. Ao mesmo tempo, os níveis de proteína quinase B fosforilada (AKT) e rapamicina em células AT-II, com expressão regulada positivamente pelas células MSC, sugerindo ativação da fosfoinositida 3-quinase (PI3K). Estes dados demonstram que a administração de MSC para a insulto por inflamação em células AT-II pode melhorar as deficiências através de uma via de sinalização dependente de KGF PI3K/AKT/mTOR.

No presente estudo obtivemos IL-6 somente em células não tronco, portanto sugere ser dependente da diferenciação celular, hipoexpressa e hiperexpressa em queimadura sem estímulo do KGF e com, respectivamente, sugerindo ser uma resposta relacionada à queimadura, mas não dependente do estímulo do KGF, mostrando resultado diverso de LI et al. (2016), que foi um estudo em células do epitélio pulmonar e não da pele como o presente estudo.

O gene IL17A codifica uma proteína que é uma citocina pró-inflamatória produzido por células T ativadas. Esta citocina regula as atividades de proteínas quinases ativadas por mitógenos NF-kappaB. Esta citocina pode estimular a expressão de IL-6 e ciclooxigenase-2 (PTGS2 / COX-2), bem como aumentar a produção de óxido nítrico (NO). Os níveis elevados de citocinas estão associados com várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo a artrite reumatoide, psoríase e esclerose múltipla. Especificamente a família IL17 tem sido associada com o pior prognóstico em câncer de mama, por efeitos diretos nas células tumorais promovendo a sobrevivência das células tumorais e a invasividade, atuando na regulação da angiogênese tumoral e por interações com células mielóides supressoras (MDSCs) que inibem a resposta imune antitumoral e colabora no sítio de metástase à distância (WELTE & ZHANG, 2015).

No presente estudo a IL17A apresentou-se hiperexpressa somente em células-tronco de paciente com queimadura que recebeu suplementação de KGF. Como não existe literatura relacionando IL17A e KGF ou queimadura, podemos associar o achado de invasão de célula tumoral e angiogênese para a queimadura, e sugerir que essa hiperexpressão somente em células-tronco com KGF seja uma possível resposta positiva para a migração e aceleração do fechamento das feridas.

O gene IL-23A codifica uma subunidade da citocina heterodimérica IL-23. IL23 é composto por esta proteína e a subunidade p40 da interleucina 12B (IL12B). O receptor de IL23 é formado pela subunidade beta 1 de IL-12 (IL12RB1) e uma subunidade específica IL23, IL23R. Ambos, IL23 e IL12, podem ativar o ativador de transcrição STAT4, e estimular a produção de interferon-gama (IFNG). Em contraste com IL12, que atua principalmente em células T CD4 (+) jovens, IL23 atua preferencialmente nas células T CD4 (+) de memória. A interleucina-23 é reconhecido por desempenhar um papel no recrutamento de células inflamatórias em uma célula T auxiliar (Th) em uma doença mediada.

LEE et al. (2004) examinaram lesões da pele da psoríase para a produção da IL-23, que é composta por duas subunidades: uma subunidade p19 e uma única subunidade p40 partilhada com a IL-12. Encontraram um aumento de mRNA p19 por PCR na pele lesionada em comparação com a pele não lesionada. A subunidade p40, partilhada pela IL-12 e IL-23, apresentou um aumento de 11,6 vezes em comparação com a pele não lesionada, mas a subunidade p35 de IL-12 não mostrou aumento na pele

lesionada. IL-23 foi expressa principalmente por células dérmicas e um aumento da imunorreatividade de p40 foi visualizado em grandes células dérmicas nas lesões. Esses dados sugerem que a IL-23 desempenha um papel mais dominante do que a IL-12 no tratamento da psoríase, um tipo Th1 de doença inflamatória humana.

GANZETTI *et al.* (2015) estudaram a expressão imuno-histoquímica de interleucina-17 (IL-17), IL-23 e p73 em 35 melanomas malignos e os comparou com nevos melanocíticos benignos e nevos de Spitz, correlacionando-os com variáveis clínico-patológicas. Diferença significativa na intensidade e na porcentagem de células coradas de IL-17 e IL-23 foi encontrada no grupo de melanoma de nevos benignos em comum, que não se correlacionam com a espessura de Breslow, nem o nível de Clark. Além disso, a coloração p73 e a porcentagem de células coradas foi significativamente maior em todos os melanomas estudados, com uma distribuição citoplasmática peculiar. Essas descobertas podem sugerir um possível envolvimento da IL-17, IL-23, e do p73 em melanomas cutâneos com um impacto na invasão do melanoma.

No presente estudo a IL23A apresentou-se hiperexpressa somente em células-tronco de paciente com queimadura que recebeu suplementação de KGF, com resultado semelhante ao da IL17A.

O gene receptor de interleucina 1 associado a quinase 1 (IRAK1) codifica uma proteína quinase que é responsável pela hiper regulação da transcrição do fator NF-kappa B. O sistema imune inato está equipado com mecanismo sensível e eficiente para fornecer uma primeira defesa imediata, linha contra infecções. Receptores Toll-like (TLR) detectam agentes patogênicos e o receptor da IL-1 (IL-1R) permite que as células respondam rapidamente com as citocinas inflamatórias através de uma resposta protetora eficiente. A IL-1 quinases receptoras ativadas (IRAKs) são mediadores chave nas vias de sinalização de TLR/IL-1 Rs. Por meio das suas funções de quinase e do adaptador, IRAKs iniciam uma cascata de eventos de sinalização levando eventualmente à indução da expressão do gene alvo inflamatória. Devido a este papel central, a função da IRAK também é altamente regulada através de vários mecanismos (GOTTIPATI *et al.*, 2015). No presente estudo o gene IRAK1 apresentou-se hiperexpresso somente em células-tronco de pacientes com queimadura que receberam suplementação de KGF. Como não existe literatura relacionando IRAK1 e KGF ou queimadura, podemos associar com essa função chave de mediação da sinalização da defesa inata, e sugerir que essa hiperexpressão somente em células-tronco com KGF seja uma possível resposta positiva para a defesa do paciente queimado, que pode ser mediada pelo KGF.

O gene proteína quinase 1 ativada por mitógeno (MAPK1) codifica uma proteína da família MAP quinase. As proteínas MAP quinases atuam como ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidos em diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação da transcrição e desenvolvimento celular. Um estudo sugere que essa proteína atua como um repressor transcricional independente de sua atividade quinase.

O gene da proteína quinase 8 ativada por mitógeno (MAPK8) codifica uma proteína da família MAP quinase. A ativação dessa proteína pelo TNF-alfa é fundamental para a apoptose induzida. Também está associada a apoptose induzida por radiação UV, relacionada a via de morte celular do citocromo c. Estudos mostram também que essa proteína quinase desempenha papel fundamental na proliferação, apoptose e diferenciação de células T.

A regulação da proliferação e diferenciação de queratinócitos é um processo complexo e dinâmico, que envolve a ativação de múltiplas vias de sinalização desencadeada por diferentes fatores de crescimento. O fator de crescimento de queratinócitos (KGF) é um mitogeno potente, mas de forma diferente de outros fatores de crescimento, é também um indutor potente de diferenciação. As vias de MAP-quinase e AKT estão envolvidas na proliferação e diferenciação de muitos tipos de células, incluindo queratinócitos. Os resultados mostraram que os mecanismos de ação de KGF e que é a ativação sustentada da cascata de sinalização MAPK provoca uma regulação negativa da AKT dependente da dose. Também demonstrado a expressão crescente de substratos, tais como KGFR PAK4 durante a diferenciação de queratinócitos paralela à regulação positiva do receptor (LOTTI *et al.*, 2007).

No presente estudo o gene MAPK1 apresentou-se hiperexpresso somente em células-tronco de pacientes com queimadura que receberam ou não a suplementação de KGF, sendo um valor maior nos que receberam. A MAPK1 também apareceu na avaliação da cicatrização, hiperexpressa em células-tronco ou não em queimadura estimulada por KGF. A MAPK8 apresentou-se hiperexpressa somente em células-tronco de queimado e controle, com e sem estímulo de KGF. Portanto, para ambos, o KGF não foi determinante, assim como se a célula era diferenciada ou não e para queimado e controle. Esses achados sugerem que a regulação e ação das MAPK é muito completo e depende de várias variáveis, necessitando de novos estudos para detalhar o funcionamento desses mecanismos.

O gene 1 ativador da recombinação (RAG1) codifica uma proteína envolvida na ativação da recombinação da imunoglobulina VDJ. Está envolvida também no reconhecimento do substrato do DNA. Mutações do gene RAG em humanos estão associados com grande espectro de fenótipos clínicos, desde severa imunodeficiência até a doenças autoimunes.

O fator de crescimento de fibroblastos 7 (FGF-7), ou também chamado fator de crescimento de queratinócitos (KGF) é uma glicoproteína de 163 amino ácido sintetizada e segregada por células mesenquimais (fibroblastos ou fibrócitos) em órgãos epiteliais, funcionando assim como um mediador paracrina de proliferação de células epiteliais. Na bexiga urinária, o FGF-7 é transportado a partir da lâmina através da membrana urotelial para onde, em última análise, liga-se a variantes de processamento do

receptor de FGFR2 presentes na superfície basolateral das células epiteliais de transição. Foi aplicado 100 microgramas/ml de FGF-7 recombinante (rFGF-7) a ratos RAG1-deficiente (n=3), durante 7 dias e observou-se uma expansão marcante do urotélio da bexiga urinária. Esta expansão foi caracterizada por uma camada de urotélio estratificada acima de 20 células de espessura e por imunocoloração positiva para o marcador de proliferação Ki-67. Em contraste, os ratos RAG1-deficientes (n=3) que receberam apenas injeção de tampão não mostraram expansão urotelial detectável. O rFGF-7 foi detectado por análise de imunotransferência no soro, mas não na urina, a partir de ratos RAG1 deficientes que receberam a proteína recombinante. Os ratos que têm uma ruptura direcionada no gene que codifica a V(D)J RAG1 gene de ativação de recombinação têm pequenos órgãos linfóides sem linfócitos T e B maduros, devido à incapacidade de os progenitores de células para realizar a V(D)J recombinação. A atividade biológica de FGF-7 em ratos RAG-1 indica que os mecanismos dependentes da imunidade não são necessários para a indução da proliferação de células uroteliais por este fator de crescimento específico das células epiteliais (BASSUK et al., 2003).

O gene TLR7 codifica uma proteína da família dos receptores tipo Toll que têm papel essencial no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata. Receptores tipo Toll reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são expressos em agentes infecciosos, e medeiam a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de uma imunidade efetiva. Esse gene é predominantemente expresso em pulmão, placenta e baço, e fica a pouca distância de outro gene dessa mesma família, TLR8, no cromossomo X.

Imiquimod é conhecido por exercer os seus efeitos através do receptor de tipo Toll 7 (TLR7) ou TLR8, resultando em expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Os queratinócitos não são conhecidos por expressar TLR7 e TLR8, e a ação de imiquimod pode ser mediada pelo receptor da adenina e não de TLR7 ou TLR8. No estudo de LI et al., (2013) revelou a expressão de TLR7 em queratinócitos após a diferenciação induzida por cálcio. Depois da adição de cálcio à cultura de queratinócitos, as respostas imunológicas induzidas por imiquimod, tais como a ativação de NF- κ B e a indução de TNF- α e IL-8, foram mais rápida e mais forte. Além disso, o imiquimod induziu a expressão de TLR7, e atuou sinergisticamente com o cálcio para induzir citocinas pró-inflamatórias. Foi confirmado que as respostas induzidas pela imiquimod foram significativamente inibidas por microRNAs suprimindo a expressão de TLR7. Estes resultados sugerem que TLR7 expresso em queratinócitos desempenham um papel chave na ativação da sinalização de NF- κ B por imiquimod, e que a sua modulação em queratinócitos poderia fornecer um potencial terapêutico para muitas doenças inflamatórias da pele.

O gene TLR9 codifica a proteína que pertence à família dos receptores do tipo Toll (TLR). Os vários TLR exibem diferentes padrões de expressão. Esse gene é preferencialmente expresso em tecidos ricos em células imunes, como o baço, os nódulos linfáticos, medula óssea e leucócitos sanguíneos periféricos. Estudos em ratos e humanos indicam que esse receptor medeia uma resposta celular a dinucleotídeos CpG não metilados em DNA bacteriano para resultar em uma resposta imune inata.

PIVARCSI et al. (2007) fizeram uma revisão a respeito da supressão da inflamação da pele independente do receptor do tipo Toll 9 através de oligonucleotídeos CpG. Eles estudaram vias independentes de TLR9 para o reconhecimento de oligodeoxinucleotídeos. A ativação dessa via parece levar à supressão da produção de citocinas *in vitro* e diminuição da inflamação da pele *in vivo*.

OLARU et al. (2010) estudaram se linhagens de queratinócitos podem ser utilizadas para estudar mecanismos da resposta imune inata. Queratinócitos humanos primários, além de linhagens celulares HaCaT, CCD 1106 KERTr e HEK001, foram tratados com uma variedade de ligantes de TLR. Foi determinada a expressão de IL-8, CCL20 e CXCL10. Todas as três linhagens celulares expressaram TLR1-6 e TLR9. A linhagem KERTr respondeu aos mesmos ligantes de TLR que os queratinócitos primários. HEK001 aparentou ter expressão aumentada de TLR5. Os dados coletados pelo estudo mostraram que secreção de IL-8 independente de TLR7 e TLR8 por queratinócitos após tratamento com imiquimode. As diferentes linhagens celulares representam ferramentas complementares para estudos moleculares de resposta imune inata da pele.

GREGORIO et al. (2010) mostraram que células dendríticas plasmacitóides (pDCs) têm a habilidade de detectar ácidos nucleicos derivados do hospedeiro liberados durante feridas comuns na pele. Foi descoberto que elas infiltram rapidamente feridas na pele e produzem IFNs tipo 1 através de reconhecimento de ácidos nucleicos dependente de TLR7 e TLR9. Esse processo foi crítico para a indução de uma resposta inflamatória rápida e a reepitelização da pele traumatizada. Esses dados mostraram um novo papel de células dendríticas plasmacitóides em sentir danos no tecido e promover a reparação de feridas na superfície da pele.

SHEN et al. (2012) examinaram os efeitos de queimadura nas respostas de células dendríticas convencionais esplênicas (cDC) e células dendríticas plasmacitóides (pDC) à ativação de TLR9. Foram analisadas as produções de citocinas pelas células cDCs e pDCs, além de outras células da imunidade. Apesar de existir uma associação entre uma resposta imune inata hiperativa após ferimento severo, os dados oferecidos por esse estudo mostram que DCs, tinham reatividade de TLR9 atrapalhada e atividade de células T disfuncional. Eles concluíram que a queimadura atrapalhou a imunobiologia de DCs resultando em supressão da resposta imune adaptativa.

No presente estudo TLR7 apresentou-se somente em células-tronco, hiperexpresso quando estimulado por KGF em controle e com valores bem maiores em queimados, e mostrou-se hipoexpresso em queimado sem o estímulo de KGF. O TLR9 apareceu hipoexpresso em células-tronco e não tronco sem estímulo de KGF em queimados, mas apareceu hiperexpresso com estímulo de KGF em células-tronco de queimados e controle. Não existe um padrão de expressão, e como a sinalização via TLRs e PAMPs é muito importante na queimadura é necessário estudos mais detalhados focando essas moléculas para sua real ação na defesa.

A proteína codificada pelo gene TRAF6 é um membro da família de proteínas do fator associado ao TNF (TRAF). Proteínas TRAF estão associadas e medeiam a transdução de sinal de membros da superfamília de receptores TNF. Além disso, medeiam também a sinalização de membros da família Toll e IL-1. Essa proteína também interage com diversas quinases proteicas incluindo IRAK1/IRAK, SRC e PKCzeta, o que oferece um link entre distintas vias de sinalização. Essa proteína funciona como uma transdutora de sinal na via NF-kappaB que ativa a I-kappaB quinase (IKK) em resposta a citocinas pro inflamatórias. A interação entre essa proteína com UBE2N/UBC13 e UBE2V1/UEV1A, que são enzimas conjugadoras de ubiquitina as quais catalisam a formação de cadeias de poliubiquitina, foi provada ser necessária para a ativação de IKK por essa proteína. Ela também interage com o complexo do receptor do fator de crescimento transformante beta (TGF-beta) e é necessária para a ativação independente de Smad de JNK e quinases p38. Foram reportadas duas variantes que sofreram splicing transcricional alternativo, que codificam uma mesma proteína.

MOORE et al. (2007) avaliaram o padrão temporal de expressão de importantes genes sinalizadores da imunidade em pacientes com variadas queimaduras de área completa da superfície corporal durante a primeira semana após a queimadura. Foram coletadas frações celulares mononucleares de sangue periférico de cada paciente em dois períodos de tempo, um logo após a queimadura e outro uma semana depois. Eles descobriram que a expressão genica estava indiretamente relacionada ao tamanho da queimadura. Queimaduras menores de 30% da área corporal queimada resultaram em hiper-regulação de diversos genes medidos e o contrário foi verdadeiro para queimaduras menores. Eles concluíram que queimaduras maiores estabelecem condições para severa imunossupressão hipo-regulando genes-chave da sinalização da resposta imune e pode ser uma explicação para a maior susceptibilidade a infecções pós-queimadura.

Os resultados obtidos no presente estudo são relevantes e originais, não existem dados na literatura que tenham focado na pele ao redor da queimadura para se ter uma informação objetiva dos processos que ocorrem ao redor da área de necrose da queimadura, permitindo obter-se um grande painel de genes diferencialmente expressos que devem ser estudados especificamente para entender melhor o processo de imunidade e de cicatrização, fundamental para o desenvolvimento de melhor tratamento ao queimado em termos de minimizar infecções e melhora da cicatrização. O ponto limitante desse estudo foi não ter sido realizado a expressão proteica concomitante, posto que o treinamento no laboratório de colaboração escolhido foi muito longo por falta de pessoal, e foi associado à deficiência técnica dos marcadores comprados, referidos pelo própria empresa que repôs em verba nos últimos dias por ter analisado como de baixa qualidade o material. Portanto, esse estudo continuará em novo auxílio à pesquisa, onde será solicitado equipamento para PCR e também para wester blotting, para que o grupo não fique dependente de outros laboratórios que determinam o insucesso por motivos de força maior, mas que não é possível se manter em momentos de crise financeira com ausência de técnicos preparados para o desenvolvimento de processos.

CONCLUSÕES

Na análise da expressão gênica de queratinócitos primários cultivados de pacientes queimados, suplementados pelo KGF, separados pelo método do Aldefluor, e avaliado a expressão gênica de marcadores de cicatrização e da imunidade, mostrou que as células-tronco apresentaram um maior número de genes expressos, sendo que quando estimulados pelo KGF em queimados a maioria desses genes foram expressos. Genes de relevância para ser alvo de novos estudos são: IGF-1, ITGA6, MMP2, MAPK1, MAPK8, IL-2, IL-5, IRAK1, CCR5, IL17A, IL23A, RAG1, TRAF6, TLR7 e TLR9.

REFERÊNCIAS

- Abribat T, Brazeau P, Davignon I, Garrel DR. Insulin-like growth factor-I blood levels in severely burned patients: effects of time post injury, age of patient and severity of burn. *Clin Endocrinol.* 1993;39(5):583-9.
- Bassuk JA, Cochrane K, Mitchell ME. Induction of urothelial cell proliferation by fibroblast growth factor-7 in RAG1-deficient mice. *Adv Exp Med Biol.* 2003;539(Pt B):623-33.
- Cheng B1, Fu X, Sheng Z, Gu X, Sun T, Sun X. [The effect of basic fibroblast growth factor on myofibroblasts and its significance on wound healing]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2002 Sep 10;82(17):1187-91.
- Fu X, Gu X, Sun T, Yang Y, Sun X, Sheng Z. Thermal injuries induce gene expression of endogenous c-fos, c-myc and bFGF in burned tissues. *Chin Med J (Engl).* 2003 Feb;116(2):235-8.
- Ganzetti G, Rubini C, Campanati A, Zizzi A, Molinelli E, Rosa L, Simonacci F, Offidani A. IL-17, IL-23, and p73 expression in cutaneous melanoma: a pilot study. *Melanoma Res.* 2015 Jun;25(3):232-8.
- Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, Arai N, Gallo RL, Digiovanni J, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med.* 2010 Dec 20;207(13):2921-30.

Gottipati S, Rao NL, Fung-Leung WP. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal*. 2008 Feb;20(2):269-76.

Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, Kondo T. Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):711-21.

Jafarzadeh A, Nemati M, Rezayati MT, Ebrahimi M, Hassan ZM. Cimetidine enhances delayed-type hypersensitivity responses and serum interleukin (IL)-2, -10, -12, and IL-17 levels after burn injury in an animal model. *J Immunotoxicol*. 2013 Apr-Jun;10(2):201-9.

Ju ST, Sharma R, Gaskin F, Fu SM. IL-2 controls trafficking receptor gene expression and Th2 response for skin and lung inflammation. *Clin Immunol*. 2012 Oct;145(1):82-8.

Kang K, Hammerberg C, Meunier L, Cooper KD. CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potentially produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. *J Immunol*. 1994 Dec 1;153(11):5256-64.

Kawakami M, Kaneko N, Anada H, Terai C, Okada Y. Measurement of interleukin-6, interleukin-10, and tumor necrosis factor-alpha levels in tissues and plasma after thermal injury in mice. *Surgery*. 1997 Apr;121(4):440-8.

Kubo H1, Hayashi T2, Ago K2, Ago M2, Kanekura T3, Ogata M2. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. *Leg Med (Tokyo)*. 2014 Jan;16(1):8-13.

Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):125-30.

Li J, Huang S, Zhang J, Feng C, Gao D, Yao B, Wu X, Fu X. Mesenchymal stem cells ameliorate inflammatory cytokine-induced impairment of AT-II cells through a keratinocyte growth factor-dependent PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2016 May;13(5):3755-62.

Li ZJ, Sohn KC, Choi DK, Shi G, Hong D, Lee HE, Whang KU, Lee YH, IM M, Lee Y, Seo YJ, Kim CD, Lee JH. Roles of TLR7 in activation of NF- κ B signaling of keratinocytes by imiquimod. *PLoS One*. 2013 Oct11;8(10):e77159.

Lotti LV, Rotolo S, Francescangeli F, Frati L, Torrisi MR, Marchese C. AKT and MAPK signaling in KGF-treated and UVB-exposed human epidermal cells. *J Cell Physiol*. 2007 Sep;212(3):633-42.

Man MQ, Wood L, Elias PM, Feingold KR. Cutaneous barrier repair and pathophysiology following barrier disruption in IL-1 and TNF type I receptor deficient mice. *Exp Dermatol*. 1999 Aug;8(4):261-6.

Miranda JP, Filipe E, Fernandes AS, Almeida JM, Martins JP, De la Fuente A, Abal M, Barcia RN, Cruz P, Cruz H, Castro M, Santos JM. The human umbilical cord tissue-derived MSC population UCX $\text{\textcircled{R}}$ promotes early mitogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of BM-MSCs when transplanted in vivo. *Cell Transplant*. 2015;24(5):865-77.

Moore CB, Medina MA, van Deventer HW, O'Connor BP, Cameron S, Taxman DJ, Maile R, Ting JP, Cairns BA. Downregulation of immune signaling genes in patients with large surface burn injury. *J Burn Care Res*. 2007 Nov-Dec;28(6):879-87.

Muller S, Jensen M, Svensson P, Skakkebaek NE. Longitudinal changes in plasma Transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children. *Burns*. 1991;17(4):279-81.

Mutlu M, Kalay E, Dilber B, Aslan Y, Dilber E, Almaani N, McGrath JA. Pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa syndrome showing novel mutations in integrin b4 gene (ITGB4). *Turk J pediatr*. 2015 Jul-Aug;57(4):385-7.

Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol*. 2010 Aug;19(8):e314-6.

Pivarcsi A. Toll-like receptor 9-independent suppression of skin inflammation by oligonucleotides. *J Invest Dermatol*. 2007 Apr;127(4):746-8.

Plichta JK, Radek KA. Sugar-coating wound repair: a review of FGF-10 and dermatan sulfate in wound healing and their potential application in burn wounds. *J Burn Care Res*. 2012 May-Jun;33(3):299-310.

Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Apr 1;4(4):213-224.

Shen H, de Almeida PE, Kang KH, Yao P, Chan CW. Burn injury triggered dysfunction in dendritic cell response to TLR9 activation and resulted in skewed T cell functions. *PLoS One*. 2012;7(11):e50238.

Singh KP, Prasad R, Chari PS, Dash RJ. Effect of growth hormone therapy in burn patients on conservative treatment. *Burns*. 1998 Dec;24(8):733-8.

Spiekstra SW, Breetveld M, Rustemeyer T, Scheper RJ, Gibbs S. Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen*. 2007;15(5):708-17.

Strock LL, Singh H, Abdullah A, Miller JA, Herndon DN. The effect of insulin-like growth factor I on postburn hypermetabolism. *Surgery*. 1990 Aug;108(2):161-4.

Talebpour Amiri F, Fadaei Fathabadi F, Mahmoudi Rad M, Piryae A, Ghasemi A, Khalilian A, Yeganeh F, Mosaffa N. The effects of insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation on rat acute wound model. *Iran Red Crescent Med J*. 2014 Oct 5;16(10):e16323.

Tan J, Peng X, Luo G, Ma B, Cao C, He W, Yuan S, Li S, Wilkins JA, Wu J. Investigating the role of P311 in the hypertrophic scar. *PLoS One*. 2010 Apr 9;5(4):e9995. doi: 10.1371/journal.pone.0009995.

Welte T, Zhang XH. Interleukin-17 could promote breast cancer progression at several stages of the disease. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:804347.

Wu X, Yang L, Zheng Z, Li Z, Shi J, Li Y, Han S, Gao J, Tang C, Su L, Hu D. Src promotes cutaneous wound healing by regulating MMP-2 through the ERK pathway. *Int J Mol Med*. 2016 Mar;37(3):639-48. doi: 10.3892/ijmm.2016.2472. Epub 2016 Jan 28.

----- Forwarded message -----

From: **Edna Montero** <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Date: 2017-10-23 8:45 GMT-02:00

Subject: Acta Cirúrgica Brasileira - Decision on Manuscript ID ACB-2017-0142.R1

To: agragnanif@gmail.com

23-Oct-2017

Dear Prof. GRAGNANI:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Aldefluor protocol to sort keratinocytes stem cells from skin" in its current form for publication in the Acta Cirúrgica Brasileira.

Our publishing team will contact you for further details before final publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Acta Cirúrgica Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Edna Montero

Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira

actacirbras@gmail.com