

**SILVANA APARECIDA ALVES CORRÊA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES  
DA IMUNIDADE EM QUERATINÓCITOS  
CULTIVADOS DE PACIENTES COM  
GRANDE QUEIMADURA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.**

**SÃO PAULO**

**2016**

**SILVANA APARECIDA ALVES CORRÊA**

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES DA  
IMUNIDADE EM QUERATINÓCITOS CULTIVADOS DE  
PACIENTES COM GRANDE QUEIMADURA**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,  
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO

**SÃO PAULO**

**2016**

Corrêa, Silvana Aparecida Alves

**Expressão Gênica de Marcadores da Imunidade em Queratinócitos Cultivados de Pacientes com Grande Queimadura.** / *Silvana Aparecida Alves Corrêa -- São Paulo, 2016.*

xix, 94f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Gene Expression of Immunity Markers in Cultivated Keratinocytes of Patient with Large Burn.

**1.** Expressão Gênica **2.** Imunidade **3.** Queratinócitos **4.** Queimadura **5.** Vias de Sinalização.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

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

**COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

À Deus, antes de tudo, que me deu e me dá vida, forças e perseverança,  
para continuar, e acreditar, e sonhar;

À minha mãe, Neilde Curvelo Corrêa, batalhadora incansável, com um  
amor infinito e incomparável por sua família;

Ao meu pai, Adão Alves Corrêa (*in memoriam*), exemplo de homem  
honesto e de marido e pai que honrou e amou a sua família;

À minhas filhas amadas, Clarisse e Isabela Corrêa, que me mostram a cada  
dia o que é verdadeiramente o AMOR.

## **AGRADECIMENTOS**

**À PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA,**  
PROFESSORA TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP/EPM),  
pela oportunidade e confiança, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

**Ao PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO,**  
PROFESSOR ADJUNTO LIVRE-DOCENTE DA DISCIPLINA DE  
CIRURGIA PLÁSTICA, COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO DE CIRURGIA TRANSLACIONAL DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), pela sua  
atenção, estímulo constante e orientação em todos os estudos realizados  
neste Programa.

Ao **PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO**, PROFESSOR ADJUNTO DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA (UNIFESP/EPM), orientador deste estudo, por ser um exemplo de médico, professor e pesquisador, pela sua força, coragem, persistência, perspicácia, amizade, pelo seu talento, coerência, competência, pelas suas inúmeras sugestões e pela dedicação na pesquisa. A este grande profissional que desde o início “estendeu-me a mão” quando mais precisei, seus conselhos ficarão para sempre na minha mente e será um exemplo na minha carreira como pesquisadora e professora universitária.

A TODOS OS **PROFESSORES** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP pelas críticas construtivas e sugestões.

A TODOS os colegas do laboratório, os pós-graduandos **JÉSSICA BONUCCI** e **RAFAEL PETECOF**, **PROFa. SARITA MAC CORNICK**, pelo carinho, pela atenção, amizade, conselhos e sugestões.

AOS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, em especial, Prof. CARLOS ALOISE e CELESTINO PRÓSPERO, pela amizade, pelos conselhos e orientações.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA E SILVANA APARECIDA COSTA pela atenção, consideração e profissionalismo.

À todos que nos auxiliaram e, que direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.



***“A ciência é o melhor instrumento para medir a nossa  
ignorância”.***

**(Paolo Mantegazza)**

Fisiólogo, Antropólogo e Escritor Italiano

(Monza, 31/10/1831 – San Terenzo, 28/08/1910)

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>7</b>
<b>3. LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>82</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>
<b>FONTES CONSULTADAS.....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Demonstração das quatro etapas do PCR *Array*: 1) Conversão de RNA total em cDNA; 2) Adicionar cDNA ao *RT<sup>2</sup> q PCR Master Mix & Aliquot Mixture* por toda placa de PCR *Array*; 3) Correr a placa em aparelho de PCR em tempo real; 4) Análise dos dados de expressão gênica. **37**
- Figura 2** - Página inicial para carregamento (*upload*) da lista de genes a serem analisados pelo programa Metacore. **38**
- Figura 3** - Página seguinte após o carregamento da lista de genes. Em seguida é construído pelo programa os caminhos gênicos (*Build Networks*) para obtenção das ontologias gênicas. **39**
- Figura 4** - Mapa de calor para marcadores da Imunidade para cultura de queratinócitos de pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados. **42**
- Figura 5** - Gráfico de dispersão para marcadores da Imunidade em cultura de queratinócitos de pacientes queimados. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados. **43**
- Figura 6** - Genes diferencialmente expressos para as vias de sinalização da imunidade em cultura primária de queratinócitos de pacientes queimados em relação a pacientes controles. **44**

**Figura 7** - Mapa de calor para marcadores da Imunidade em pele de 45  
pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho, genes hiper-  
regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não  
regulados.

**Figura 8** - Gráfico de dispersão para marcadores da Imunidade em pele de 46  
pacientes queimados. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes  
hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados.

**Figura 9** - Genes hiper-expressos para as vias de sinalização da imunidade 47  
em pele de pacientes queimados em relação a pacientes controles.

**Figura 10** - Genes hipo-expressos para as vias de sinalização da imunidade 48  
em pele de pacientes queimados em relação a pacientes controles.

**Figura 11** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Sistema 49**  
**Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 01** (ITGAM, alpha-  
M/beta-2 integrin, IL-8, c-Jun, Rb protein). Ontologias Gênicas  
relacionadas: *response to lipopolysaccharide* (56.4%;  $3.784e-26$ ), *response*  
*to molecule of bacterial origin* (56.4%;  $1.769e-25$ ), *immune system process*  
(84.6%;  $9.941e-24$ ), *response to cytokine* (61.5%;  $2.451e-23$ ), *regulation of*  
*immune system process* (71.8%;  $6.873e-23$ ).

**Figura 12** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 50**  
**mais hiper-regulados, Network 02** (C3c, NF-kB, Adenosine A2a receptor,  
alpha-X/beta-2 integrin, CD21). Ontologias Gênicas relacionadas: *positive*  
*regulation of immune response* (88.2%;  $6.665e-40$ ), *immune effector*  
*process* (85.3%;  $1.222e-39$ ), *activation of immune response* (79.4%;  
 $1.181e-37$ ), *regulation of immune response* (91.2%;  $4.045e-37$ ), *positive*  
*regulation of immune system process* (91.2%;  $5.093e-37$ ).

**Figura 13** -. Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 51 mais hiper-regulados, Network 03** (IL-1 beta, C3aR, PI3K cat class IB (p110-gamma), CCL5, IL-8). Ontologias Gênicas relacionadas: *immune response* (76.3%;  $3.396e-25$ ), *regulation of immune system process* (73.7%;  $2.095e-23$ ), *positive regulation of response to stimulus* (76.3%;  $1.597e-21$ ), *immune system process* (81.6%;  $1.990e-21$ ), *positive regulation of immune system process* (60.5%;  $1.654e-20$ ).

**Figura 14** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 52 mais hiper-regulados, Network 04** (IL-1 beta, CARD9, IL-1RI, IL-1F7, IL-33). Ontologias Gênicas relacionadas: *regulation of defense response* (83.3%;  $1.444e-25$ ), *nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor signaling pathway* (50.0%;  $1.539e-25$ ), *positive regulation of cytokine production* (75.0%;  $2.158e-25$ ), *regulation of cytokine production* (79.2%;  $2.752e-24$ ), *immune response* (91.7%;  $6.720e-23$ ).

**Figura 15** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 53 mais hiper-regulados, Network 05** (C3c, C3b, iC3b, C1q, MCP). Ontologias Gênicas relacionadas: *complement activation* (100.0%;  $3.544e-26$ ), *protein activation cascade* (100.0%;  $4.316e-25$ ), *humoral immune response* (100.0%;  $4.160e-22$ ), *activation of immune response* (100.0%;  $2.064e-18$ ), *immune effector process* (100.0%;  $1.841e-17$ ).

**Figura 16** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 54 mais hiper-regulados, Network 06** (CD21, iC3b, C3b, MCP, H-Ficolin). Ontologias Gênicas relacionadas: *complement activation* (100.0%;  $1.621e-28$ ), *protein activation cascade* (100.0%;  $2.509e-27$ ), *humoral immune response* (100.0%;  $4.619e-24$ ), *activation of immune response* (100.0%;  $5.035e-20$ ), *immune effector process* (100.0%;  $5.491e-19$ ).

**Figura 17** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 55 mais hiper-regulados, Network 07** (CD8, CD80, CD86, IL-10, IL-10 receptor). Ontologias Gênicas relacionadas: *T cell costimulation* (66.7%;  $6.474e-13$ ), *lymphocyte costimulation* (66.7%;  $6.900e-13$ ), *regulation of T cell activation* (77.8%;  $2.260e-11$ ), *regulation of immune effector process* (77.8%;  $5.690e-11$ ), *positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process* (44.4%;  $6.014e-11$ ).

**Figura 18** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Imune-Genes 56 mais hiper-regulados, Network 08** (CD8 alpha, 26S proteasome (19S regulator), Immunoproteasome (11S regulator), Antigen extracellular region, 26S proteasome (20S core)). Ontologias Gênicas relacionadas: *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent* (85.7%;  $1.562e-13$ ), *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $2.251e-13$ ), *antigen processing and presentation* (100.0%;  $2.921e-13$ ), *antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $1.550e-12$ ), *regulation of cellular amino acid metabolic process* (71.4%;  $7.999e-12$ ).

**Figura 19** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Sistema 57**  
**Imune-Genes mais hipo-regulados, Network 01** (Lysozyme, STAT3, G-CSF, PU.1, STAT5). Ontologias Gênicas relacionadas: *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent* (85.7%;  $1.562e-13$ ), *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $2.251e-13$ ), *antigen processing and presentation* (100.0%;  $2.921e-13$ ), *antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $1.550e-12$ ), *regulation of cellular amino acid metabolic process* (71.4%;  $7.999e-12$ ).

**Figura 20** - Análise por *MetaCore*: Queimados vs controles: **Sistema 58**  
**Imune-Genes mais hipo-regulados, Network 02** (CCR6, Actin cytoskeletal, G-protein beta/gamma, PI3K cat class IB (p110-gamma), alpha-4/beta-1 integrin). Ontologias Gênicas relacionadas: *blood coagulation* (70.0%;  $5.199e-25$ ), *coagulation* (70.0%;  $5.199e-25$ ), *hemostasis* (70.0%;  $6.433e-25$ ), *wound healing* (73.3%;  $2.074e-24$ ), *cell activation* (73.3%;  $7.197e-24$ ).

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

**Tabela 1** - Dados dos pacientes incluídos no estudo para cultura de queratinócitos. **26**

**Tabela 2** - Dados dos pacientes incluídos no estudo para fragmentos de pele. **27**

**Quadro 1** – *Inate and Adaptive Immunity PCR Array* (PAHS-052Z) **36**  
(Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores da Imunidade Inata e Adaptativa.



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ACTB*, Beta Actina (gene normalizador-controle interno)
- ATCC*, American Tissue Cell Culture
- cDNA*, Ácido Desoxidenuclêico complementar; do inglês: *complementar desoxid ribonucleic acid*
- cm<sup>3</sup>*, Centímetros cúbicos
- °C, Graus Celsius
- DMEM*, Dulbelco's Modified Eagle Medium
- ELISA*, Enzima imunoensaio
- GAPDH*, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- GM-CSF*, Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
- HPRT1*, Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
- ICAM-1*, Molécula de adesão celular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
- IFN-γ*, interferon-gama
- IL1 α/ ou β*, interleucinas 1α/ ou β
- IL2/4/5/6/10/12/13/17/22/23/27*, interleucinas 2/4/5/6/10/12/13/17/22/23/27
- KC*, queratinócitos
- LD*, dermatofitoses localizada
- LPS*, lipopolissarídeo
- MCP-1*, Proteína quimioatratante de monócito 1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
- ml*, mililitros
- PCR*, Reação em cadeia da Polimerase; do inglês: "*Polimerase chain reaction*"
- %*, porcentagem
- qRT-PCR*, Reação em cadeia da Polimerase após retro transcrição quantitativa; do inglês: "*quantitative retro transcription-Polimerase chain reaction*"
- ®, *marca registrada*
- RPLPO*, Ribosomal protein, large, P0
- RPM*, Rotações por minuto
- RT-PCR*, Reação em cadeia da Polimerase em tempo real; do inglês: *Real Time Polimerase chain reaction*
- SCQ*, Superfície corporal queimada

*Th1/2/17*, Linfócitos do tipo T helper1/2/17

*TGF-β*, Fator de crescimento tumoral-beta

*TNF-α/β*, Fator de necrose tumoral-alfa/ ou beta

*TLR4*, Receptor *toll-like* 4

*μg*, micrograma

*μl*, microlitros

*UTQ-DCP*, Unidade de terapia de queimados-departamento de Cirurgia  
plástica

## **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** As queimaduras atingem cerca de um por cento da população mundial. Mais de um milhão de queimaduras ocorrem nos Estados Unidos por ano e cerca de 5000 são fatais, fazendo com que a queimadura seja a quarta principal causa de morte por lesões não intencionais neste país. Os pacientes vitimados por queimaduras possuem alta susceptibilidade a infecções, estando diretamente relacionada às taxas de morbidade e mortalidade. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão gênica de marcadores da imunidade em queratinócitos cultivados de pacientes com grande queimadura. **MÉTODOS:** Após a obtenção de fragmentos viáveis de pele ao redor da queimadura, tendo como controle pele de paciente sem queimadura, a cultura de queratinócitos foi iniciada pelo método enzimático, usando Dispase. As amostras foram tratadas com Trizol® para a extração de RNA total. Esse foi quantificado e analisado quanto à pureza para obtenção do DNA complementar para a análise da expressão do gene, utilizando placas de PCR Arrays específicos para imunidade. **RESULTADOS:** Após a análise da expressão do gene verificou-se, em cultura de queratinócitos, sete (07) genes diferencialmente expressos (8%) que se apresentaram 100% hipo-expressos. Nos fragmentos de pele 63% genes diferencialmente expressos, dos quais 77% foram hipo expressos e 23% foram hiper expressos. **CONCLUSÃO:** Na fase aguda da grande queimadura foram observados HLA-E, IL1R1 e IL-6 como genes prioritários na cultura de queratinócitos; enquanto no fragmento da pele os genes prioritários foram IL-8, IL-6, TNF-alfa, HLA-E, LYZ, CCR6.

## **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A alta susceptibilidade de pacientes queimados a infecções é uma preocupação no que concerne a evolução e sucesso do tratamento clínico, estando diretamente relacionada às taxas de morbidade e mortalidade do grupo. Para evitar a entrada e proliferação de patógenos o organismo conta com dois tipos de resposta imune: a imunidade inata, ou natural, e a imunidade adquirida, ou específica. A imunidade inata é responsável pelas reações iniciais para debelar infecção e desencadeia a resposta dos linfócitos e seus produtos humorais. Por outro lado, a resposta desencadeada pela imunidade adquirida constitui uma resposta tardia específica e duradoura (LUSTER *et al.*, 2005).

Queimaduras produzem mudanças no padrão da resposta imune do paciente, representadas simultaneamente pelo estímulo à produção de genes ligados à resposta imune inata e pela supressão de genes relacionados à resposta imune adaptativa, principalmente aqueles relacionados à apresentação de antígenos e à ativação dos linfócitos T (XIAO *et al.*, 2011). Esses genes inibidos estão relacionados, predominantemente, à resposta dos linfócitos do tipo T helper-1 (Th1), produtores de citocinas como a interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-beta (TNF-beta). Isso contribui com a polarização da imunidade adaptativa então estabelecida que aumenta a resposta dos linfócitos T helper-2 (Th2), representada pela secreção de interleucina-4 (IL-4) e interleucina-5 (IL-5) e pelo estímulo à produção de anticorpos pelos linfócitos B. Tal polarização leva o indivíduo a uma imunodeficiência e aumenta a incidência de sepse, ou infecção sistêmica, entre pacientes gravemente feridos, como vítimas de trauma ou queimadura (LUAN *et al.*, 2011).

Na análise por citometria de fluxo de amostras sanguíneas de pacientes vítimas de queimadura foram encontradas baixas quantidades de linfócitos Th1 associadas a baixos níveis de interleucina 12 (IL-12) e à ausência de IFN- $\gamma$  no primeiro mês após a injúria. No segundo mês foram encontrados níveis significativamente altos de linfócitos Th2 em comparação ao grupo controle. Em pacientes queimados que desenvolveram cicatrizes hipertróficas, e fator de crescimento tumoral-beta (TGF- $\beta$ ) também se mostrou aumentados precocemente após a injúria, retornando a seus níveis normais dentro de 6 meses (TREDGET *et al.*, 2006).

Linfócitos T reguladores (Treg) são capazes de controlar a resposta de células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas em ratos queimados. Ratos com níveis normais de Treg apresentam uma redução da proliferação de T CD4<sup>+</sup> e da produção de citocinas tipo Th1, enquanto ratos com depleção de Treg mostram maiores níveis de T CD4<sup>+</sup> e de citocinas em resposta ao estímulo antigênico (MACCONMARA *et al.*, 2011). A análise contínua de amostras de sangue periférico de grandes queimados mostrou uma diminuição progressiva na porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, enquanto o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi semelhante ao do grupo controle. A produção de IL-4 foi excessivamente estimulada, indicando a atividade das células Th2. A quantidade sérica de IFN- $\gamma$ , indicativo da atividade de linfócitos Th1, mostrou um aumento pouco significativo (ZEDLER *et al.*, 1997). Tais estudos demonstram que as células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> são cruciais para a polarização da resposta imune pós-traumática relacionada ao tipo Th2.

Estudos realizados com modelos murinos de queimadura fornecem importantes informações a respeito da sucessão de eventos e relações entre as células efetivadoras da imunidade adquirida, citocinas e proteínas produzidas durante a resposta inflamatória. Modelos murinos, os quais normalmente demonstrariam supressão na imunidade adaptativa relacionada aos linfócitos Th1 após a queimadura, mostraram respostas normais quando foram deletadas suas células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Sendo assim, a queimadura amplifica a função dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> reguladores, os quais contribuem para a imunossupressão após a injúria (CHOILEAIN *et al.*, 2006). Em outro experimento, a expressão de receptor *toll-like* 4 (TLR4), uma proteína importante para o reconhecimento antigênico e

ativação da resposta imune inata, encontra-se significativamente aumentada nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, associada a um aumento no número das populações de linfócitos de memória T CD44 CD4<sup>+</sup> e T CD44 CD8<sup>+</sup> (CAIRNS *et al.*, 2006).

Quando ativados, linfócitos T helper-17 (Th17) secretam as citocinas IL-6, IL-17, IL-22, IL-23, IL-27 e TGF- $\beta$ . Amostras de pele extraídas de modelos murinos de queimadura e analisadas pelo método ELISA mostram um aumento significativo nos níveis de IL-17 e IL-22 na região da ferida em comparação ao grupo controle cerca de 3 horas após a injúria. Assim, há uma resposta precoce do tipo Th-17 induzida pela queimadura (SASAKI *et al.*, 2011). Analisando a pele circundante ao ferimento de um modelo semelhante, os níveis de IL-6 mostram-se significativamente elevados após 1 hora e diminuídos após 24 horas (KAWAKAMI *et al.*, 1997). Em outro estudo visando analisar a atividade das células dendríticas também em modelo murino, não foram observadas reduções significativas na expressão de moléculas coestimulatórias da superfície deste tipo celular como CD40, CD80, CD86. Houve aumento da expressão de CD86 um dia após a injúria, sugerindo que a queimadura causa uma ativação precoce das células dendríticas. Células T CD4<sup>+</sup> estimuladas pela apresentação de antígenos de tais células dendríticas mostraram níveis de IL-2, IFN-gama, IL-10 e IL-13 semelhantes aos do grupo controle (FUJIMI *et al.*, 2009).

A análise imunohistoquímica de amostras de pele de pacientes com queimadura de segundo grau mostra uma maior expressão da molécula de adesão celular 1 (ICAM-1), molécula de adesão associada à transmigração de leucócitos através do endotélio vascular, na região da queimadura e nas células basais circundantes. Nos queratinócitos foi observada uma distribuição polar das ICAM-1, predominantemente no epitélio neoformado (ZHU *et al.*, 1999).



A análise por hibridização *in situ* e imunohistoquímica de amostras de pele de pacientes com queimadura revelou um aumento da expressão de molécula quimioattractante de monócito 1 (MCP-1), proteína quimiotática para monócitos, nos queratinócitos da camada basal da ferida, bem como em regiões onde havia tecido de granulação (GIBRAN *et al.*, 1997).

A análise do meio de cultura de queratinócitos obtidos através do debridamento de pacientes queimados revelou níveis elevados de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) em comparação ao controle. IL-1 $\alpha$  não apresentou diferenças significativas e IL-1 $\beta$  em concentrações mínimas (GAUGLITZ *et al.*, 2012).

Em outro estudo, para determinar crianças que sobreviveram versus as que não sobreviveram, em queimadura com superfície corpórea queimada acima de 30%, foi analisado um grande painel de marcadores de expressão proteica em soro das crianças. Este estudo mostrou que as crianças não sobreviventes possuíam maior nível de IL-6 e IL-8, além de outros marcadores importantes (JESCHKE *et al.*, 2014).

Sabendo que as referidas mudanças no padrão de resposta imunológica do paciente queimado estão diretamente relacionados à imunodeficiência, pode ser possível prever a sobrevivência em pacientes queimados, segundo o padrão de expressão de marcadores específicos. Portanto o presente estudo poderá também sugerir novos marcadores para o paciente com grande queimadura.

**OBJETIVO**

## **2 OBJETIVO**

Avaliar a expressão gênica de marcadores da imunidade em queratinócitos cultivados de pacientes com grande queimadura.

**LITERATURA**

### 3 LITERATURA

WINGERS *et al.* (1998) relataram que tanto em nível de proteína e mRNA, o inibidor de protease de leucócito secretor (SLPI) mostra a expressão induzível em epitélios não glandulares. A fraca expressão de SLPI foi encontrada no estrato da epiderme humana de adultos normais. No entanto, em epiderme psoriática lesionais e na migração de queratinócitos de cicatrização de feridas, uma forte coloração citoplasmática foi visto nos queratinócitos suprabasais. Notavelmente, na derme adjacente aos queratinócitos que expressam o SLPI, esta proteína foi encontrada no meio extracelular associada com as fibras de elastina, ao passo que a derme na pele normal era negativo. Em cultura de células, o SLPI foi dificilmente expressa em monocamadas de queratinócitos em proliferação. Diferentemente culturas com um fenótipo de pele normal expressa níveis baixos de SLPI, ao passo que as culturas com um fenótipo regenerativo/psoriática expressa níveis elevados. Estudos funcionais com SLPI recombinante indicaram que o seu espectro antibacteriano e a potência são distintos de outros peptídeos anti-microbianos tais como a lisozima e as defensinas. Tendo em vista as múltiplas funções de SLPI e a capacidade de indução, os autores propuseram que ele age como um importante primeiro mecanismo de linha de defesa em lesão cutânea.

SRIRAMARAO & DISCIPIO (1999) empregaram a técnica de microscopia intravital usando um modelo de câmara dorsal de prega cutânea murina. C3, o fator H, o fator B, de HSA, e transferrina foram marcadas fluorescentemente e injetada na veia da cauda de ratos que tinham sido submetidos a um pequeno grau de queimadura no interior

da terceira dobra de pele. Apenas C3 e o fator H foram depositados dentro dos vasos sanguíneos do tecido traumatizado. A ligação foi específica porque ocorreu apenas próximo dos locais queimados locais, e nem C3 nem fator H foi observado acumular-se nos vasos sanguíneos do tecido saudável. Além disto, a HSA marcada com fluorescência, o fator B, e a transferrina todos falharam em depositar no local próximo à queimadura. A deposição de C3 e do fator H ocorreu dentro de 10 min após a lesão e foi intravascular ocorrendo em grandes vasos sanguíneos, vasos capilares e vênulas pós-capilares, com pouca evidência de acumulação no interstício. Uma vez que tanto o factor H quanto os fragmentos C3 são reconhecidos como moléculas de adesão pelos receptores de granulócitos, estas proteínas depositadas podem promover a acumulação de leucócitos, contribuindo assim para uma iniciação de uma cascata inflamatória num local de ferimento de queimadura.

WYLLIE *et al.* (2002) estudaram a proteína de macrófago associada à resistência natural 1 (Nramp1), também conhecida como Slc11a1. Os autores hipotetizaram que o fígado de camundongos NRAMP1 (-/-) podem ser protegidos da lesão I/R de fase inicial comparado a fígados de camundongos NRAMP1 (+/+). Para testar a hipótese foi induzida isquemia quente parcial aos fígados de camundongos Nramp1 (+/+) e NRAMP1 (-/-) por 45 min pelo hilo clampeado dos lobos medianos e lateral esquerdo, seguido de 30 ou 60 min de reperfusão. Os níveis da atividade da transaminase de glutamato oxaloacetato actividade (pGOT) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no plasma foram medidos, e as seções dos fígados foram coradas para a acumulação de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Após 45 min de isquemia e 30/60 min de reperfusão de fígados de camundongos Nramp1 (+/+) e NRAMP1 (-/-), verificou-se aumentos

significativos na atividade pGOT no plasma e nos níveis de TNF-alfa em camundongos NRAMP1 (+/+) em 30 e 60 min de reperfusão, respectivamente, em comparação com controles placebo e todos camundongos NRAMP1 (-/-). Uma acumulação significativa de PMNs também foi encontrado no fígado de camundongos NRAMP1 (+/+) a 60 minutos de reperfusão em comparação com todos os outros grupos. Os autores também mostram que a ruptura da lesão I/R dos genes atenuados NRAMP1 para o fígado do camundongo durante as fases iniciais da lesão I/R por calor.

HOFFMAN *et al.* (2004) investigaram os efeitos de duas diferentes preparações de filtros solares contendo um filtro UVB químico sozinho [fator de proteção solar (SPF) 5.2] ou filtro UVA + UVB [SPF 6.2] na formação de células de queimaduras solares, na migração de células dendríticas (DC), no número de células positivas CD86- e CD1a, e no fator de necrose tumoral alfa (TNFalfa) e de interleucina (IL) -1, IL-10 e IL-12 na pele após a irradiação com diferentes doses de radiação solar UV simulada. Explantes de pele tratadas com placebo ou com protetor solar foram irradiados com radiação UV solar simulada a 0,5, 1, e 2 doses equivalentes mínima erimatosa (*minimal erythematous dose equivalents*; MEDE) (como determinado num estudo in vivo humana) multiplicado pelo SPF do placebo ou dos com protetores solares. Após a irradiação, os explantes de pele foram colocados em meio de RPMI durante 48h. As células que emigraram e os explantes de pele foram analisados histologicamente, e os mediadores solúveis nos sobrenadantes foram medidos por ELISA. A exposição à radiação UV conduziu a um aumento dependente da concentração em queimaduras solares na formação de

células e na produção de TNF $\alpha$ , mas uma redução dependente da concentração na migração de DC e no número celular de positivos para CD86- e CD1a na epiderme. Ambos os filtros solares químicos protegeram contra essas alterações. A capacidade imunoprotectora dos filtros solares correlacionou com a sua SPF, mas era independente da capacidade de proteção UVA dos filtros solares, o que sugere que a UVA não é um fator importante para a imunossupressão sob as condições utilizadas no modelo. A irradiação UV não afetou significativamente a vitalidade de DC emigrar; a expressão de HLA, CD80, e lag em células que emigraram; o número de células CD1a positivas na derme; ou a produção de IL-1, IL-10 e IL-12. Os autores concluíram que seu modelo pode ser útil para determinar a capacidade imunoprotetora de filtros solares.

FERREIRA *et al.* (2005) compararam os perfis de expressão de mRNA de camundongos MCP-1 (-/-) e do tipo selvagem durante a fase inflamatória aguda de feridas excisionais. Utilizando uma matriz de cDNA de camundongo contendo 514 quimiocinas e genes relacionados a quimiocina, foi perda da MCP-1 causou uma supra regulação significativa de nove genes (decorina, persefina, IL-1 beta, MIP-2, MSP, IL1ra, CCR5, CCR3, IL-11) e uma significativa hiporegulação dos dois genes (CCR4 e CD3Z) em feridas agudas. A matriz de dados foi confirmada por RT-PCR semi-quantitativo. O efeito da deleção de MCP-1 sobre a expressão de quimioquinas foi adicionalmente examinada em macrófagos isolados. Em comparação com o tipo selvagem, macrófagos peritoneais estimulados por LPS de camundongos MCP-1 (-/-) mostraram um aumento significativo na expressão de mRNA de RANTES, MIP-1 beta, MIP-1 alfa e MIP-2. Os dados sugeriram que a perda de uma única quimiocina perturba a rede de



quimiocinas não só na configuração de inflamação aguda, mas mesmo numa célula inflamatória isolado, o macrófago.

KOBAYASHI *et al.* (2008) usando um modelo de rato com lesão térmica, estudaram por que peptídeos antimicrobianos não são produzidos nos tecidos específicos de queimadura e como este defeito contribui para o aumento da susceptibilidade à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* de lesão por queimadura. O crescimento logarítmico de *P. aeruginosa* foi demonstrado no local da queimadura e sistemicamente (na circulação) em camundongos lesionados termicamente expostos a  $10^2$  CFU/camundongo do agente patogênico debaixo da queimadura. No entanto, o crescimento do patógeno em camundongos não foi observado nem sistêmico e nem localmente e foi observado em camundongos queimadura controle quando eles foram infectados por via intradérmica com  $10^6$  CFU/camundongo de *P. aeruginosa*. As beta defensinas de murídeo (MBDS) foram detectadas nos homogeneizados de pele de camundongos controles de queimaduras. No entanto, as quantidades de MBDS foram reduzidos significativamente nos mesmos tecidos homogeneizados de camundongos lesionados termicamente. As células Gr-1 (+) e CD11b (+), com uma capacidade para suprimir a produção de peptídeo antimicrobiano de queratinócitos da pele, foram isoladas a partir de tecidos que rodeiam as áreas da queimadura, e estes não foram células obtidas a partir de tecidos da pele de ratos de controle de queimadura. Após a inoculação intradérmica de células Gr-1 (+) e CD11b (+), que foram isoladas a partir de tecidos no local da queimadura, a produção de peptídeos antimicrobianos em torno do local de inoculação de ratos controle de queimadura diminuiu. Além disto, como camundongos termicamente feridos, estes mostraram-se suscetíveis à infecção intradérmica de *P. aeruginosa*. Estes resultados indicam que a

sepsia resultante da infecção por *P. Aeruginosa* no local da ferida é acelerada por células Gr-1 (+) CD11b (+) induzidas por queimadura com capacidade para suprimir a produção de peptídeo antimicrobiano por queratinócitos epidérmicos.

MARTIN *et al.* (2008) investigaram os efeitos de um extrato de *Rosmarinus officinalis* (RO) solúvel em água na expressão da metaloproteinase de matriz-1 (MMP-1) induzida por raios UV. Usando construções de gene promotor reporter MMP1, o extrato de Ro apresentou inibição induzida por UV da supra regulação da transcrição do gene MMP1. O efeito anti MMP-1 foi confirmado ao nível da proteína em fibroblastos dérmicos humanos expostos tanto pelo UVB, UVA ou pela radiação solar estimulada. As análises Zimográficas em géis de caseína e gelatina revelaram que o extrato de Ro é mais especificamente dirigida a MMP-1 comparado a MMP-2. Usando um modelo de pele 3D exposta a radiação solar simulada, a atividade anti-MMP-1 foi confirmada em conjunto com um efeito fotoprotetor no nível morfológico. Por fim, a liberação de citocinas IL-6 e IL1-alfa que participam na super-regulação da MMP-1 induzida pela exposição aos raios UV pudesse ser prevenida pelo extrato Ro. Levando-se em consideração todos os achados, do nível molecular ao nível do tecido, estes resultados ilustram a capacidade do extrato de Ro solúvel em água para inibir a MMP-1 e os seus benefícios potenciais induzidos por UV na prevenção de fotoenvelhecimento cutâneo.

GARIBOLDI *et al.* (2008) estudando, em locais de inflamação ou lesão tecidual, o ácido hialurônico (HA), que é dividido em fragmentos de baixo p.m. HA (LMW-HA) e foram relatados ser ativadores de células imunocompetentes, descobriram que LMW-HA induz a ativação de

queratinócitos que respondem por produtores de beta-defensina 2. Esta produção é mediada pela ativação de TLR2 e TLR4 e envolve uma via de sinalização de c-fos mediada por proteína-quinase C-dependente. LMW-HA induzida por ativação de queratinócitos não parece ser acompanhada por uma resposta inflamatória, porque não se observou a produção de IL-8, TNF-alfa, IL-1 beta ou IL-6. Tratamentos *ex vivo* e *in vivo* em pele de murino com LMW-HA apresentaram uma liberação de beta-defensina 2 de camundongo em todas as camadas do compartimento epidérmico. Portanto, a quebra de componentes da matriz extracelular, por exemplo após a lesão, estimula queratinócitos para liberar defensina beta 2, que protege o tecido cutâneo em um momento em que é particularmente vulnerável à infecção. Além disto, a observação dos autores pode ser importante para abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de possíveis produtos tópicos contendo LMW-HA para aumentar a liberação de beta-defensinas pelos queratinócitos, melhorando assim a auto-defesa da pele para a proteção do tecido cutâneo de infecção por microorganismos.

EREN *et al.* (2008) relatou o caso de uma mulher de 47 anos de idade, com achados clínicos e histológicos típicos de pustulose generalizada aguda (PAG) emergente após uma infecção faríngea em que desenvolveu uma inflamação articular. O paciente mostrou ser HLA-A2 e HLA-B35 positivo. Considerando que a HLA-B35 pode ser associada com doenças de pele pustular, HLA- 2 é um fator de risco para o desenvolvimento da artrite reumatóide.

KAPADIA *et al.* (2011) examinaram a contribuição de diferentes células apresentadoras de antígeno (APCs) primárias na indução de

resposta imune contra a bactéria intracelular *Listeria monocytogenes* (Lm). Os autores verificaram que as células dendríticas (DCs) CD8a (+) são as mais suscetíveis à infecção, enquanto as DCs plasmocitóides não são infectadas. Além disto, DCs CD8a (+) são o único subconjunto DC capaz de imprimir uma resposta imune a LM *in vitro* e são também a única APC estudada que fazem-no quando transferido para camundongo deficiente de microglobulina  $\beta 2$  em que carecem de apresentação endógena cruzada. Após a infecção, DCs CD11b (+) segregam principalmente baixos níveis de TNFa, enquanto DCs CD8a (+) segregam IL-12 p70. Os monócitos infectados segregam elevados níveis de TNFa e IL-12p70, citocinas associadas com macrófagos inflamatórios ativados. Além disto, a co-cultura de DCs CD8a (+) infectados e DC CD11b (+) com monócitos aumenta a produção de IL-12 p70 e TNFa. No entanto, a presença de monócitos na co-cultura de DC/células T atenua o escorvamento de (diminuição) antígenos anti células T derivadas de Lm *in vitro* e *in vivo*. Esta atividade supressora de monócitos derivados de baço é mediada em parte por TNFa e sintase do óxido nítrico induzível (iNOS).

LI *et al.* (2011) mostraram que após abrasão em epitélio corneal, os leucócitos e plaquetas rapidamente entram no estroma da córnea, e células T  $\gamma\delta$  CCR6 (+) IL-17 (+) migram para o epitélio. Os camundongos com células T  $\gamma\delta$  deficientes (TCR $\delta$  (-/-)) foram significativamente reduzidos da inflamação e da cicatrização de feridas epiteliais. O RNAm de CCL20 epitelial aumentou 19 vezes em 3h e, asproteína aumentaram ~ 16 vezes em 6h após a lesão. O tratamento sistêmico ou tópico dos camundongos de tipo selvagem C57BL 6 com anti-CCL20 reduziu a acumulação de células T  $\gamma\delta$  na córnea por > 50% com uma diminuição concomitante na cicatrização do epitélio e inflamação estromal. Além de CCR6 e IL-17, as células T  $\gamma\delta$  da

córnea coraram positivamente para ROR $\gamma$ t, IL-23R, e IL-22. A anti-IL-22 reduziu o pico da divisão celular do epitélio de cicatrização por 52%. O tratamento de camundongos TCR $\delta$  (-/-) com rIL-22 significativamente promoveu o fechamento da ferida, com o pico de divisão celular com aumento > 3 vezes. Além disso, a rIL-22 restaurou o influxo de neutrófilos e plaquetas nos camundongos TCR $\delta$  (-/-) para os níveis de tipo selvagem e aumentou a produção de CXCL1 por explantes de córneas feridas > 2 vezes. Estes resultados indicam que um aspecto importante da resposta de cura à abrasão epitelial da córnea inclui o efluxo de células T  $\gamma\delta$  CCR6 (+) IL-17 (+) A IL-22 (+) dependente de CCL20 e que a IL-22 contribui para a resposta inflamatória e promove a cicatrização epitelial.

KINOSHITA *et al.* (2011) por meio do estudo da infecção por *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente à meticilina, que é uma grande preocupação em pacientes com lesão de queimadura, investigaram se o tratamento com a interleucina 18 (IL-18) possuía eficácia em infecções MRSA pós queimadura. Injeções em dias alternados de IL-18 em lesões por queimaduras em camundongos C57BL/6 aumentaram significativamente a sobrevivência após a infecção por MRSA e após a infecção por *S. aureus* sensíveis à meticilina. Apesar do tratamento por IL-18 em camundongos lesados por queimaduras produzir IgM natural antes da infecção por MRSA e produzir interferon gama (IFN- $\gamma$ ) após a infecção MRSA, nem IgM nem IFN- $\gamma$  contribuiu significativamente para a melhoria na sobrevivência do camundongo. O tratamento por IL-18 aumentou/restaurou o fator de necrose tumoral (TNF) no soro, IL-17, IL-23, o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), e os níveis da proteína inflamatória de macrófagos (MIP-2), bem como a contagem de neutrófilos, após a infecção MRSA de camundongos com lesões de

queimaduras; que também melhorou funções prejudicadas de neutrófilos, a atividade fagocitária, a produção de espécies reativas de oxigênio, e a atividade matado de MRSA. No entanto, o tratamento com IL-18, foi ineficaz contra a infecção por MRSA em ambos camundongos. As funções melhoradas de neutrófilos por IL-18 foi também observada *in vitro*. Além disso, quando os neutrófilos de camundongos lesionados por queimaduras foram adotivamente transferidos para camundongos lesionados por queimaduras não tratados 2 dias após o desafio com MRSA, a sobrevivência dos camundongos receptores aumentou. Camundongos NOD-SCID que têm neutrófilos e macrófagos funcionalmente intactos (mas não de células T, B, ou NK) foram substancialmente resistentes à infecção por MRSA. O tratamento com IL-18 aumentou a sobrevivência de camundongos NOD-SCID após o ferimento de queimadura e infecção por MRSA. Uma transferência adotiva de neutrófilos usando camundongos NOD-SCID também mostrou um efeito benéfico de neutrófilos ativados por IL-18, similar ao observado em camundongos C57BL/6. Assim, embora as funções de neutrófilos serem prejudicadas em camundongos com lesões de queimaduras, a terapia com IL-18 marcadamente ativou as funções de neutrófilos, aumentando assim a sobrevivência da infecção MRSA pós queimadura.

PRICE *et al.* (2012) investigaram o efeito da exposição cutânea a vapor de cloro utilizando um modelo de queimadura de suínos recém-desmamados e análise por *microarray*. Porções ventro abdominal foram expostas a uma concentração média calculada de vapor de cloro de 2,9 g/L, durante 30 min. As amostras de pele foram recolhidas em 1,5h, 3h, 6h e 24h pós-exposição e armazenados em RNeasy <sup>®</sup> até o processamento. O RNA total foi isolado, processado e hibridado com os arrays do genoma

porcino contido no GeneChip® *Affymetrix*. As diferenças na expressão de genes foram observados em relação ao tempo de amostragem. As análises das vias de sinalização da Ingenuity revelaram sete funções biológicas comuns entre as dez principais funções de cada ponto temporal, enquanto a análise da via canonical revelou 3 genes (IL-6, IL1A e IL1B) que foram compartilhados entre três vias de sinalização significativamente alterados. As transcrições que codificam os três genes foram identificados como alvos potenciais terapêuticos comuns para a Fase II/III de ensaios clínicos ou medicamentos aprovados pela FDA. O presente estudo mostrou um perfil transcricional de feridas cutâneas induzidas pela exposição ao cloro identificando alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias contra a lesão da pele provocada pelo cloro.

DURRENBERGER *et al.* (2012) examinaram o aumento da regulação do HLA-E do tecido cerebral. A expressão é significativamente aumentada nas lesões da substância branca do cérebro de doentes com esclerose múltipla em comparação com a matéria branca dos controles saudáveis neurologicamente. Além disto, utilizando imuno-histoquímica quantitativa e microscopia confocal, os autores mostraram aumento na expressão da proteína HLA-E em células endoteliais de lesões ativas em esclerose múltipla. Lesões crônicas não inflamatórias expressam significativamente menos proteína HLA-E, comparável aos níveis observados em matéria branca dos controles. Os níveis de proteína HLA-E aumentada foram associados com escores mais altos de inflamação. Estes resultados sugerem o potencial para um efeito na patogênese do sistema nervoso central para a modulação do HLA-E em tecido estressado. A co-localização com células CD8+ infiltrantes implica um possível papel para a regulação de HLA-E restrito, como foi proposto em outras doenças

auto-imunes.

CAMPBELL *et al.* (2013) demonstraram um papel importante para Nod2 em pele de murino na cicatrização de feridas. A Nod2 cutânea é induzida em tipos de células principais de feridas em resposta à lesão. Na ausência de Nod2, os camundongos exibem um atraso substancial na reparação de lesões agudas associadas a alterações epiteliais e inflamatórias. Especificamente, os camundongos sem Nod2 exibem migração epidérmica alterada e proliferação, um atraso inicial no recrutamento de neutrófilos associada com a diminuição da expressão do receptor de quimiocina CXCR2, e diminuição do número de macrófagos alternativamente ativados (células Ym1 (+)). Surpreendentemente, estes fenótipos Nod2 nulos foram associados com pouca ou nenhuma alteração na expressão de outros receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), embora os mecanismos compensatórios fossem demonstrado existirem. Os autores mostraram que a cicatrização em camundongos TLR2 nulo foi essencialmente normal. Estes resultados revelam um novo papel intrínseco para Nod2 no reparo de feridas cutâneas, além de seu papel no reconhecimento de patógenos invasores.

GRAGNANI *et al.* (2013) avaliaram a expressão gênica de KGF, TNF-alfa e IL-1 beta em fibroblastos da pele e cultura de queratinócitos de pacientes queimados. A expressão de KGF foi aumentado em média 220 vezes em grandes queimaduras e 33,33 vezes em pequenas queimaduras em fibroblastos, e 11,2 vezes em grandes queimaduras e 3,45 vezes em pequenas queimaduras em queratinócitos comparado com pacientes saudáveis. não foi observada expressão de TNF-alfa. IL-1 beta é regulada em fibroblastos de pacientes queimados, e muito mais reprimida



em pequenas queimaduras (687 vezes). Em queratinócitos, a repressão da expressão de IL-1 beta ocorre em pacientes com queimaduras pequenas (-28 vezes), enquanto que os doentes com grandes queimaduras expressam este gene intensamente (-15 vezes). O estudo mostrou um padrão quantitativo na expressão do gene de KGF, e é mais expressa de acordo com o tamanho da queimadura. TNF-alfa não foi expressa. Um teste qualitativo da expressão de IL-1 beta gene foi demonstrado.

ZENG *et al.* (2013) investigaram o envolvimento do sulfureto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), um transmissor gasoso que ocorre naturalmente e que é importante na fisiologia normal e de doenças, na regulação da resposta imune induzida por queimadura em camundongos. Os camundongos C57BL/6 machos adulto foram submetidos a lesões por queimadura e tratados com veículo (cloreto de sódio a 0,9%, NaCl; 100 ml/kg de peso corporal; subcutaneamente, sc) ou com o doador de H<sub>2</sub>S (hidrosulfito de sódio, NaHS; 2 mg/kg de peso corporal, sc). Comparado com os controles, os camundongos que receberam queimaduras apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de H<sub>2</sub>S no plasma. Além disto, os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$ , interleucina (IL) 6 e 8 aumentaram significativamente, enquanto que os níveis de IL 10 foram reduzidos, em comparação com a dos controles no plasma de camundongos submetidos a lesões por queimadura. A atividade da mieloperoxidase (MPO) no tecido do fígado lesionado de camundongos também foi significativamente mais elevada comparada com a do grupo de controle. No entanto, a administração de NaHS diminuiu significativamente os níveis de TNF, IL  $\alpha$  6 e IL 8, mas aumentou os níveis de IL 10 no plasma de ratos submetidos a lesões por queimadura. Além disto, a atividade de MPO foi diminuída por NaHS. Estes resultados sugerem que o H<sub>2</sub>S

regula a resposta inflamatória induzida pela lesão por queimadura através da modulação dos níveis de TNF  $\alpha$ , IL 6, IL 8, IL e 10. Assim, foi proposto que a administração de de H<sub>2</sub>S, NaHS, pode ser uma terapia útil contra a resposta imune exarcebada que está associada com lesão por queimadura.

SHI *et al.* (2014) estudaram a cicatriz hipertrófica (SH) que é uma condição da pele fibrótica grave e um problema clínico importante. A interleucina-10 (IL-10) foi identificada como um composto de melhora na cicatriz em perspectiva com base em ensaios pré-clínicos. Assim, analisaram a expressão do receptor de IL-10 em tecido humano com SH e em fibroblastos primários de SH (HSFS) e os mecanismos moleculares que contribuem para as capacidades anti-fibróticas e cicatriz de melhora de IL-10. A expressão do receptor de IL-10 foi avaliada em tecido HS e HSFS por imuno-histoquímica, microscopia de imunofluorescência, e análises de reação em cadeia da polimerase. HSFS primários foram tratados com IL-10, um inibidor específico de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (LY294002) ou um anticorpo de bloqueamento da função do receptor de IL-10 (IL-10RB). Em seguida, a análise de Western blot foi realizada para avaliar as alterações no estado de fosforilação de AKT e transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STAT) 3, assim como os níveis de proteínas relacionadas com a expressão de fibrose. O tecido HS e HSFS primários foram caracterizados pela expressão do receptor de IL-10 e por uma elevada expressão de marcadores fibróticos em relação aos controles normais. Os HSFS primários expressam o receptor de IL-10, enquanto a IL-10 induziu a fosforilação de AKT e STAT3 nestas células. Além disto, LY294002 bloqueou AKT e a fosforilação de STAT, e também super regulou a expressão e os níveis de colágeno de tipo I e tipo III (Col 1 e Col 3) e actina de músculo liso alfa ( $\alpha$ -SMA) em células tratadas com de IL-10.

Do mesmo modo, IL-10R $\beta$  reduziu a fosforilação da STAT3/AKT e bloqueou a mitigação de IL-10 mediada por fibrose em HSFS. Assim os autores concluíram que IL-10 inibe a fibrose aparentemente através da ativação AKT e da fosforilação de STAT3 a jusante do receptor de IL-10, e por facilitar ligação cruzada entre as vias de sinalização celular PI3K/AKT e STAT3.

KRAFT *et al.* (2015) determinaram se a expressão de interleucina 8 (IL-8) pode ser utilizado para prever sepsis, infecções e a mortalidade pós queimadura. Pois a IL-8 é um importante mediador de respostas inflamatórias, a resposta inflamatória induzida pela lesão por queimadura contribui para o aumento da incidência de infecções, sepse, insuficiência de órgãos e de mortalidade. Assim, o acompanhamento da inflamação pós queimadura é de suma importância, mas, até agora, não há biomarcadores confiáveis para monitorar e/ou prever complicações infecciosas após a queimadura. As citocinas plasmáticas, proteínas de fase aguda, proteínas constitutivas e hormônios foram analisados durante os primeiros 60 dias após a lesão de 468 pacientes pediátricos queimados. A demografia e as variáveis clínicas (duração da estadia, infecção, sepse, insuficiência de múltiplos órgãos [MOF] e mortalidade) foram registradas. O nível de corte identificado para caracterizar sobrevivência foi de 234 pg / ml de IL-8. Os pacientes foram agrupados de acordo com sua média de níveis relativos de IL-8 e estratificada em grupos de alta (H) (n = 133) e baixa (L) (n = 335). Níveis elevados de IL-8 correlacionou-se com o aumento do MOF, sepse e a mortalidade. Estes dados sugerem que os níveis séricos de IL-8 podem ser um biomarcador válido para monitorizar sepse, infecções e a mortalidade em pacientes com queimaduras.

## **MÉTODOS**

## 4 MÉTODOS

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa observacional, transversal, analítica, experimental, *in vitro*. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo e aprovado sob número 146.468 em 09 de novembro de 2012 (**Anexo 1**).

Foram incluídos no estudo utilizando cultivo de queratinócitos, vinte (20) pacientes, divididos em dois (2) grupos: dez (10) pacientes no grupo grande queimado e dez (10) pacientes no grupo controle (**Tabela 1**).

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

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

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

O número de pacientes foi adequado por se tratar de linhagem celular primária estabelecida no laboratório com a criação de um Banco de Células dessa população, não existindo outras variáveis envolvidas no experimento, além da carga genética celular individual, e por ser realizado o experimento após a segunda passagem, próximo do momento do trauma da queimadura após a obtenção do fragmento de pele.

O experimento de *PCR Array* é padronizado por ser realizado em *pool* do pacientes, sendo apresentado valores da média de todos pacientes, comparados ao grupo controle, sendo realizado separadamente cada grupo em triplicata.

Para o estudo utilizando fragmentos de pele, analisou-se sete (07) pacientes, divididos em dois (2) grupos: quatro (04) pacientes no grupo grande queimado e três (03) pacientes no grupo controle (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Dados dos pacientes incluídos no estudo para fragmentos de pele com grande queimadura e controle.

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Média de Idade</b>	<b>Gênero</b>
Controle	3	35,0	3F
Queimado	4	31,5	1F/3M

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

No estudo com fragmentos de pele, o objetivo foi realizar um estudo piloto para padronização dos ensaios de *PCR Array*, já que o presente trabalho foi um dos primeiros estudos na literatura. Outra questão é que os dados experimentais obtidos se tornam relativamente reprodutivos, pois se extraem moléculas de RNA total em alta quantidade, por ser de amostra tecidual e, realizado em *pool* e em triplicata experimental. No fragmento de pele existem distribuídos, nas diferentes camadas da epiderme e derme, todos os tipos celulares, ou seja, queratinócitos, fibroblastos, células sanguíneas, de defesa, células de músculo liso, entre outras. Assim, nesse caso, teremos uma população celular heterogênea. E, por outro lado, no cultivo de queratinócitos isolados, obteve-se uma população celular homogênea. Portanto, por princípio, os dados desses dois grupos não devem ser diretamente comparáveis, e não era essa a finalidade do seu uso.

Os pacientes do grupo grande queimado foram aqueles que se apresentavam internados na Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo no Hospital Universitário – Hospital São Paulo (UTQ-DCP-UNIFESP-HU-HSP), e pelo número reduzido de internações e heterogeneidade dos casos de queimadura, a seleção foi a de entrada dos pacientes, sendo que foram selecionados os que apresentaram critérios de inclusão.

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**) foi aplicado aos pacientes dos grupos queimado e controle convidados e que aceitaram participar do estudo.

A fase experimental, *in vitro*, foi realizada no Laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica, localizado no Edifício Acadêmico Prof. Dr. Horácio Knesse de Mello, na Rua Pedro de Toledo, 871 – quarto andar fundos - Vila Clementino-São Paulo. Esta fase compreendeu o cultivo de queratinócitos primários, extração de RNA, *PCR array* e análise dos dados.

## **GRUPO GRANDE QUEIMADO**

### **Critérios de Inclusão**

Pacientes de ambos os sexos, idade acima de 18 anos, que concordaram em participar da pesquisa e que assinaram o termo de consentimento, estavam internados na UTQ-DCP-UNIFESP-HU-HSP, apresentavam necessidade de procedimento(s) operatório(s), com queimadura de 2º grau profundo ou 3º grau acometendo entre 25% e 50% da superfície corpórea queimada (SCQ) ou que necessitavam de enxertia de pele parcial em 10% de superfície corpórea queimada.

### **Critérios de Não-Inclusão**

Não concordaram em participar da pesquisa, apresentavam doença prévia de pele ou lesão superficial (Psoríase e similares), doenças clínicas que interferem diretamente com o processo infeccioso e com o processo de cicatrização de feridas (Colagenoses como lúpus eritematoso, esclerodermia, dermatopolimiosite, doença mista do tecido conjuntivo), e pacientes que apresentavam choque séptico e falência de múltiplos órgãos.



## **Critérios de Exclusão**

Contaminação das garrafas de cultivo, taxa de proliferação baixa sem obter confluência de 80% das células nas garrafas, quantidade insuficiente de RNA extraído que impeça a avaliação dos dados do paciente, e perda do material extraído.

## **GRUPO CONTROLE**

Idade acima de 18 anos, ambos os sexos, concordaram em participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento, apresentavam necessidade de procedimento operatório – cirurgia estética – mamoplastia, com retirada de pele que foi descartada, não apresentavam doenças prévias, e não eram fumantes, para definir um paciente hígido sem alterações conhecidas.

## **Instrumentos de Pesquisa**

### **Procedimento operatório**

A obtenção das amostras de pele necessárias para o desenvolvimento da pesquisa foi realizada por meio do procedimento operatório padrão utilizado para o tratamento de grande queimado da UTQ-DCP-UNIFESP-HSP. O desbridamento do tecido desvitalizado de um paciente com queimadura de 2º grau profundo ou de 3º grau, que não apresenta complicações, é realizado ao terceiro dia após a queimadura, não modificando o aspecto da fase a ser estudada, fase aguda após a ressuscitação inicial e ainda sem quadro de infecção grave.

Durante essa limpeza operatória, a pele normal adjacente àquela necrosada acaba sendo retirada parcialmente por causa do próprio procedimento operatório. Isso, pois, os limites da lesão são irregulares e o instrumento utilizado para a excisão, a faca de *Blair*, não é preciso mas sim retilíneo, fazendo com que parte do tecido viável seja descartado ou então, armazenado, para ser utilizado em diferentes análises, como no caso do presente estudo.

Portanto, a pele íntegra que seria descartada, foi aproveitada e o material foi enviado ao laboratório para o isolamento das células, cultivo e experimentos. Além do cultivo, na fase inicial do estudo analisamos amostras teciduais de fragmentos de pele de pacientes queimados e controle.

### **Cultura de Queratinócitos**

Os queratinócitos humanos normais derivados de fragmento de pele de pacientes vítimas de queimadura foram isolados e cultivados de acordo com o método padrão (GREEN, KEHINDE, THOMAS, 1979; GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA, 2002; SOBRAL *et al.*, 2007) com adaptações, descrito a seguir.

Em uma placa de cultura de 60 mm o fragmento foi colocado e seccionado em pequenos pedaços com tamanho aproximado de 0,5 cm<sup>3</sup>. Esses fragmentos foram colocados em tubo estéril de 50 ml, com 30 ml de dispase (4,7 U/mL) (Roche, ref. 04942078001) em meio nutritivo DMEM, sendo mantidos refrigerados a 4°C por 18 horas para ação da dispase II humana recombinante. Após esse período, cada fragmento teve a epiderme destacada delicadamente da derme com o auxílio de pinças e a epiderme foi destinada ao cultivo de queratinócitos pelo protocolo padrão do laboratório de Cirurgia Translacional da Disciplina de Cirurgia Plástica da EPM/UNIFESP utilizando tripsina 0,25% por 10 minutos e posteriormente realizada a centrifugação e suspenso o botão de células em meio próprio para queratinócitos (GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA, 2002).

Esse protocolo necessita da utilização da camada sustentadora de fibroblastos de rato da linhagem 3T3-J2 (ATCC, USA), que quando esta com 50% de confluência sofre a ação por duas horas de 15 µg/ml da mitomicina C (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.) para que as células continuem viáveis, mas não proliferativas, portanto, existe área suficiente na garrafa para que os queratinócitos isolados possam aderir ao substrato e proliferar com o auxílio dos fatores de crescimento produzidos por esses fibroblastos.

Quando os queratinócitos apresentam a confluência de 80% na garrafa, eles sofrem tratamento enzimático com tripsina 0,25% e são passados para nova garrafa para aumentar a população de queratinócitos, que posteriormente podem ser criados armazenados ou utilizados após a terceira passagem em experimentos (GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA, 2002).

## **Extração do RNA total**

Em cada uma das amostras celulares ou de fragmentos de pele foi adicionado 750 µl de *QIAzol Lysis Reagent (Qiagen Company)*, agitado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente por quinze minutos. Foi adicionado 200µL de clorofórmio com posterior agitação por quinze segundos. Após a incubação de quinze minutos a temperatura ambiente, foi centrifugado o material por quinze minutos a 12.000 rpm 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de Eppendorf de 1,5mL, adicionado 500µl de álcool isopropílico, agitado gentilmente e incubado por dez minutos a 12.000 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Etanol 70% foi adicionado e centrifugado novamente por cinco minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e o excesso de álcool foi retirado com a pipeta. Depois de seco, o RNA foi ressuspense em 50µL de água ultra pura livre de nuclease e armazenado no freezer -80°C até sua utilização.

## **Purificação do RNA total**

As amostras do RNA dos indivíduos do grupo controle ou do grupo grande queimadura foram purificadas utilizando o *RNeasy Mini Kit (Qiagen Company)* conforme o protocolo do fabricante.

## Quantificação do RNA total

A quantificação e pureza do RNA foram avaliadas através de espectrofotometria no aparelho NanoVue Plus GE (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA). A absorvância das amostras foi medida nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, sendo que  $DO_{260}=1$  corresponde a 40ng/ $\mu$ l de concentração. Foi considerado RNA de boa qualidade quando a razão  $DO_{260}/DO_{280}$ , foi superior a 1,8 (SAMBROOK, FRITSCHI, MANIATIS, 1989).

## RT-PCR Array quantitativo

O volume final de RNA de cada paciente de 750ng foi usado para síntese de cDNA. Amostras foram tratadas com o tampão oriundo do *Kit*, e reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT<sup>2</sup> First Strand kit da Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante.

As reações em cadeia da polimerase após retro transcrição quantitativas (qRT-PCR) foram realizadas usando-se o *RT<sup>2</sup> Profiler<sup>®</sup> PCR array da Superarray Bioscience* (<http://www.sabiosciences.com/howpcarrayworks.php>).

Para cada paciente, 84 genes foram analisados para genes humanos relevantes envolvidos a resposta Imune Inata e Adaptativa (PAHS-052Z). A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas serão realizadas em um *ABI Prism 7500fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)*.

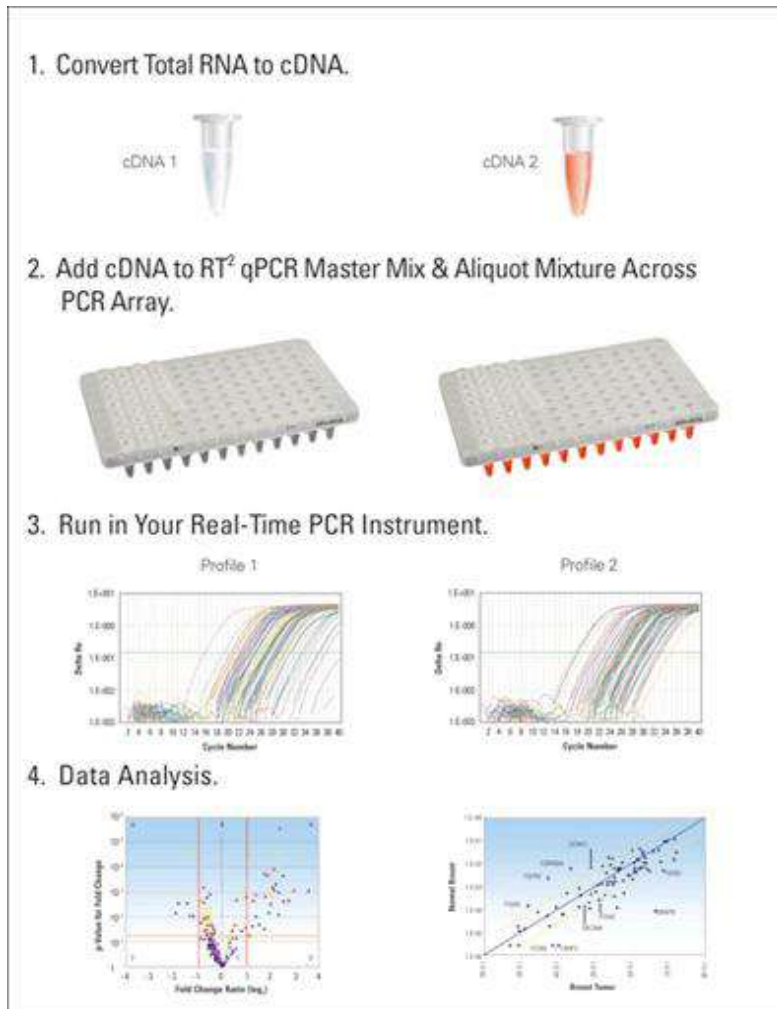
Em cada curva, cada gene foi checado quanto à eficiência, limiar máximo e mínimo na curva padrão. Para garantir comparações entre curvas, o mesmo limiar foi estabelecido para os cinco (05) genes e corridas: ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 e RPLPO que foram usados como controle interno. E, e a média dos valores de Ct foi usado para padronizar a expressão gênica ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) e valores de p. A expressão gênica foi considerada regulada para cima (hiper-expresso) ou regulada para baixo (hipo-expresso) quando a diferença foi maior que dois positivo ou menor que dois negativo, respectivamente.

A seguir, apresentado o painel de genes agrupados de acordo com a função de cada gene relacionado à imunidade inata ou adaptativa (**Quadro 1**).

**Quadro 1** – *Inate and Adaptive Immunity PCR Array* (PAHS-052Z) (Qiagen, Valencia, EUA) com 84 genes marcadores da Imunidade Inata e Adaptativa.

<b>RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Inate and Adaptive Immunity</b> (Qiagen, Valencia, EUA) (nº catálogo: PAHS-052Z)
<b>Innate Immunity:</b>
<u>Pattern Recognition Receptors:</u> DDX58 (RIG-I), NLRP3, NOD1 (CARD4), NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9.
<u>Cytokines:</u> CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10, IFNA1, IFNB1, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL8, TNF.
<u>Other Genes:</u> APCS, C3, CASP1 (ICE), CD14, CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, HLA-A, HLA-E, IL1R1, IRAK1, IRF3, IRF7, ITGAM, LY96 (MD-2), LYZ, MAPK1 (ERK2), MAPK8 (JNK1), MBL2, MPO, MX1, MYD88, NFKB1, NFKBIA (I?Ba/Mad3), STAT1, TICAM1 (TRIF), TRAF6.
<b>Adaptive Immunity:</b>
<u>Th1 Markers/Immune Response:</u> CCR5, CD80, CXCR3, IFNG, IL18, IL23A, SLC11A1, STAT4, TBX21, TLR4, TLR6.
<u>Th2 Markers/Immune Response:</u> CCR4, CCR8, CD86, GATA3, IFNB1, IL10, IL13, IL18, IL4, IL5, IL6, NOD2, STAT6.
<u>Th17 Markers:</u> CCR6, IL17A, RORC, STAT3.
<u>Treg Markers:</u> CCR4, CCR8, FOXP3, IL10.
<u>T Cell Activation:</u> CD80, CD86, ICAM1, IFNG, IL23A, IL6, SLC11A1.
<u>Cytokines:</u> CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNG, IL10, IL13, IL17A, IL18, IL2, IL23A, IL4, IL5, IL6, IL8, TNF.
<u>Other Genes:</u> CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, FASLG (TNFSF6), HLA-A, IFNAR1, IFNGR1, IL1B, IL1R1, IRF3, IRF7, ITGAM, JAK2, MAPK8 (JNK1), MBL2, MX1, NFKB1, RAG1, STAT1.
<b>Humoral Immunity:</b> C3, CCL2 (MCP-1), CCR6, CRP, IFNB1, IFNG, IL6, MBL2, NOD2, TNF.
<b>Inflammatory Response:</b> APCS, C3, CCL5 (RANTES), CRP, FOXP3, IL1A, IL1B, IL4, IL6, MBL2, STAT3, TNF.
<b>Defense Response to Bacteria:</b> IFNB1, IFNG, IL23A, IL6, LYZ, MBL2, MYD88, NOD1 (CARD4), NOD2, SLC11A1, TLR1, TLR3, TLR4, TLR6, TLR9, TNF.
<b>Defense Response to Viruses:</b> CD4, CD40 (TNFRSF5), CD86, CD8A, CXCL10 (INP10), DDX58 (RIG-I), HLA-A, IFNAR1, IFNB1, IL23A, IL6, IRF3, NLRP3, TICAM1 (TRIF), TLR3, TLR7, TLR8, TYK2.

A **Figura 1** mostra as quatro etapas do *PCR Array* para obtenção dos dados de expressão gênica.



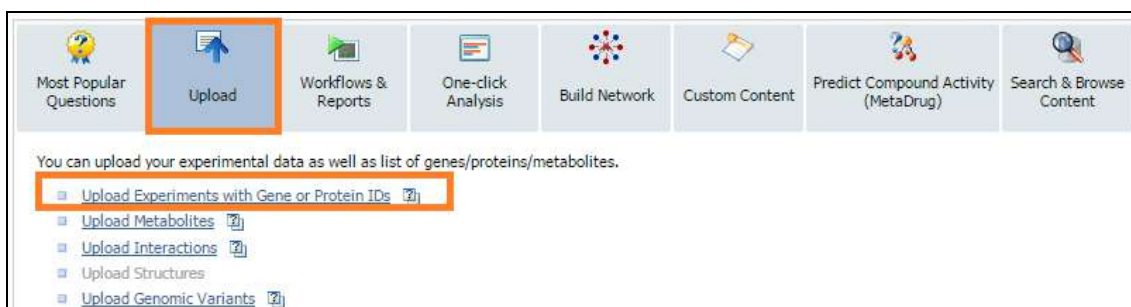
**Figura 1** – Demonstração das quatro etapas do *PCR Array*: 1) Conversão de RNA total em cDNA; 2) Adição de cDNA ao *RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix & Aliquot Mixture* por toda placa de *PCR Array*; 3) Correr a placa em aparelho de PCR em tempo real; 4) Análise dos dados de expressão gênica. ([http://www.sabiosciences.com/rt\\_pcr\\_product/HTML/PAHS-011A.html](http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-011A.html)).



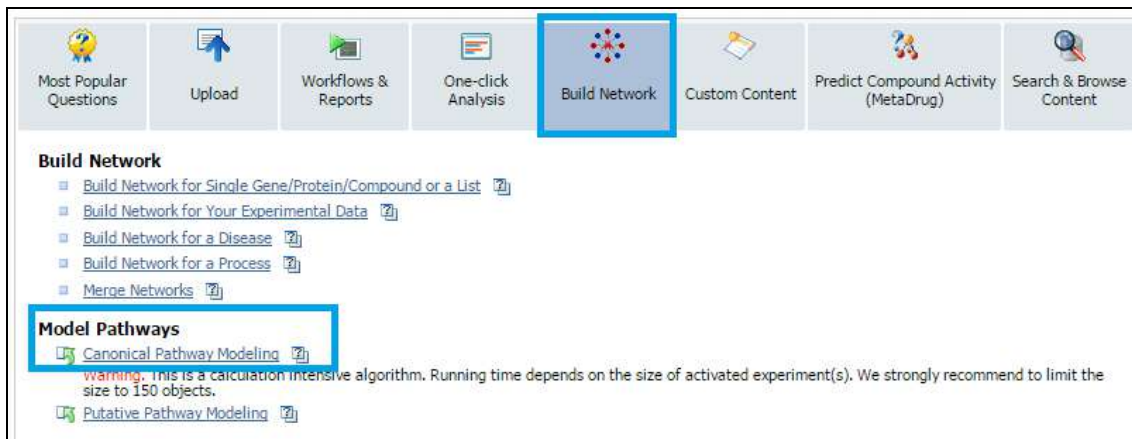
## Análise de Processos Metabólicos e de *networks* por meio do programa Metacore®

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 (**Figura 2**) do programa Metacore® (*Thonson Reuters*). Em seguida as redes foram construídas em tempo real (**Figura 3**) 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.



**Figura 2.** Página inicial para carregamento (*upload*) da lista de genes a serem analisados pelo programa Metacore®.



**Figura 3.** Página seguinte após o carregamento da lista de genes. Em seguida é construído pelo programa os caminhos gênicos (*Build Networks*) para obtenção das ontologias gênicas.

### Análise Estatística

As alterações na expressão gênica na Imunidade Inata e Adaptativa induzidas pela queimadura e analisadas por meio do *RT<sup>2</sup>-Profiler<sup>TM</sup> PCR Array* (SA Biosciences) foram 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 também foram gerados gratuitamente nesta página da empresa. O nível de significância estatística foi fixado em 0,05 e os genes apresentados nos resultados apresentavam  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

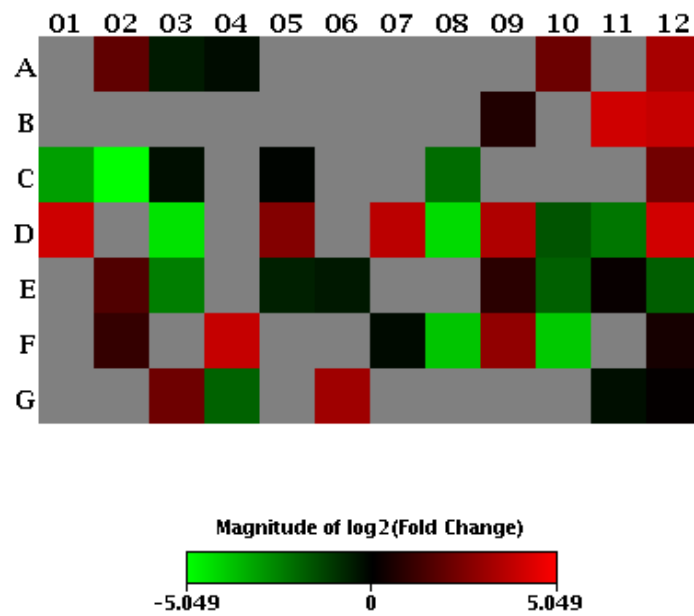
## 5. RESULTADOS

Após corrida da placa 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 para a via de expressão de imunidade inata e adaptativa.

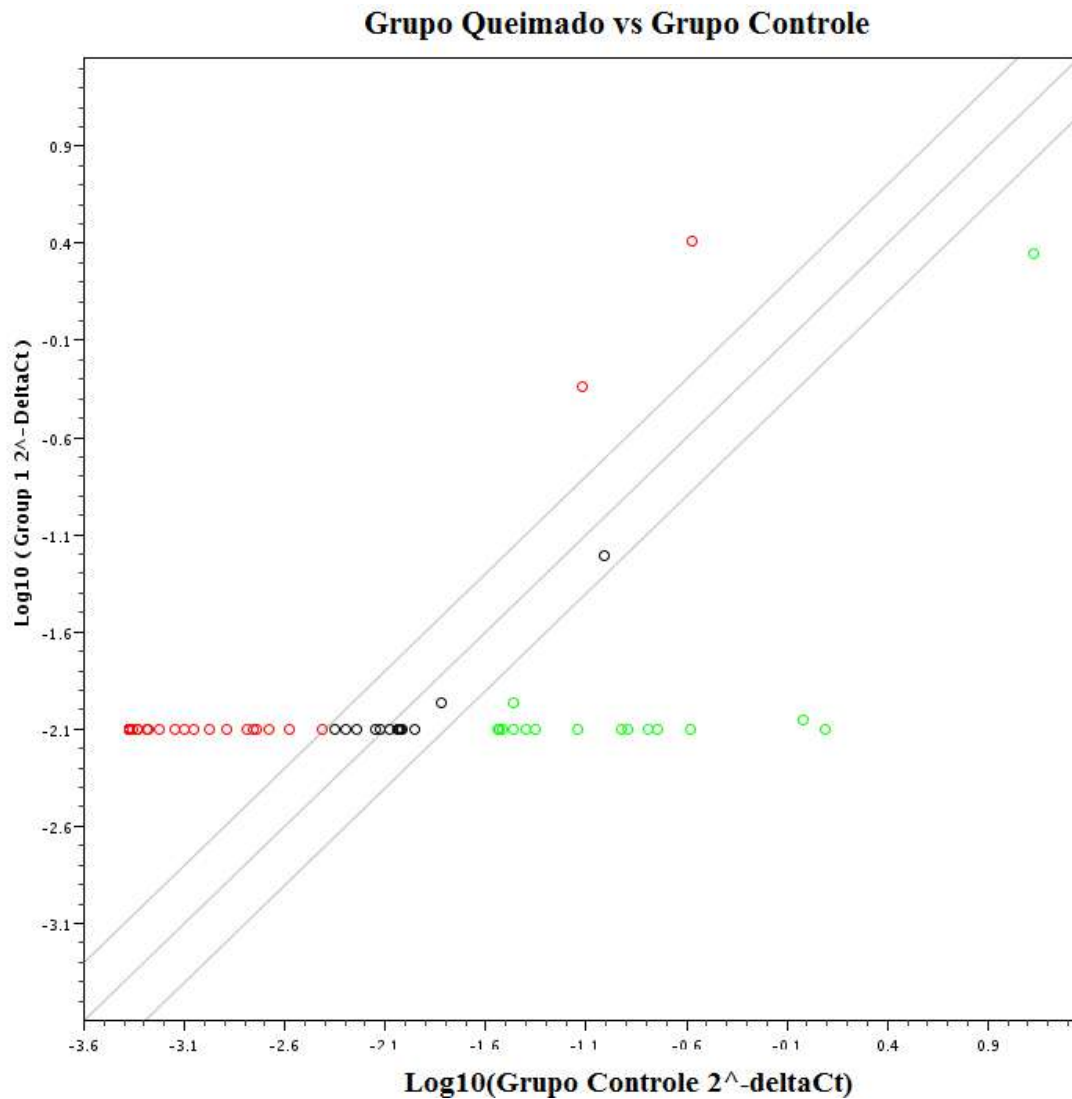
### CULTURA DE QUERATINÓCITOS

Após a obtenção dos dados de *Fold Regulation* e os valores de  $p$ , utilizando o programa específico no site da *SA Biosciences*, somente foram selecionados os genes que possuíam valores de  $p$  menor que 0,05 e também que apresentaram *Fold Regulation* maior que 2,0 ou menor que -2,0. Para análise da cultura de queratinócitos, observou-se 8% de genes diferencialmente expressos, sendo 100% hipo-expressos (**Figuras 4 e 5**).

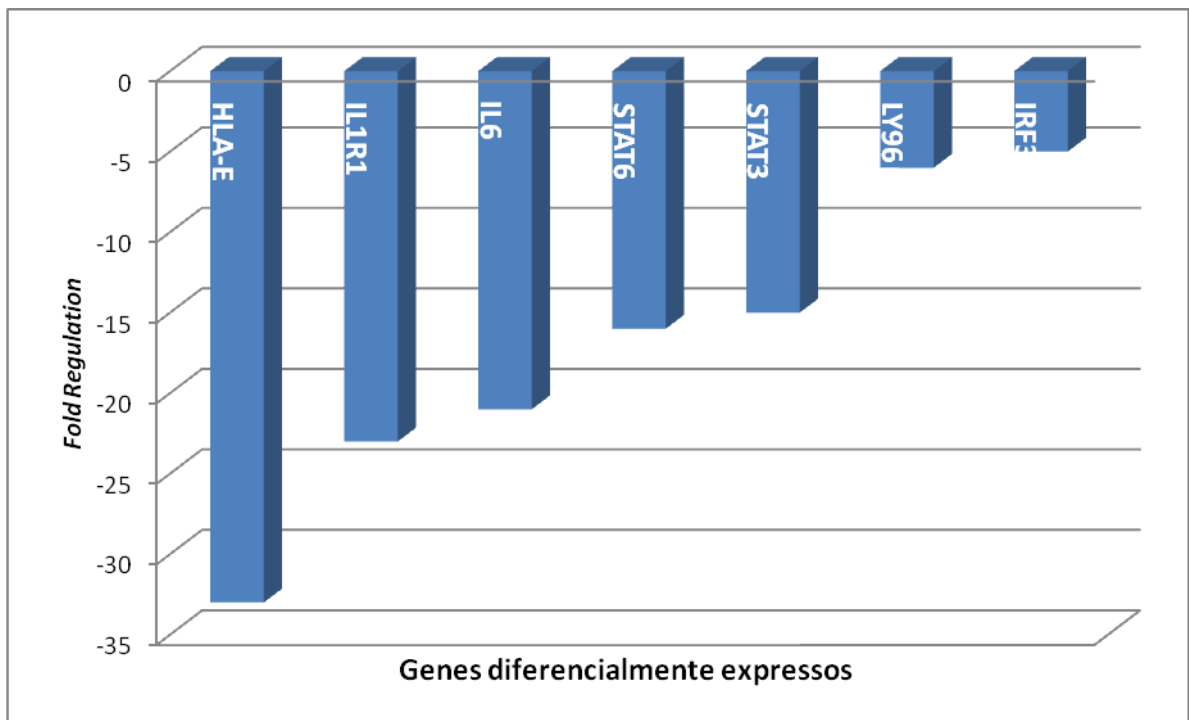
Obtiveram-se sete genes diferencialmente expressos (8%), que se apresentaram 100% hipo-expressos: HLA-E (-33 vezes), IL1R1 (-23 vezes), IL6 (-21 vezes), STAT6 (-16 vezes), STAT3 (-15 vezes), LY96 (-6 vezes), IRF3 (-5 vezes) (**Figura 6**).



**Figura 4** - Mapa de calor para marcadores da Imunidade para cultura queratinócitos de pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados.



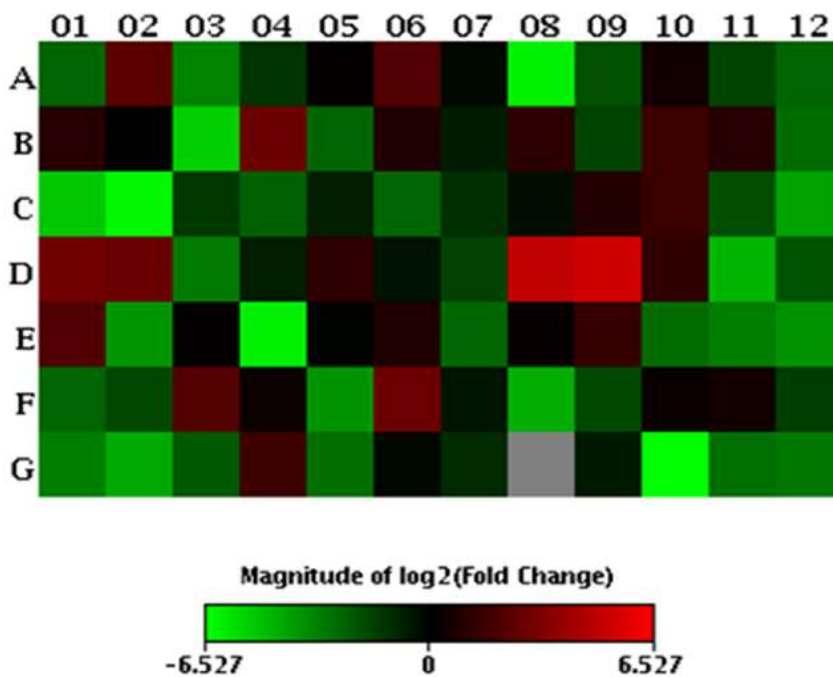
**Figura 5.** Gráfico de dispersão para marcadores da Imunidade em cultura de queratinócitos de pacientes queimados. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados.



**Figura 6** - Genes diferencialmente expressos para as vias de sinalização da imunidade em cultura primária de queratinócitos de pacientes queimados em relação a pacientes controles.

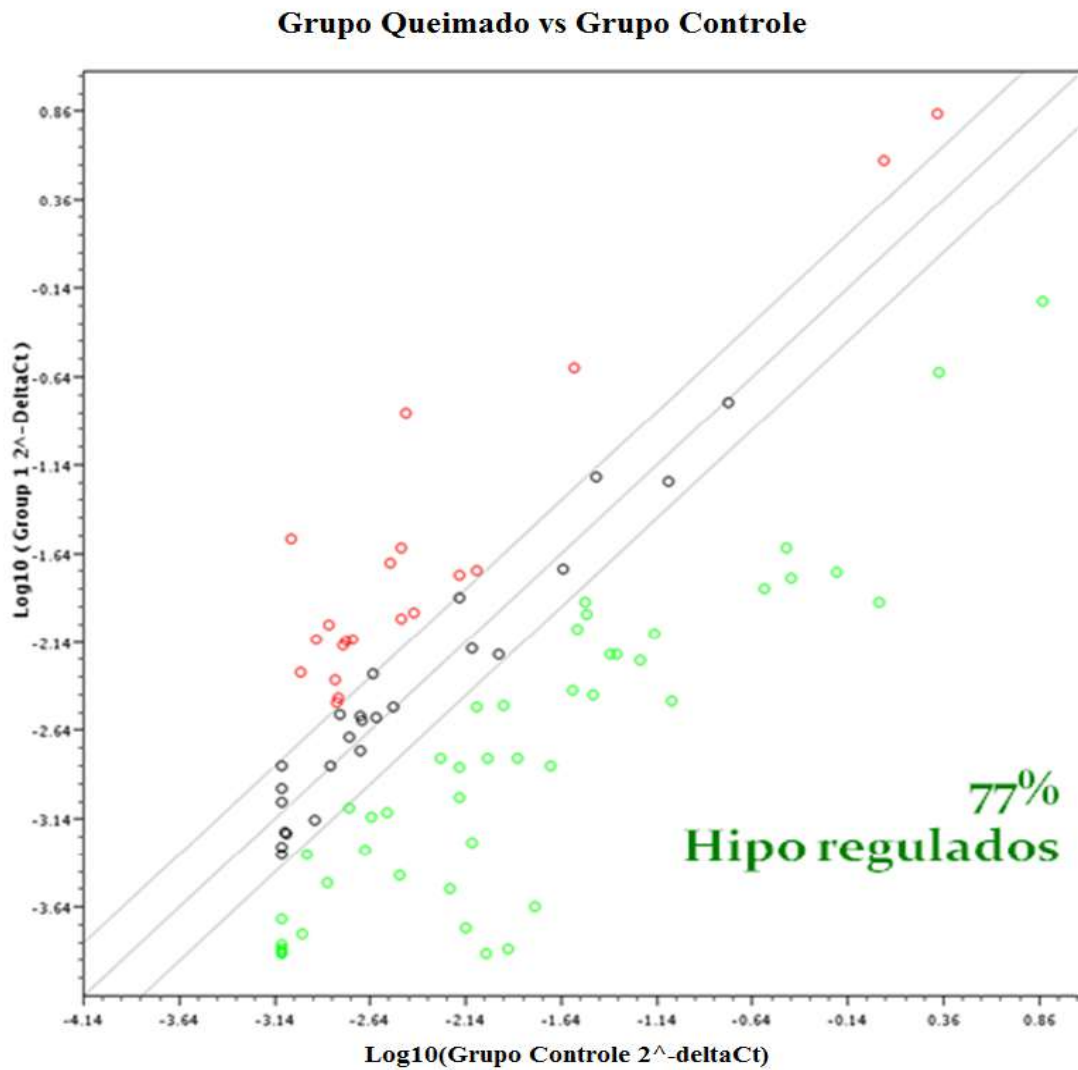
## FRAGMENTOS DE PELE

Após a obtenção dos dados de *Fold Regulation* e os valores de  $p$ , utilizando o programa específico no site da *SA Biosciences*, somente foram selecionados os genes que possuíam valores de  $p$  menor que 0,05 e também que apresentaram *Fold Regulation* maior que 2,0 ou menor que -2,0. Para as amostras de pele 63% destes genes foram diferencialmente expressos, dentre estes 77% foram expressos ou regulados negativamente (**Figuras 7 e 8**).



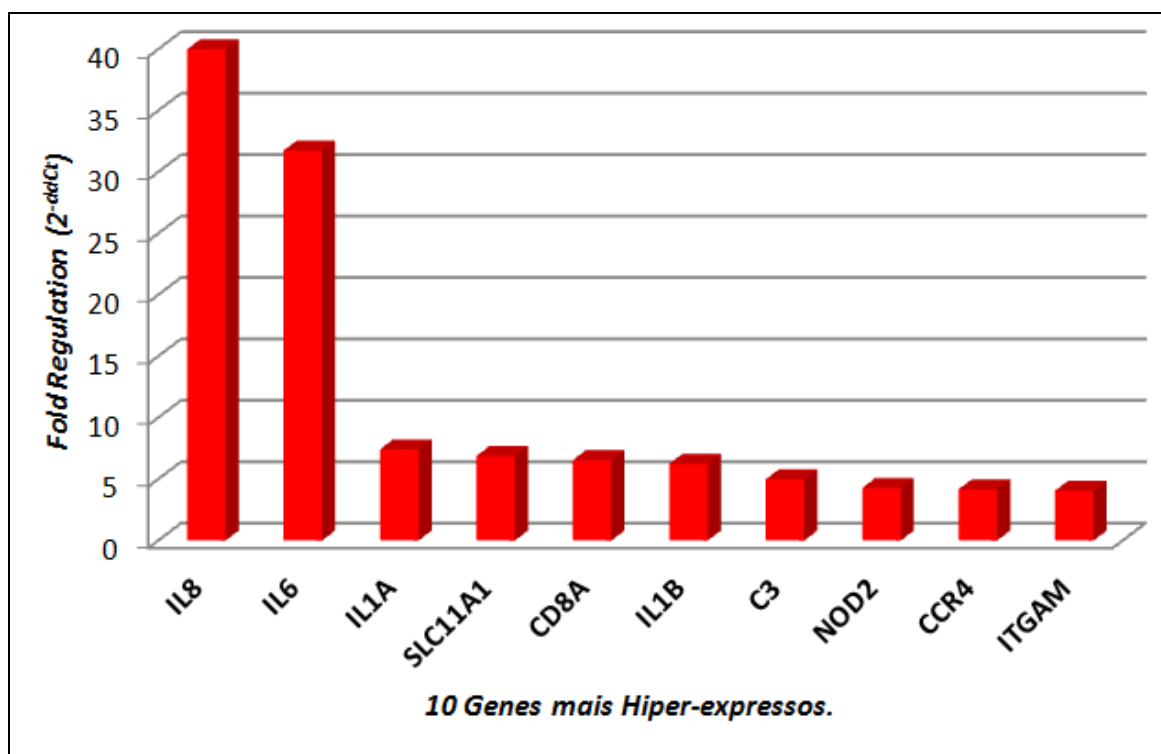
**Figura 7-** Mapa de calor para marcadores da Imunidade em pele de pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados.





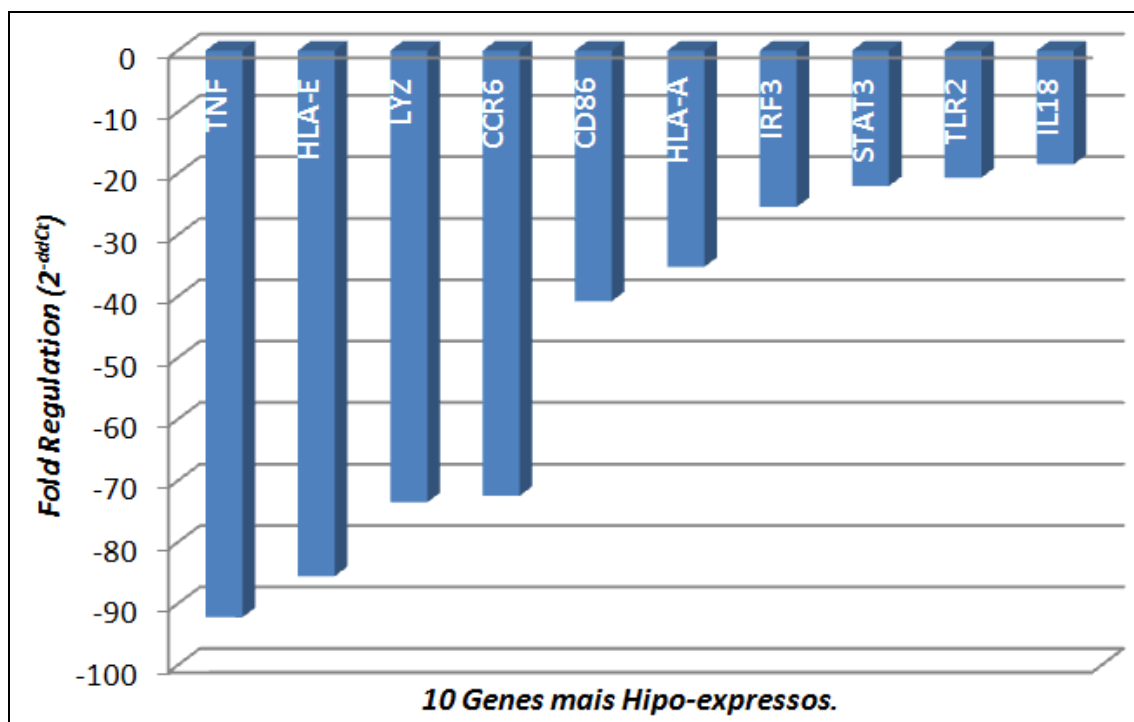
**Figura 8** - Gráfico de dispersão para marcadores da Imunidade em pele de pacientes queimados. Em vermelho, genes hiper-regulados; em verde, genes hipo-regulados; e em preto, os genes não regulados.

Dentre os genes diferencialmente expressos, destacamos os dez genes mais hiper-expressos: IL-8 (41 vezes), IL-6 (32 vezes), IL1A (7,4 vezes), SLC11A1 (6,7 vezes), CD8A (6,6 vezes), IL1B (6,3 vezes), C3 (5,0 vezes), NOD2 (4,3 vezes), CCR4 (4,2 vezes) e ITGAM (4,1 vezes) (**Figura 9**).



**Figura 9** - Genes hiper-expressos para as vias de sinalização da imunidade em pele de pacientes queimados em relação a pacientes controles.

E, também destacamos os dez genes mais hipo-expressos: TNF (-92 vezes), HLA-E (-86 vezes), LYZ (-74 vezes), CCR6 (-72 vezes), CD86 (-41 vezes), HLA-A (-35 vezes), IRF3 (-25 vezes), STAT3 (-22 vezes), TLR2 (-21 vezes) e IL18 (-18 vezes) (**Figura 10**).

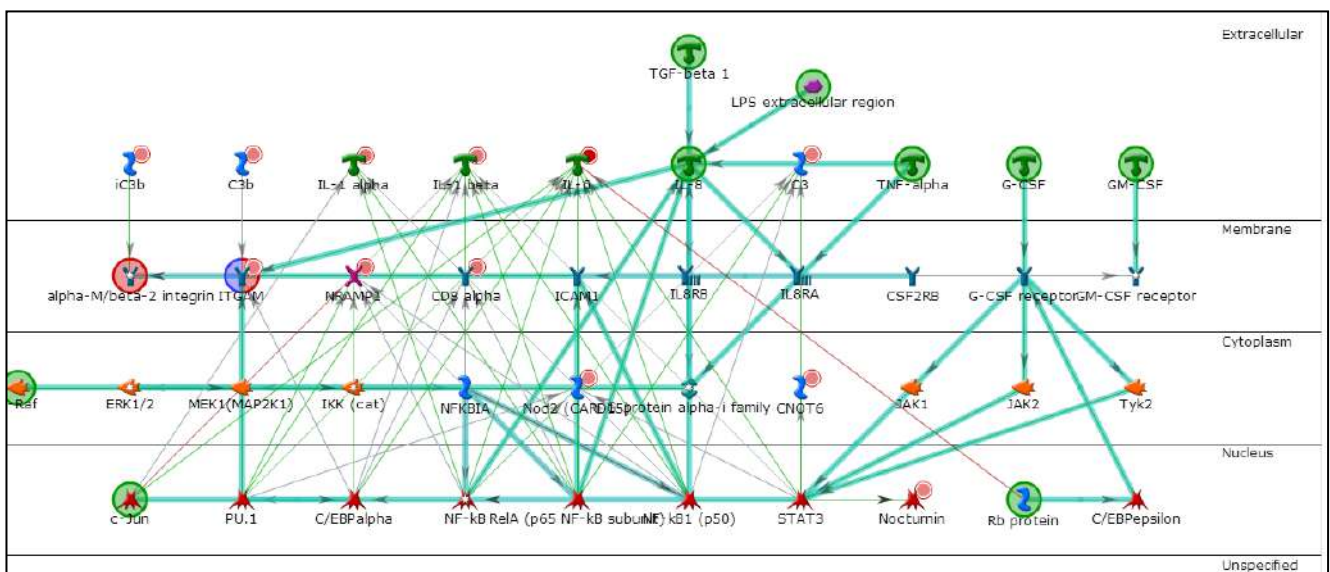


**Figura 10** - Genes hipo-expressos para as vias de sinalização da imunidade em pele de pacientes queimados em relação a pacientes controles.

## Análises por Metacore®

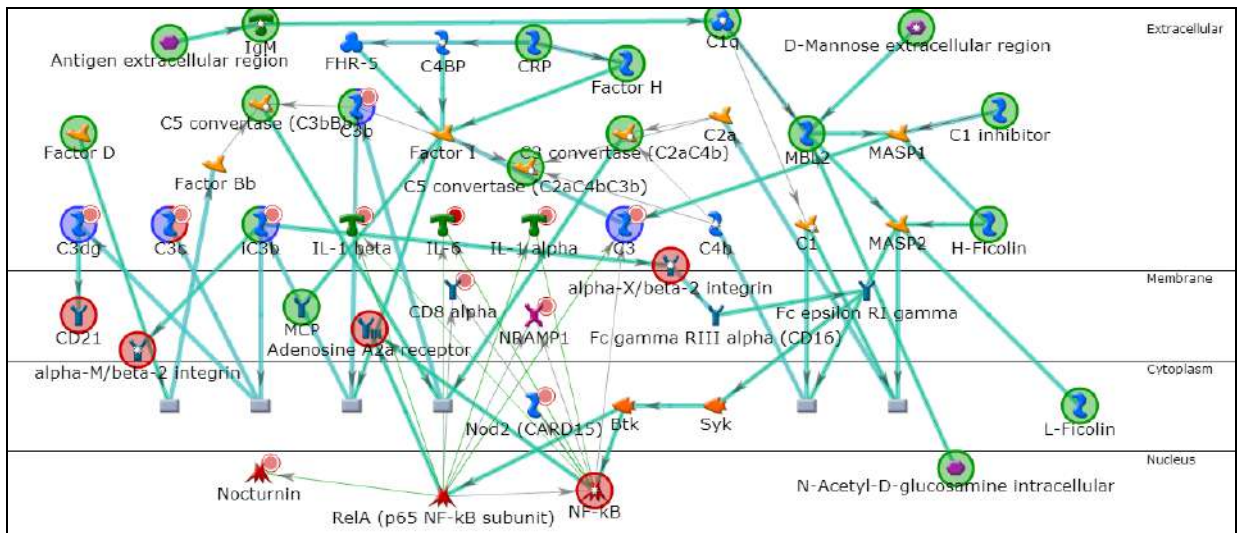
Com a lista dos genes obtidos tanto na cultura de queratinócitos como no fragmento de pele foi analisada pelo programa Metacore®, sendo que somente para a lista de genes na cultura de queratinócitos foi possível construir as vias canônicas apresentadas a seguir. Por meio do programa Metacore® (*Thonson Reuters*) foram construídas as vias canônicas para os genes mais **hiper-expressos** (Figuras 11 a 18) e para os genes mais **hipo-expressos** (Figuras 19 e 20), ou seja, para aqueles genes que apresentaram expressão gênica diferencial “mais acentuada” para cima ou para baixo.

Portanto para os genes hiper- e hipo-regulados obtivemos 08 e 02 vias canônicas com suas respectivas ontologias gênicas, respectivamente.

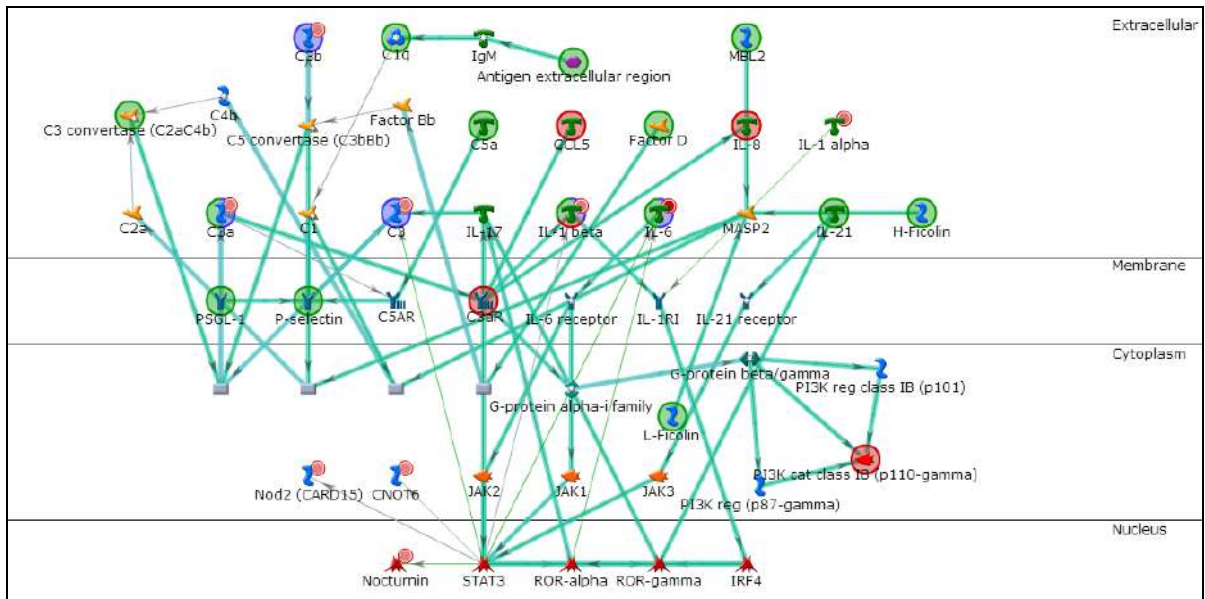


**Figura 11.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Sistema Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 01** (*ITGAM*, *alpha-M/beta-2 integrin*, *IL-8*, *c-Jun*, *Rb protein*). Ontologias Gênicas relacionadas: *response to lipopolysaccharide* (56.4%;  $3.784e-26$ ), *response*

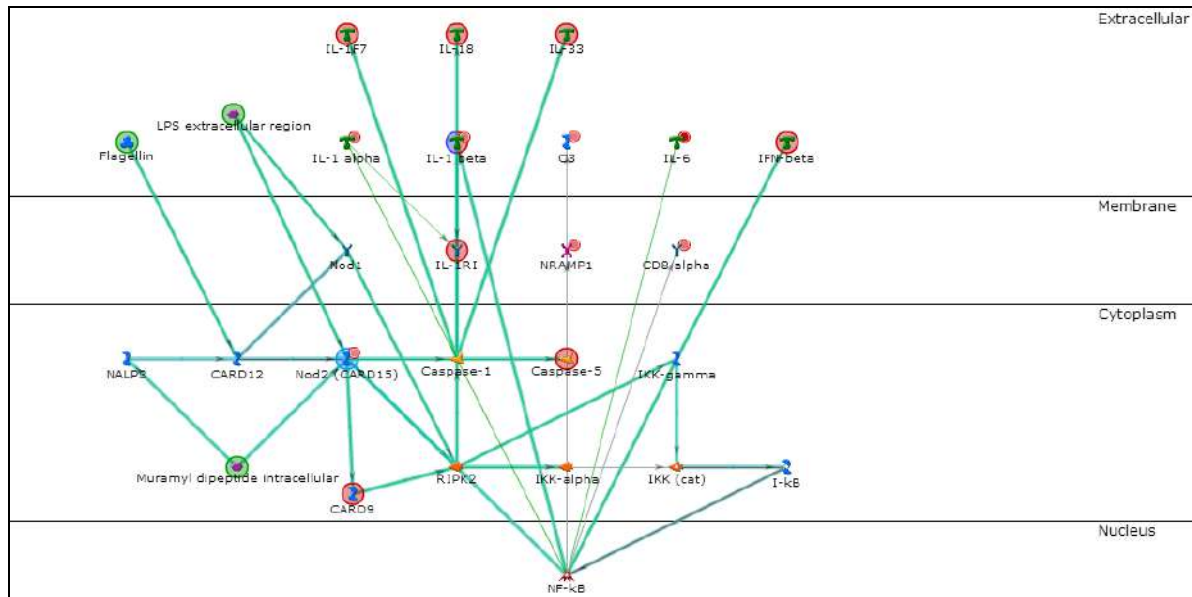
to molecule of bacterial origin (56.4%;  $1.769e-25$ ), immune system process (84.6%;  $9.941e-24$ ), response to cytokine (61.5%;  $2.451e-23$ ), regulation of immune system process (71.8%;  $6.873e-23$ ).



**Figura 12.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 02** (C3c, NF-kB, Adenosine A2a receptor, alpha-X/beta-2 integrin, CD21). Ontologias Gênicas relacionadas: *positive regulation of immune response* (88.2%;  $6.665e-40$ ), *immune effector process* (85.3%;  $1.222e-39$ ), *activation of immune response* (79.4%;  $1.181e-37$ ), *regulation of immune response* (91.2%;  $4.045e-37$ ), *positive regulation of immune system process* (91.2%;  $5.093e-37$ ).

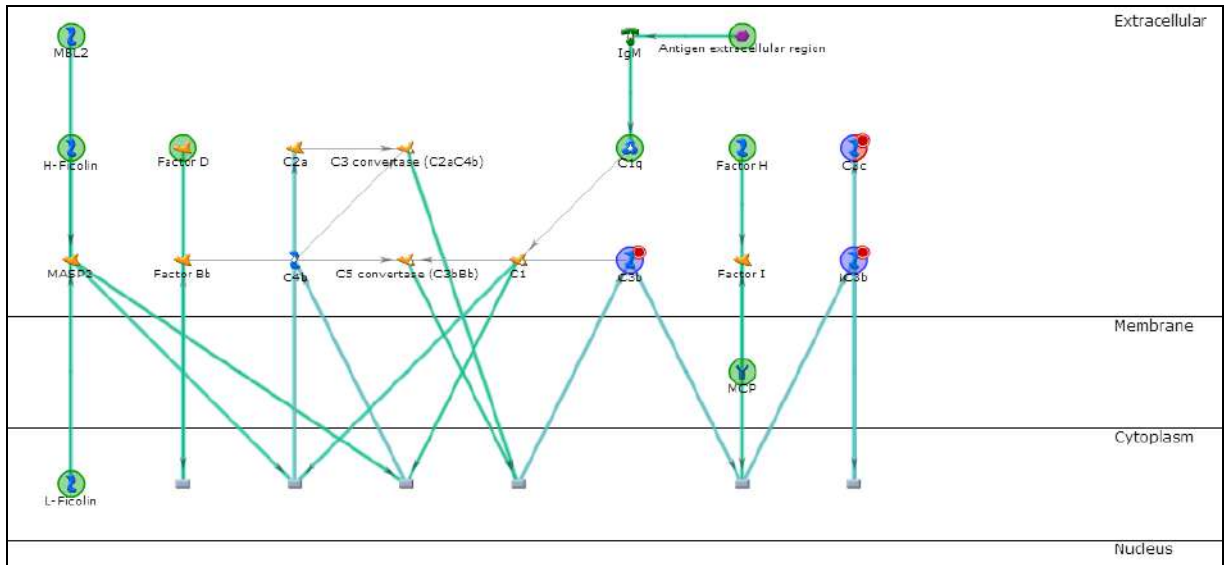


**Figura 13.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 03** (IL-1 beta, C3aR, PI3K cat class IB (p110-gamma), CCL5, IL-8). Ontologias Gênicas relacionadas: *immune response* (76.3%;  $3.396e-25$ ), *regulation of immune system process* (73.7%;  $2.095e-23$ ), *positive regulation of response to stimulus* (76.3%;  $1.597e-21$ ), *immune system process* (81.6%;  $1.990e-21$ ), *positive regulation of immune system process* (60.5%;  $1.654e-20$ ).



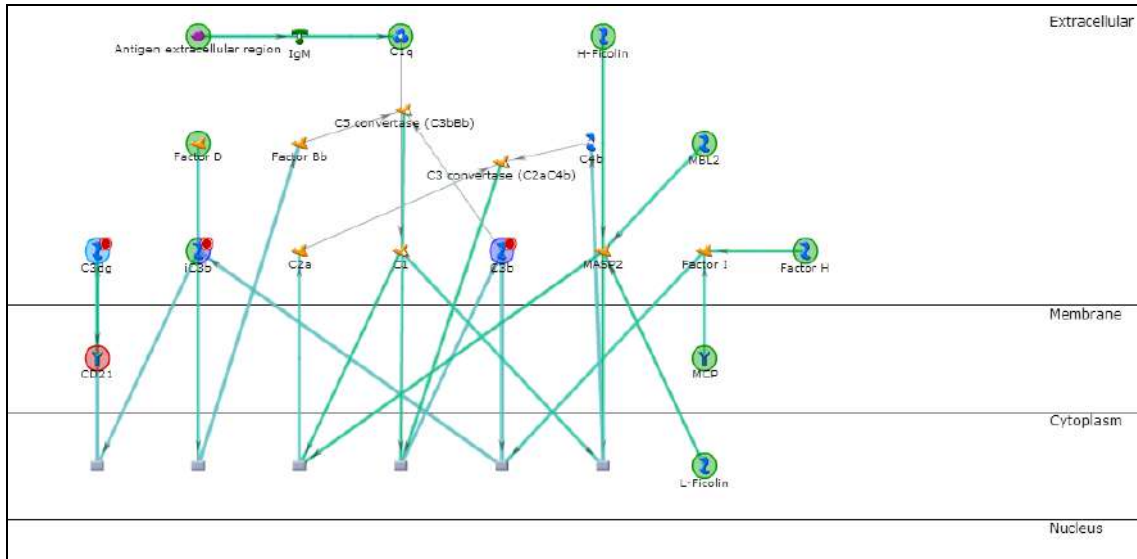
**Figura 14.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 04** (IL-1 beta, CARD9, IL-1RI, IL-1F7, IL-33). Ontologias Gênicas relacionadas: *regulation of defense response* (83.3%;  $1.444e-25$ ), *nucleotide-binding domain, leucine rich repeat containing receptor signaling pathway* (50.0%;  $1.539e-25$ ), *positive regulation of cytokine production* (75.0%;  $2.158e-25$ ), *regulation of cytokine production* (79.2%;  $2.752e-24$ ), *immune response* (91.7%;  $6.720e-23$ ).



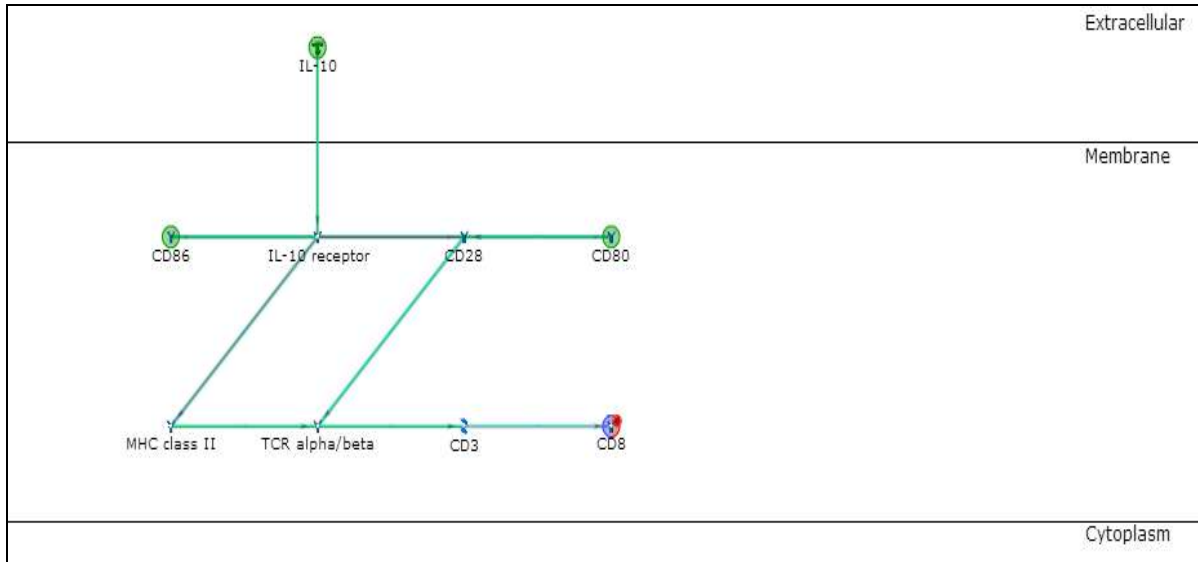


**Figura 15.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 05** (C3c, C3b, iC3b, C1q, MCP). Ontologias Gênicas relacionadas: *complement activation* (100.0%;  $3.544e-26$ ), *protein activation cascade* (100.0%;  $4.316e-25$ ), *humoral immune response* (100.0%;  $4.160e-22$ ), *activation of immune response* (100.0%;  $2.064e-18$ ), *immune effector process* (100.0%;  $1.841e-17$ ).

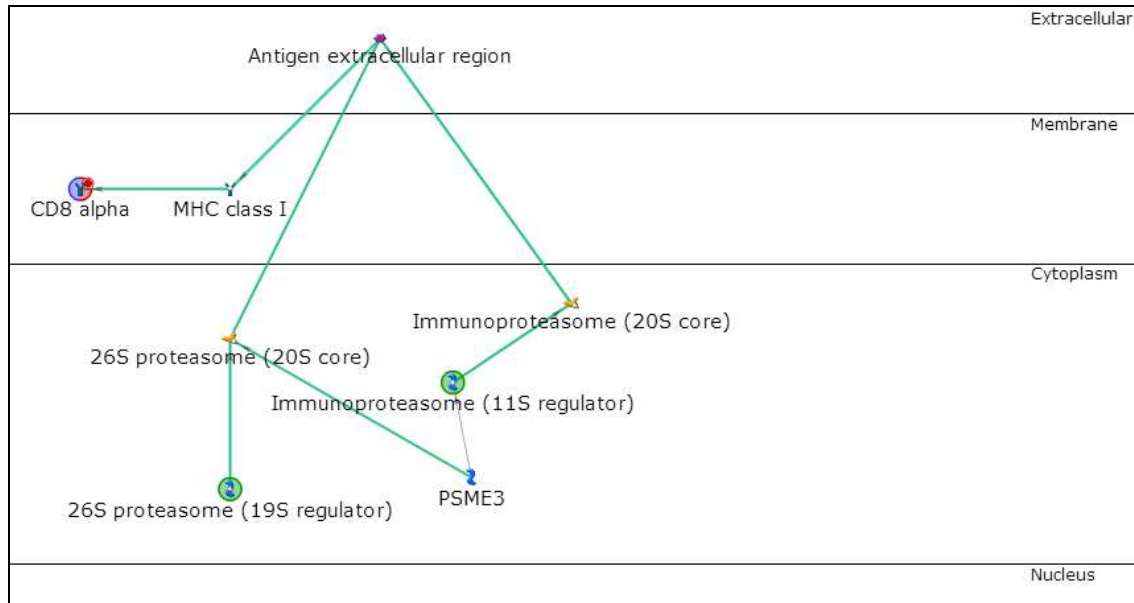




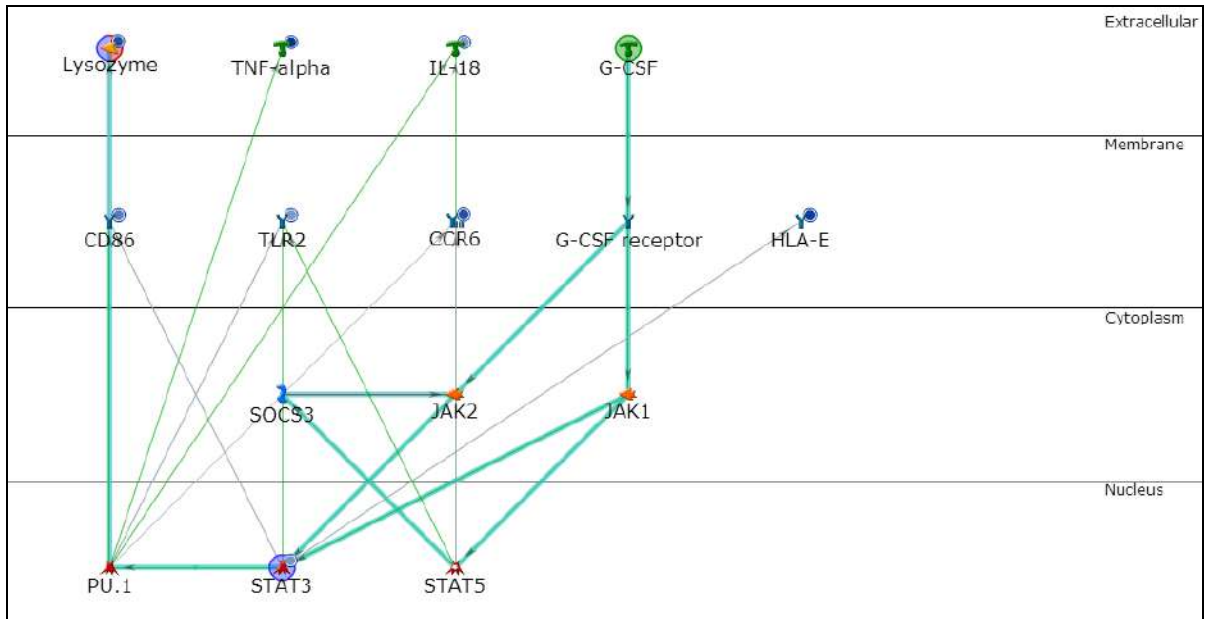
**Figura 16.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 06** (CD21, iC3b, C3b, MCP, H-Ficolin). Ontologias Gênicas relacionadas: *complement activation* (100.0%;  $1.621e-28$ ), *protein activation cascade* (100.0%;  $2.509e-27$ ), *humoral immune response* (100.0%;  $4.619e-24$ ), *activation of immune response* (100.0%;  $5.035e-20$ ), *immune effector process* (100.0%;  $5.491e-19$ ).



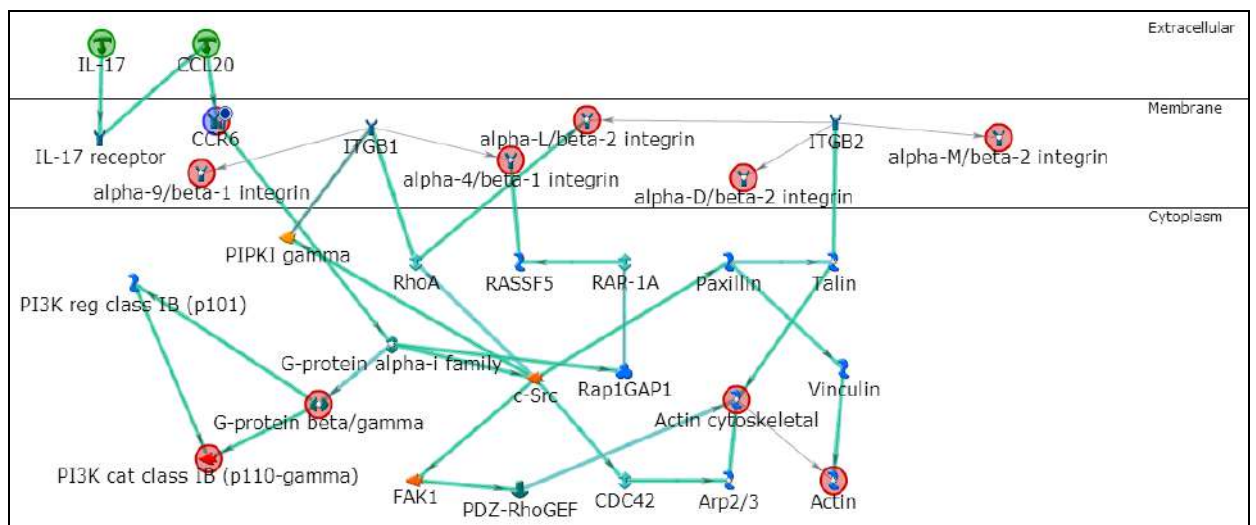
**Figura 17.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 07 (CD8, CD80, CD86, IL-10, IL-10 receptor)**. Ontologias Gênicas relacionadas: *T cell costimulation* (66.7%;  $6.474e-13$ ), *lymphocyte costimulation* (66.7%;  $6.900e-13$ ), *regulation of T cell activation* (77.8%;  $2.260e-11$ ), *regulation of immune effector process* (77.8%;  $5.690e-11$ ), *positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process* (44.4%;  $6.014e-11$ ).



**Figura 18.** Análise por *MetaCore*<sup>®</sup>: Queimados vs controles: **Imune-Genes mais hiper-regulados, Network 08** (CD8 alpha, 26S proteasome (19S regulator), Immunoproteasome (11S regulator), Antigen extracellular region, 26S proteasome (20S core)). Ontologias Gênicas relacionadas: *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent* (85.7%;  $1.562e-13$ ), *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $2.251e-13$ ), *antigen processing and presentation* (100.0%;  $2.921e-13$ ), *antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $1.550e-12$ ), *regulation of cellular amino acid metabolic process* (71.4%;  $7.999e-12$ ).



**Figura 19.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Sistema Imune-Genes mais hipo-regulados, Network 01** (Lysozyme, STAT3, G-CSF, PU.1, STAT5). Ontologias Gênicas relacionadas: *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I, TAP-dependent* (85.7%;  $1.562e-13$ ), *antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $2.251e-13$ ), *antigen processing and presentation* (100.0%;  $2.921e-13$ ), *antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I* (85.7%;  $1.550e-12$ ), *regulation of cellular amino acid metabolic process* (71.4%;  $7.999e-12$ ).



**Figura 20.** Análise por *MetaCore*®: Queimados vs controles: **Sistema Imune-Genes mais hiporegulados, Network 02** (CCR6, Actin cytoskeletal, G-protein beta/gamma, PI3K cat class IB (p110-gamma), alpha-4/beta-1 integrin). Ontologias Gênicas relacionadas: *blood coagulation* (70.0%;  $5.199e-25$ ), *coagulation* (70.0%;  $5.199e-25$ ), *hemostasis* (70.0%;  $6.433e-25$ ), *wound healing* (73.3%;  $2.074e-24$ ), *cell activation* (73.3%;  $7.197e-24$ ).

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

Na literatura não encontramos estudos que avaliassem a expressão de genes por meio de *PCR arrays* relacionados à imunidade inata e adaptativa na pele humana em queimadura grave, de modo que este trabalho é o primeiro a dar tal enfoque. Alguns artigos encontrados foram aqueles que estudaram separadamente genes envolvidos neste sistema, em modelos animais, e algumas vezes foram realizadas análises de proteína em vez do gene. Diferente do que está sendo aqui apresentado, vários genes relacionados a uma mesma via e na pele ao redor da área queimada, entendida como o local onde deve ser fundamental para a imunidade e cicatrização ou restauração da pele. Assim, em cultura de queratinócitos (n=20) observou-se que 8% dos genes estavam diferenciamamente expressos, sendo 100% hipo-regulados. E em fragmentos de pele (n=7), observou-se que 63% destes genes foram diferencialmente expressos sendo que dentre estes, 77% foram regulados negativamente na pele intacta (n=7) (CORREA-NORONHA *et al.*, 2014).

O complexo principal de histocompatibilidade, classe I, E (HLA-E) e A (HLA-A) pertence à classe I de HLA de cadeia pesada paralogues. Esta molécula de classe I é um heterodímero que consiste de uma cadeia pesada e uma cadeia leve (microglobulina beta-2). A cadeia pesada é ancorada na membrana. HLA-E é um tipo de MHC não clássica que atua como o ligante para o receptor inibitório NKG2A presente em células assassinas naturais (*natural killer cells*; NK) e células CD8+. O peptídeo de ligação e de estabilização de HLA-E é frequentemente analisado para sinalizar

infecções ou *stress* celular. Lesões crônicas não inflamatórias expressam significativamente menos proteína HLA-E, comparando aos níveis observados nos controles. Os níveis de proteína HLA-E aumentados foram associados com escores mais altos de inflamação (DURRENBERGER *et al.*, 2012). Pustulose generalizada aguda (PAG) é uma doença pós-estreptocócica rara da pele, e que tem sido relatado após a infecção estreptocócica da garganta. O paciente mostrou positividade para HLA (EREN *et al.*, 2008). Não há estudos que relatam a expressão deste gene em queimaduras na pele humana. No presente estudo, observou-se em cultura de queratinócitos, diminuição na expressão deste gene em 33 vezes. Também em fragmentos de pele, foi observado a diminuição da expressão de HLA-E em 86 vezes na lesão por queimadura da pele da mesma maneira como ocorre nas lesões não inflamatórias crônicas e em outras infecções.

O gene para a interleucina 1 tipo 1 (IL1R1) codifica um receptor de citocina que pertence à família de interleucina 1. A proteína codificada é um receptor para interleucina 1 alfa, beta e antagonista do receptor de interleucina 1. Ele é um importante mediador envolvido em muitas respostas inflamatórias e imune induzido por citocinas. Este gene foi identificado em injúria térmica porcina e é um possível alvo para tratamento clínico em fase I/II (ROGERS *et al.*, 2008). No presente estudo verificou-se uma diminuição de 23 vezes na expressão deste gene em cultura de queratinócito de pele humana, embora não tenha apresentado expressão diferencial em fragmento de pele. Sendo assim este gene pode também ser um possível alvo para desenvolvimento de novos marcadores terapêuticos.

Nos resultados do presente estudo, em fragmentos de pele, observou-se que os níveis de interleucinas 8 (IL8) e 6 (IL-6) aumentaram



significativamente em comparação com a dos controles na pele humana com queimadura, assim os resultados do presente estudo corroboraram com autores que observaram resultados semelhantes no plasma de ratos submetidos a queimaduras por fotodano causado pela exposição crônica de UV para o gene da IL-8 (ZENG *et al.*, 2013) e depois para o gene da IL-6 (MARTIN *et al.*, 2008). Em outro estudo (KRAFT *et al.*, 2015) os autores observaram que elevados níveis de IL-8 correlacionaram-se com o aumento de falência múltipla de órgãos, sepse e aumento da taxa de mortalidade. Estes dados sugerem que os níveis séricos de IL-8 podem ser um biomarcador válido para monitorar sepse, infecções e a mortalidade em pacientes com queimaduras.

Em estudos anteriores, verificou-se que tanto nos experimentos em que foi analisada a expressão gênica de IL8 e IL6 por meio de PCR quantitativo do gene individual (GRAGNANI *et al.*, 2014), quanto na avaliação da expressão proteica destes mesmos marcadores por meio de citometria de fluxo (NORONHA *et al.*, 2014), foi observado aumento na expressão de IL8 e IL6 na amostra de pacientes com grande queimadura em relação aos controles saudáveis. Porém, ao ser analisado na cultura primária de queratinócitos da pele, observou-se diminuição de 21 vezes na expressão diferencial destes genes. Ou seja, a pele intacta, apresenta um resultado maior em termos de expressão destes genes e proteínas por apresentar outros extratos celulares que possivelmente contribuem com o aumento ou diminuição, de determinados marcadores celulares. A expressão gênica dos marcadores da imunidade tem especificidade com o tipo celular estudado, numa população heterogênea como o fragmento de pele, onde o fragmento é digerido e daí extraído o RNA, tem uma expressão mais complexa e abrangente da expressão desses marcadores, enquanto numa população homogênea, como no cultivo de queratinócitos,

teremos por certo somente a expressão específica desse único tipo celular, e que pode ser diferente, menor e foram encontrados dois genes, HLA-E e IL-6, que foram hipo-expressos nos dois tipos de método.

O gene que codifica o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 e 6 (STAT3 e STAT6) são membros da família das proteínas STAT. Em resposta a citocinas e fatores de crescimento, os membros da família STAT são fosforiladas por cinases de receptores associados e, em seguida, formam homo- ou heterodímeros que translocam para o núcleo da célula, onde eles atuam como ativadores de transcrição. Esta proteína é ativada através de fosforilação em resposta a diversas citocinas e fatores de crescimento incluindo EGF, IFN, IL5, IL6, HGF, LIF e BMP2. As vias de sinalização STAT3 são facilitadas na cicatriz hipertrófica, que é uma condição da pele fibrótica grave e um grande problema clínico (SHI *et al.*, 2014), e uma condição que pode ocorrer na fase tardia do tratamento da queimadura. No presente estudo, em pele intacta e em cultura de queratinócitos, observou-se diminuição da expressão de STAT3 em 22 vezes para pele intacta e em torno de 15 vezes em cultura de queratinócitos. Assim, estas foram outras vias prejudicadas após o trauma pela queimadura.

O gene que codifica para o antígeno de linfócito 96 (LY96) é uma proteína associada com o receptor Toll Like 4. Na superfície celular e confere responsividade a lipopolissacarídeos (LPS) que providencia uma ligação entre o receptor e a ligação de LPS. Não observa-se na literatura, correlações deste gene a injúrias térmicas. Portanto, no presente estudo é o primeiro que apresenta esta associação da diminuição da expressão gênica de LY96 em cultura de queratinócitos de pacientes com queimadura extensa.

O gene que codifica o fator regulador do interferon 3 (IRF3) é um membro da família do fator de transcrição regulador do interferon (IRF). A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro que limita a propagação viral e desempenha um papel importante na ativação da resposta imunitária adaptativa. Os componentes virais são reconhecidos por receptores de reconhecimento de patógenos específicos gerando uma ativação de IRF3. E, este receptor, juntamente com NF- $\kappa$ B, é um regulador chave da expressão de IFN- $\beta$  (VANDEVENNE *et al.*, 2011). No presente estudo, em cultura de queratinócitos houve uma diminuição de expressão de 5 vezes e em fragmentos de pele observou-se diminuição da expressão deste gene em 25 vezes. Assim, esta é uma das vias que foi prejudicada após o trauma pela queimadura.

A proteína codificada pelo gene da interleucina 1 alfa (IL-1A) e interleucina-1 beta (IL-1B) são membros da família das citocinas interleucina-1. As citocinas são citocinas pleiotrópicas envolvidas em várias respostas imunitárias, processos inflamatórios e a hematopoiese. A citocina IL-1 $\alpha$  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. IL-1 $\beta$  é produzida por macrófagos ativadas como uma pró-proteína, que é proteoliticamente processada para a sua forma ativa por caspase 1 (CASP1/ICE). Esta citocina é um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose. Estes genes são normalmente alterados e induzidos por lesão em pele porcina por vapor de cloro. Assim, estes genes são importantes para a defesa contra infecções causadas por pele lesada como em pele com grave queimadura. E, também nos resultados do presente estudo, em pele intacta, observou-se, por meio de PCR Array,

aumento na expressão gênica de IL1A e IL1B cerca de sete vezes em relação aos pacientes sadios no estudo com amostras de fragmentos de pele.

O gene que codifica o carreador de soluto membro 11 da família 1 (SLC11A1) protege da lesão (WYLLIE *et al.*, 2008) e o antígeno CD8 é um agente importante na resposta imunitária e durante o curso de uma infecção microbiana. As células apresentadoras de antígenos (APCs) diferentes estão expostas e contribuem para a resposta imunitária resultante. As células dendríticas (DCs) CD8a (+) são coordenadores importantes de respostas imunes iniciais para as bactérias intracelulares *Listeria monocytogenes* (LM) e são cruciais para a imunidade de células CD8 (+) (KAPADIA *et al.*, 2011). A expressão deste gene, em pele intacta, apresentou-se aumentado em cerca de sete vezes. Entretanto em cultura de queratinócito não foi observada expressão diferencial.

O gene que codifica o componente do complemento 3 (C3) desempenha um papel central na ativação do sistema do complemento. Sua ativação é necessário para ambas as vias de ativação do complemento, clássica e alternativa. As pessoas com deficiência de C3 são susceptíveis a infecção bacteriana. A ativação do complemento é conhecido por acompanhar o ferimento de queimadura. O fragmentos C3 é reconhecido como moléculas de adesão pelos receptores de granulócitos, estas proteínas depositadas podem promover a acumulação de leucócitos, contribuindo assim para uma iniciação de uma cascata inflamatória no local de uma lesão por queimadura (SRIRAMARAO & DISCIPIO, 1999). A expressão deste gene, em pele intacta, apresentou-se aumentado em cerca de cinco vezes. Entretanto em cultura de queratinócito também não foi observada expressão diferencial.

O gene que contém um domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo 2 é um membro da família Nod1/Apaf-1 que codifica uma proteína com dois domínios de recrutamento de caspase (CARD) e seis repetições ricas em leucina (LPS). A proteína é expressa principalmente nos leucócitos do sangue periférico. Ela desempenha um papel na resposta imunitária a lipopolissacarídeos bacterianos intracelulares (LPS), reconhecendo o dipeptídeo de muramil (MDP) derivada a partir deles e a proteína de ativação do NFκB. Nod2 tem um papel importante na cicatrização de feridas da pele de murino. Cutânea Nod2 é induzida em tipos de células principais ferida em resposta à lesão. Na ausência de Nod2, os ratinhos exibem um atraso substancial na reparação de feridas agudas associadas a alterações epiteliais e inflamatórias. Em descobertas recentes foi revelado um papel intrínseco para Nod2 no reparo de feridas cutâneas, além de seu papel no reconhecimento a invasão por patógenos (CAMPBELL *et al.*, 2013). No presente estudo foi observado que este gene foi hiper regulado em pele de queimados graves, de modo que possui importância em debelar a infecção.

O gene da quimioquina (motivo C-C) do receptor 4 (CCR4) pertence à família de receptores acoplados a proteína-G. É um receptor de quimiocina CC - MIP-1, RANTES, TARC e MCP-1. As quimioquinas constituem um grupo de pequenos polipéptido e são moléculas estruturalmente relacionadas que regulam a sinalização celular de vários tipos de leucócitos. As quimiocinas, também desempenham papéis fundamentais no desenvolvimento, homeostase, e a função do sistema imunitário. A perda de uma única quimiocina perturba a rede de quimiocinas não só na configuração de inflamação aguda, mas mesmo numa célula inflamatória isolada, o macrófago (FERREIRA *et al.*, 2005).

A integrina alfa H gene (ITGAM) codifica a cadeia de integrina alfa M. As integrinas são proteínas integrais heterodiméricas de membrana, compostas por uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Este domínio I contendo alfa de integrina combina com a cadeia beta 2 (ITGB2) para formar uma integrina específica por leucócitos referidos como receptor de macrófago 1 ('Mac-1'), ou inativado por C3b receptor (iC3b) 3 (CR3'). Recentemente, usando um modelo de rato com lesão térmica que foi estudada por peptídeos antimicrobianos, verificou-se que estas proteínas não são expressas nos tecidos queimados e que este defeito contribui para o aumento da susceptibilidade à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em ferida de queimado. Os resultados indicam que a sepse resultante de infecção por *P. aeruginosa* é acelerada por células que expressam ITGAM que tem capacidade para suprimir a produção de peptídeo antimicrobiano por queratinócitos (KOBAYASHI *et al.*, 2008) epidérmicos induzida por queimadura. Então, o importante aumento da regulação que foi observado para este gene nos resultados em pele intacta podem ser importantes para combater a infecção no local da pele queimadura grave.

A expressão de NOD2, CCR4 e ITGAM, em fragmento de pele, apresentou-se aumentada em cerca de quatro vezes. Sendo então importantes para o reparo de feridas e controle da infecção local. Entretanto em cultura de queratinócitos não foi observada expressão diferencial de nenhum destes marcadores.

O fator de necrose tumoral (TNF) é um gene que pertence à superfamília que codifica uma citocina pró-inflamatória multifuncional. Esta citocina é secretada principalmente por macrófagos. E, após ligar-se, realiza diversas funções através dos seus receptores TNFRSF1A/TNFR1 e TNFRSF1B/TNFR2. Esta citocina é envolvida na regulação de uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico e a coagulação. Em um estudo recente, foi avaliada a expressão gênica do TNF em cultura de fibroblastos da pele e cultura de queratinócitos de pacientes queimados, onde não foi expresso (GRAGNANI *et al.*, 2013). Este resultado obtido pela análise da expressão gênica individual está em desacordo com os dados apresentados no presente estudo, já que foi observada uma importante hiporegulação, com diminuição da expressão gênica de TNF em mais de 90 vezes no estudo com amostras de fragmentos de pele.

O gene que codifica lisozima (Lyz) humana, cujo substrato natural é o peptidoglicano da parede celular bacteriana, produz a enzima que realiza a clivagem das ligações glicosídicas beta [1-4] entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina. A lisozima é um dos agentes antimicrobianos peptídeos encontrados no leite humano, e está também presente no baço, pulmão, rim, nas células brancas do sangue, plasma, saliva, pele, e lágrimas. Da mesma forma que a HLA-E, não há estudos que relatam a expressão do gene Lyz em queimaduras na pele humana. Lyz é um tipo de liberação do mediador de ferida em pele humana que atua como um importante mecanismo de defesa de primeira linha em lesão cutânea (WINGENS *et al.*, 1998). Nos resultados do presente estudo este gene é hiporexpresso em fragmento de pele com queimadura grave (74 vezes) e, isso pode colaborar para o fato clínico de que o paciente queimado é mais vulnerável às infecções.

O gene da Quimioquina (*motif C-C*) do receptor 6 (CCR6) codifica um membro da família de receptores de quimiocina beta, que é uma proteína de sete hélices transmembranar semelhante aos receptores acoplados à proteína G. O gene é preferencialmente expresso por células dendríticas imaturas e células T de memória. Estes resultados indicam que o gene tem um aspecto importante da resposta de cura à abrasão epitelial da córnea que inclui influxo de CCR6 que contribui para a resposta inflamatória e promove a cicatrização epitelial (LI *et al.*, 2011). No presente estudo o gene CCR6 foi reprimido mais de 70 vezes em fragmento de pele de queimadura grave, provavelmente pode estar envolvido na alteração da cicatrização da epiderme destes pacientes grande queimados.

A elevada expressão do antígeno CD86 tem consequências funcionais para a magnitude de respostas de células T CD4+ *in vitro* e *in vivo*. Estes dados identificam a regulação positiva de CD86 como um mecanismo adicional pelo qual a IL-21 pode induzir efeitos imunomodulatórios (ATTRIDGE *et al.*, 2014). A exposição à radiação UV conduz a um aumento dependente da concentração na formação de células na queimadura solar e diminuição do número de células CD86-positivas na epiderme (HOFMANN-WELLENHOF *et al.*, 2004). Essa expressão diminuída também ocorreu no presente estudo (-46 vezes) quando analisado o fragmento de pele, sugerindo alteração na regulação imunomodulatória na defesa do paciente com grande queimadura. O gene que codifica o receptor do tipo *Toll 2* (*Toll-like receptor 2*; TLR2) é um membro da família de receptores de tipo Toll (TLR), que desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata. Em locais de inflamação ou lesão do tecido, o ácido hialurônico (HA), ubíquo na matriz extracelular, é dividido em fragmentos de baixo peso molecular HA (LMW-HA) que parece ativar as células



imunocompetentes. Descobrimos que LMW-HA induz a ativação de queratinócitos, que respondem por produtores de beta-defensina 2. Esta produção é mediada pela ativação de TLR2 e TLR4 e, envolve uma via de sinalização de c-fos mediada por proteína-quinase C- dependente. Após a lesão, a liberação de beta-defensina 2 por queratinócitos, pode proteger o tecido cutâneo num momento em que é particularmente vulnerável à infecção (GARIBOLDI *et al.*, 2008). Como no presente estudo a expressão gênica de TLR2 diminuiu cerca de 20 vezes em relação ao controle, esta hiporegulação pode estar relacionada à menor defesa local por menor liberação de beta-defensina 2 pelos queratinócitos, mantendo o paciente muito susceptível à infecção no local da queimadura e sua vizinhança.

O gene que codifica a Interleucina 18 (IL18) é uma citocina pró-inflamatória que aumenta a atividade das células natural killer em células do baço, e estimula a produção de interferon gama em células I tipo T-helper. IL-18 marcadamente ativa funções dos neutrófilos, aumentando assim a sobrevivência da infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina pós queimadura (KINOSHITA *et al.*, 2011). Este gene apresentou-se com expressão gênica diminuída em cerca de 18 vezes em pele intacta. Assim, seria um importante marcador que, sendo repostado no local da infecção, poderia auxiliar a cura da infecção.

Em relação às análises por Metacore, na literatura não foram encontrados dados para realizarmos a comparação, sendo este o primeiro estudo de vias e antologias gênicas para este tipo de experimento. Assim, os caminhos gênicos e as respectivas antologias gênicas obtidas por meio da análise do Metacore mostram que se relacionam em todo ou em parte à imunidade, como por exemplo, Resposta à Lipossacarídeo, Resposta à Moléculas originadas de bactérias, Processos de Regulação (positiva ou negativa) do Sistema Imune, Resposta à Citocinas, Regulação de Resposta

à Defesa, Regulação de Produção de Citocinas, Ativação do Complemento, Regulação por Interleucinas, Processos de Antígenos de MHC Classe I e Cicatrização. Assim, os genes diferencialmente expressos no presente estudo ativam estes caminhos gênicos específicos na imunidade inata e adquirida e realizam ações de inibição ou mesmo de ativação destas.

Como perspectivas são necessários novos experimentos de PCR *array* para imunidade inata e adquirida analisando sangue periférico de pacientes com grande queimadura e comparar com controles sadios e com os resultados obtidos no presente estudo que é considerado um perfil inicial da expressão gênica da imunidade em paciente com grande queimadura.

Portanto, este estudo contribuiu para mostrar um painel de genes alterados perante a grande queimadura, com resultados originais para a compreensão posterior dos mecanismos moleculares subjacentes à infecção da ferida e no futuro poder fornecer novas estratégias, por estímulo ou inibição de certos genes marcadores da grande queimadura, que poderá restaurar a expressão normal destes genes para melhorar o processo de imunidade, resistência à infecção, melhor evolução clínica, cicatrização, qualidade de vida e conduzir estes pacientes para um retorno mais próximo das condições anteriores à queimadura.

## **7 CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

Na fase aguda da grande queimadura foram observados HLA-E, IL1R1 e IL-6 como genes prioritários na cultura de queratinócitos; e no fragmento da pele os genes prioritários foram IL-8, IL-6, TNF-alfa, HLA-E, LYZ, CCR6.

## **8 REFERÊNCIAS**

**8 REFERÊNCIAS**

Attridge K, Kenefeck R, Wardzinski L, Qureshi OS, Wang CJ, Manzotti C, Okkenhaug K, Walker LS. IL-21 promotes CD4 T cell responses by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of CD86 on B cells. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2195-201.

Cairns B, Maile R, Barnes CM, Frelinger JA, Meyer AA. Increased Toll-like receptor 4 expression on T cells may be a mechanism for enhanced T cell response late after burn injury. *J Trauma.* 2006 Aug;61(2):293-8; discussion 298-9.

Campbell L, Williams H, Crompton RA, Cruickshank SM, Hardman MJ. Nod2 deficiency impairs inflammatory and epithelial aspects of the cutaneous wound-healing response. *J Pathol.* 2013 Jan; 229(1):121-31.

Choileain N, MacConmara M, Zang Y, Murphy TJ, Mannick JA, Lederer JA. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):225-36.

Correa-Noronha SAA, Noronha SMR, Lanziani LE, Ferreira LM, Gragnani A. Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir. Bras.* 2014. 29( 3):60-67.

Durrenberger PF, Webb LV, Sim MJ, Nicholas RS, Altmann DM, Boyton RJ. Increased HLA-E expression in white matter lesions in multiple sclerosis. *Immunology.* 2012 Dec;137(4):317-25.

- Eren M, Fabri M, Krieg T, Eming SA. Pustulosis acuta generalisata with joint involvement in an HLA-A2- and HLA-B35-positive patient. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Jun;58(6):1056-8.
- Ferreira AM, Rollins BJ, Faunce DE, Burns AL, Zhu X, Dipietro LA. The effect of MCP-1 depletion on chemokine and chemokine-related gene expression: evidence for a complex network in acute inflammation. *Cytokine*. 2005 Apr 21;30(2):64-71.
- Fujimi S, Lapchak PH, Zang Y, MacConmara MP, Maung AA, Delisle AJ, Mannick JA, Lederer JAMurine dendritic cell antigen-presenting cell function is not altered by burn injury. *J Leukoc Biol*. 2009 May;85(5):862-70.
- Gariboldi S, Palazzo M, Zanobbio L, Selleri S, Sommariva M, Sfondrini L, Cavicchini S, Balsari A, Rumio C. Low molecular weight hyaluronic acid increases the self-defense of skin epithelium by induction of beta-defensin 2 via TLR2 and TLR4. *J Immunol*. 2008 Aug 1;181(3):2103-10.
- Gauglitz GG, Zedler S, von Spiegel F, Fuhr J, von Donnersmarck GH, Faist E. Functional characterization of cultured keratinocytes after acute cutaneous burn injury. *PLoS One*. 2012;7(2):e29942.
- Gibran NS, Ferguson M, Heimbach DM, Isik FF. Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J Surg Res*. 1997 Jun;70(1):1-6.

Gragnani A, Morgan R, Ferreira LM. Differentiation and barrier formation of a cultured composite skin graft. *J Burn Care Rehabil.* 2002 Mar-Apr;23(2):126-31.

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

Gragnani A, Cezillo MV, da Silva ID, de Noronha SM, Correa-Noronha SA, Ferreira LM. Gene expression profile of cytokines and receptors of inflammation from cultured keratinocytes of burned patients. *Burns.* 2014 Aug;40(5):947-56.

Green H, Kehinde THE, Thomas J. Growth of cultivated human epidermal cells into multiple epithelia suitable goes grafting. *Proc Natl Acad Sci USES.* 1979;76:5665-9.

Hofmann-Wellenhof R, Smolle J, Roschger A, Strunk D, Hubmer M, Hoffmann C, Quehenberger F, Horn M, Kerl H, Wolf P. Sunburn cell formation, dendritic cell migration, and immunomodulatory factor production after solar-simulated irradiation of sunscreen-treated human skin explants in vitro. *J Invest Dermatol.* 2004 Oct;123(4):781-7.

Kapadia D, Sadikovic A, Vanloubbeeck Y, Brockstedt D, Fong L. Interplay between CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells and monocytes in response to *Listeria monocytogenes* infection attenuates T cell responses. *PLoS One.* 2011 Apr 29;6(4):e19376.



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. *Ann Surgery*. 1997 Apr;121(4):440-8.

Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Inatsu A, Nakashima H, Tsujimoto H, Shinomiya N, Saitoh D, Seki S. Enhancement of neutrophil function by interleukin-18 therapy protects burn-injured mice from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 2011 Jul;79(7):2670-80.

Kobayashi M, Yoshida T, Takeuchi D, Jones VC, Shigematsu K, Herndon DN, Suzuki F. Gr-1(+)CD11b(+) cells as an accelerator of sepsis stemming from *Pseudomonas aeruginosa* wound infection in thermally injured mice. *J Leukoc Biol*. 2008 Jun;83(6):1354-62.

Kraft R, Herndon DN, Finnerty CC, Cox RA, Song J, Jeschke MG. Predictive Value of IL-8 for Sepsis and Severe Infections After Burn Injury: A Clinical Study. *Shock*. 2015 Mar;43(3):222-7.

Li Z, Burns AR, Miller SB, Smith CW. CCL20,  $\gamma\delta$  T cells, and IL-22 in corneal epithelial healing. *FASEB J*. 2011 Aug;25(8):2659-68.

Luan YY, Yao YM, Zhang L, Dong N, Zhang QH, Yu Y, Sheng ZY. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  induced protein 8 like-2 contributes to the immunosuppressive property of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in mice. *Mol Immunol*. 2011 Oct;49(1-2):219-26.

- Luster AD, Alon R, von Adrian UH. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*. 2005(6):1182-90.
- MacConmara MP, Tajima G, O'Leary F, Delisle AJ, McKenna AM, Stallwood CG, Mannick JA, Lederer JA. Regulatory T cells suppress antigen-driven CD4 T cell reactivity following injury. *J Leukoc Biol*. 2011 January; 89(1): 137–47.
- Martin R, Pierrard C, Lejeune F, Hilaire P, Breton L, Bernerd F. Photoprotective effect of a water-soluble extract of *Rosmarinus officinalis* L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin. *Eur J Dermatol*. 2008 Mar-Apr;18(2):128-35.
- Noronha SM, Noronha SA, Klepp AG, Ipolito MZ, Ferreira LM, Gragnani A. Keratinocyte growth factor, interleukins (1 beta, 6, 8, 10, 12), and tumor necrosis factor alpha in culture medium of dermal fibroblast of burned patients. *Acta Cir Bras*. 2014;29 Suppl 1:62-8.
- Price JA, Rogers JV, Plahovinsak JL, Wendling MQ, Perry MR, Reid FM, Graham JS. Toxicogenomic analysis of chlorine vapor-induced porcine skin injury. *Cutan Ocul Toxicol*. 2012 Dec;31(4):323-31.
- Rogers JV, McDougal JN, Price JA, Reid FM, Graham JS. Transcriptional responses associated with sulfur mustard and thermal burns in porcine skin. *Cutan Ocul Toxicol*. 2008; 27(3): 135-60.

- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Sasaki JR, Zhang Q, Schwacha MG. Burn Induces a Th-17 Inflammatory Response at the Injury Site. *Burns*. 2011 June; 37(4): 646–51.
- Shi J, Li J, Guan H, Cai W, Bai X, Fang X, Hu X, Wang Y, Wang H, Zheng Z, Su L, Hu D, Zhu X. Anti-fibrotic actions of interleukin-10 against hypertrophic scarring by activation of PI3K/ AKT and STAT3 signaling pathways in scar-forming fibroblasts. *PLoS One*. 2014 May 30;9(5):e98228.
- Sobral CS, Gragnani A, Morgan J, Ferreira LM. Inhibition of proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* by KGF in an experimental burn model using human cultured keratinocytes. *Burns*. 2007;33(5):613-620.
- Sriramarao P, Discipio RG. Deposition of complement C3 and factor H in tissue traumatized by burn injury. *Immunopharmacology*. 1999 May;42(1-3):195-202.
- Tredget EE, Yang L, Delehanty M, Shankowsky H, Scott PG. Polarized Th2 cytokine production in patients with hypertrophic scar following thermal injury. *J Interferon Cytokine Res*. 2006 Mar;26(3):179-89.
- Vandevenne P, Lebrun M, El Mjiyad N, Ote I, Di Valentin E, Habraken Y, Dortu E, Piette J, Sadzot-Delvaux C. The Varicella- Zoster Virus ORF47 Kinase Interferes with Host Innate Immune Response by Inhibiting the Activation of IRF3. *PLoS One*. 2011; 6(2): e16870.

Wingens M, van Bergen BH, Hiemstra PS, Meis JF, van Vlijmen- Willems IM, Zeeuwen PL, Mulder J, Kramps HA, van Ruissen F, Schalkwijk J. Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1998 Dec;111(6):996-1002.

Wyllie S, Seu P, Gao FQ, Gros P, Goss JA. Disruption of the Nramp1 (also known as Slc11a1) gene in Kupffer cells attenuates early-phase, warm ischemia-reperfusion injury in the mouse liver. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):885-97.

Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, Cuschieri J, Cuenca AG, Gao H *et al.* A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 2011 Dec 19;208(13):2581-90.

Zedler S, Faist E, Ostermeier B, von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells. *J Trauma.* 1997 May;42(5):872-80; discussion 880-1.

Zeng J, Lin X, Fan H, Li C. Hydrogen sulfide attenuates the inflammatory response in a mouse burn injury model. *Mol Med Rep.* 2013 Oct;8(4):1204-8.

Zhu X, Li Y, Dong M. [The expression of ICAM-1 on the keratinocytes in second degree human burn skin]. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 1999 Jan;15(1):53-5.

## **NORMAS ADOTADAS**

## **NORMAS ADOTADAS**

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication [Internet]. Philadelphia (PA): ICMJE Secretariat office, American College of Physicians; [updated 2008 Oct; cited 2010 May 23]. Available from: URL: <http://www.icmje.org>.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. Ferreira LM, coordenadora; Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, organizadores. São Paulo: Livraria Médica Editora; 2008.

**ABSTRACT**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Burns affect about one percent of the world population. More than one million burns occur in the United States each year and about 5,000 are fatal, causing the burn is the fourth leading cause of death from unintentional injuries in this country. Victims of burns have high susceptibility to infections, being directly related to morbidity and mortality rates. **PURPOSE:** To evaluate genic expression of immunity markers in cultivated keratinocytes of patients with large burn. **METHODS:** After obtaining viable fragments of skin with and without burning, culture of keratinocytes was initiated by the enzymatic method using Dispase. These cells were treated with Trizol® for extraction of total RNA. This was quantified and analyzed for purity for obtaining cDNA for the analysis of gene expression using PCR Arrays plates for immunity. **RESULTS:** After the analysis of gene expression we found, in keratinocytes culture, seven (07) differentially expressed genes (8%) that presented 100% hipo-expressed. And, in skin fragments, 63% genes were differentially expressed, of which 77% were repressed and 23% were hyper-regulated. **CONCLUSION:** In the acute phase in large burn were observed HLA-E, IL1R1, and IL-6 been priority genes in the keratinocyte culture; and in the skin fragments the priority genes were IL-8, IL-6, TNF-alfa, HLA-E, LYZ, and CCR6.



**ANEXOS**

## ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** EXPRESSÃO GÊNICA DA IMUNIDADE INATA DA PELE EM FIBROBLASTOS DÈRMICOS E QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS CULTIVADOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA.

**Pesquisador:** ALFREDO GRAGNANI FILHO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 06867512.0.0000.5506

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

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 146.468

**Data da Relatoria:** 09/11/2012

**Apresentação do Projeto:**

A alta susceptibilidade de pacientes queimados a infecções é uma preocupação no que concerne a evolução e sucesso do tratamento clínico, estando diretamente relacionada às taxas de morbidade e mortalidade do grupo. Para evitar a entrada e proliferação de patógenos o organismo conta com dois tipos de resposta imune: a imunidade inata, ou natural, e a imunidade adquirida, ou específica. A primeira é responsável pelas

reações iniciais a qualquer infecção e desencadeia a resposta dos linfócitos e seus produtos humorais, sendo estes componentes da imunidade adquirida, constituindo uma resposta tardia específica e duradoura. Estudos realizados com modelos murinos de queimadura fornecem importantes informações a respeito da sucessão de eventos e relações entre as células efetivadoras da imunidade adquirida, citocinas e proteínas produzidas

durante a resposta inflamatória. Modelos murinos, os quais normalmente demonstrariam supressão na imunidade adaptativa relacionada aos linfócitos Th1 após a queimadura, mostraram respostas normais quando foram deletadas suas células T CD4+CD25+. Sendo assim, a queimadura amplifica a função dos linfócitos TCD4+CD25+ reguladores, os quais contribuem para a imunossupressão após a injúria (CHOILEAIN et al., 2006). Em outro experimento, a expressão de toll-like receptor 4 (TLR4), uma proteína importante para o reconhecimento antigênico e ativação da resposta imune inata, encontra-se significativamente aumentada nos linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+, associada a um aumento no número das populações de linfócitos de memória T

**Endereço:** Rua Botucatu, 573 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP

**Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)5538-7162

**Fax:** (11)5571-1062

**E-mail:** cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



CD44 CD4+ e T CD44 CD8+. Sabendo que as referidas mudanças no padrão de resposta imunológica do paciente queimado estão diretamente relacionados à sua imunodeficiência, o que aumenta sua susceptibilidade à infecção e sepse, procuramos no presente estudo identificar um perfil de expressão de genes da resposta local à queimadura através do método PCR array, relacionando-a à extensão do ferimento. Visamos então possibilitar a evolução das intervenções clínicas aplicadas a tais casos, diminuindo as taxas de morbimortalidade do grupo. O delineamento do presente estudo é de pesquisa experimental, *in vitro*, de células de doadores vítimas de queimadura, sendo observacional, analítico, controlado, realizado em centro único. Serão incluídos dez pacientes, cinco no grupo experimento e cinco no grupo

controle, internados na Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo que fica no Hospital Universitário e Hospital São Paulo (HU-HSP). Para cada paciente, 84 genes serão analisados para genes humanos relevantes envolvidos na via de citocinas e receptores inflamatórios (PAHS-011). A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas serão realizadas em um ABI Prism

7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) utilizando a metodologia Taqman fluorescente (TaqMan One Step RT-PCR Master Mix Reagentes, Biosystems Aplicada).

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a expressão de 84 genes mediadores da resposta imune através de PCR Array em cultura de fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos primários de pacientes com queimadura.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Sem riscos, coleta de amostras teciduais durante procedimento cirúrgico

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O delineamento do presente estudo é de pesquisa experimental, *in vitro*, de células de doadores vítimas de queimadura, sendo observacional e genético

Os autores esperam que exista alteração da expressão gênica de IL-1 beta em fibroblastos dérmicos e em queratinócitos primários dos pacientes queimados, bem como alteração da expressão gênica de KGF e TNF-alfa em queratinócitos primários. Possivelmente, a expressão de IL-1 beta pelos queratinócitos possa estar aumentada (MAAS-SZABOWSKI et al., 2000) nessa análise, que ainda não foi realizada em monocultura (fibroblastos e

queratinócitos separados) proveniente de pacientes queimados. Como visto em resultados ainda não publicados, a expressão gênica de KGF está aumentada em fibroblastos dérmicos de pacientes queimados. A liberação de mediadores inflamatórios está associada com perda de proteínas e disfunção de órgãos, que contribui para o aumento da incidência de infecção e sepse, fatores que

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)5530-7182

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO PAULO - UNIFESP/  
HOSPITAL SÃO PAULO



aumentam o risco de falência de múltiplos órgãos e morte no paciente com queimadura de grande extensão (JESCHKE et al., 2007). Alterações nos níveis de citocinas após a queimadura ocorre antes que anormalidades metabólicas ocorram. Assim, pode ser possível desenvolver intervenções terapêuticas que possam atenuar a resposta inflamatória aguda por diminuição da expressão dessas citocinas

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

Documentos apresentados (foiha de rosto e TCLE)

**Recomendações:**

ndn

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

Sem Inadequações

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado acatou o parecer do relator - projeto aprovado

SAO PAULO, 14 de Novembro de 2012

---

Assinador por:  
José Osmar Medina Pastana  
(Coordenador)

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

## ANEXO 2

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

**1 – Título do projeto: “EXPRESSÃO GÊNICA DA IMUNIDADE INATA DA PELE EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS E QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS CULTIVADOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA”.**

2 – Desenho do estudo e objetivo(s): “Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o que acontece após o acidente da queimadura, pesquisando a imunidade inata, ou seja, proteínas produzidas pelas células na área ao redor da queimadura que estão ligadas à defesa do organismo frente um trauma grave como é a queimadura. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele normal, sem queimadura, que fica ao redor da lesão da queimadura e que durante o procedimento operatório de limpeza do tecido morto (necrosado) da queimadura sai junto da mesma, e que será enviada ao laboratório para cultivo.

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: durante o procedimento operatório a que o paciente vítima de queimadura é normalmente submetido quando apresenta lesão de II grau profundo ou de III grau, para a retirada do tecido morto (necrosado), que acontece normalmente ao redor do terceiro ou quarto dia após a queimadura, e a pele normal ao redor da área da retirada do tecido morto será coletada para o envio ao laboratório para o isolamento das células e a avaliação. Não será realizada nenhuma conduta diferente da que é feita na cirurgia dos pacientes que não estão no estudo, pois a pele normal ao redor da área necrosada é retirada pelo fato da área queimada não ser regular e o procedimento ser realizado com a faca de Blair, instrumento desenvolvido para a retirada desse tecido morto, mas que tem uma dimensão que sempre retira pele normal ao redor da necrose, portanto, o paciente não será submetido a nenhuma mudança na rotina do protocolo da Unidade de Tratamento de Queimaduras.

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados: amostras de pele normal ao redor da área necrosada retirada serão coletadas e enviadas ao laboratório de cultura de células.

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do estudo: nenhum desconforto fora do habitual aos pacientes que são submetidos à cirurgia na unidade será acrescentado ao paciente; a cirurgia sempre é realizada sob anestesia geral e com analgesia rotineira com opióide forte (morfina, fentanil) após a cirurgia.

6 – Benefícios para o participante: Não há benefício direto ao paciente no presente estudo. Porém, a queimadura é um trauma complexo de difícil tratamento com grande número de infecções e alta taxa de óbito. Assim, com a obtenção de novos conhecimentos sobre mediadores inflamatórios que estão envolvidos na evolução da queimadura, o estudo estará colaborando com todos os pacientes queimados no futuro com as possíveis mudanças em protocolos se os dados mostrarem essa necessidade.

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: não existem, pois os procedimentos relacionados no estudo são realizados de rotina, sem nenhuma mudança, somente que, a pele normal que sai junto do tecido necrótico ou morto seria desprezada, e no estudo será coletada e enviada ao laboratório.

8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Alfredo Gragnani Filho, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Telefone(s): 5576.4118. E-mail: [alfredogf@ig.com.br](mailto:alfredogf@ig.com.br) Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: [cepunifesp@unifesp.br](mailto:cepunifesp@unifesp.br)

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“EXPRESSÃO GÊNICA DA IMUNIDADE INATA DA PELE EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS E QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS CULTIVADOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA”**.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

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

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

Prof. Alfredo Gragnani Filho

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## **FONTES CONSULTADAS**



## **FONTES CONSULTADAS**

BIREME. Centro Latinoamericano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. DeCS: descritores em ciências da saúde. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>