

VERÔNICA CHOMISKI BICALHO CUSTÓDIO

**FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITOS
NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
CICATRIZAÇÃO E À RESPOSTA IMUNE EM
CÉLULAS-TRONCO DE QUERATINÓCITOS DE
PACIENTES QUEIMADOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para a obtenção do título de doutor
em Ciências.

São Paulo

2020

VERÔNICA CHOMISKI BICALHO CUSTÓDIO

**FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITOS
NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
CICATRIZAÇÃO E À RESPOSTA IMUNE EM
CÉLULAS-TRONCO DE QUERATINÓCITOS DE
PACIENTES QUEIMADOS.**

Orientador: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI

São Paulo

2020



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



Coordenação: Prof.^a Dra. Lydia Masako Ferreira

Orientador: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI

2020

Custódio, Verônica Chomiski Bicalho

Fator de crescimento de queratinócitos na expressão de genes relacionados à cicatrização e à resposta imune em células-tronco de queratinócitos de pacientes queimados. Verônica Chomiski Bicalho Custódio. -- São Paulo, 2020. XIX, 147f.

Fator de crescimento de queratinócitos na expressão de genes relacionados à cicatrização e à resposta imune em células-tronco de queratinócitos de pacientes queimados (doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Keratinocyte growth factor in gene expression of wound healing and immunity of keratinocyte stem cells from burned patients.

1. Fator 7 de Crescimento de Fibroblastos, 2. Expressão gênica, 3. Células-tronco, 4. Queratinócitos, 5. Queimadura

DEDICATÓRIA

A DEUS, pelo presente da vida e experiências que me tem proporcionado.

Ao meu marido FABRÍCIO, meu grande e eterno amor, companheiro de vida e de sonhos, por todo suporte e incentivo nos mais amplo sentido destas palavras.

A toda minha FAMÍLIA, essência do meu ser. Em especial, aos meus pais ELIANE e ROBERTO (in memoriam), que sempre foram muito atuantes na educação das filhas e, não medindo esforços para apoiar nossos sonhos.

Aos meus AMIGOS, irmãos que a vida me deu, pela parceria nessa longa jornada e por tornarem os momentos difíceis mais leves, energizantes e felizes.

A todas as pessoas que são minhas fontes de inspiração e de coragem para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, pela louvável dedicação e envolvimento com o meio acadêmico, líder nata e visionária, por ser um exemplo de garra, de liderança, de dinamismo profissional e de busca incansável pelo progresso.

Ao Prof. Dr. **ALFREDO GRAGNANI FILHO**, Professor Associado Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Professor no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, orientador desta tese, pela parceria de longa data, que desde 2012 tem sido meu orientador, iniciando no Curso de Aperfeiçoamento, depois no Mestrado e agora no Doutorado, pelo apoio incondicional, pela amizade, pela paciência, pelos ensinamentos constantes nessa jornada e pelo exemplo de determinação e de resiliência humana.

Ao Prof. Dr. **FÁBIO XERFAN NAHAS**, Professor Adjunto Livre Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, pelo rigor, exemplo de comprometimento profissional e capacidade de gestão dos discentes.

Ao Prof. Dr. **MIGUEL SABINO NETO**, Professor Associado Livre Docente e Chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP e Professor no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional, pela atenção e apoio constante aos discentes.

A todos os **PROFESSORES** do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, por serem exemplos de pesquisadores honestos e determinados, por incentivarem e serem fontes de inspiração dos alunos, pelas constantes sugestões e debates enriquecedores.

À **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE e SILVANA APARECIDA DE ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, pela atenção, pelo auxílio contínuo e carinho desde a época do Curso de Aperfeiçoamento.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, sem os quais essa jornada seria muito mais árdua ou até mesmo impossível, pelo apoio, pela amizade e por todas as contribuições.

Às colegas do Laboratório de Cirurgia Translacional, **SILVANA CORREA, JÉSSICA BONUCCI, SAMUEL NORONHA, DANIELLE TAFNER, DAYANNE MAYER, MARIA CLÁUDIA NEHME PASSOS, MARÍLIA BAENINGER e ÉRIKA TONARELLI**, pelo apoio e pela amizade.

Aos pacientes do Ambulatório do Setor de Mama da Cirurgia Plástica da UNIFESP e do Hospital São Paulo, pela paciência e disponibilidade para o andamento deste estudo.

Aos Residentes de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelo apoio no atendimento e na coleta de material dos pacientes no Centro Cirúrgico e na Unidade de Tratamento de Queimados.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP**, pela oportunidade, desenvolvimento acadêmico e profissional.

*Viva como se você fosse morrer amanhã.
Aprenda como se você fosse viver para sempre.*

(Mahatma Gandhi)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	IV
AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE QUADROS.....	XIV
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XVII
RESUMO.....	XVIII
<i>ABSTRACT</i>	XIX
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	06
3. LITERATURA.....	08
4. MÉTODO.....	27
5. RESULTADOS.....	50
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	108
8. REFERÊNCIAS.....	110
FONTES CONSULTADAS.....	121
NORMAS ADOTADAS.....	123
APÊNDICE.....	125

APÊNDICE I – Parecer Consubstanciado do CEP.....	126
APÊNDICE II – Figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da cicatrização.....	129
Figura V – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GQ- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....	129
Figura VI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GQ- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).	129
Figura VII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GC+, de CT de queratinócitos (n=10).....	130
Figura VIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GC+, de CT de queratinócitos (n=10).....	130
Figura IX – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).	131
Figura X – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....	131
Figura XI – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).	132
Figura XII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....	132
Figura XIII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).....	133
Figura XIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10)..	133

Figura XV – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10)	134
Figura XVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	134
Figura XVII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).....	135
Figura XVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).....	135
Figura XIX – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GQ- versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	136
Figura X – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GQ- versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	136
Figura XXI – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	137
Figura XXII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- versus GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	137
Figura XXIII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).....	138
Figura XXIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).....	138

APÊNDICE III – Figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da resposta imune.....139

Figura XXV – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GQ- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....139

Figura XXVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GQ- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....139

Figura XXVII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GC+, de CT de queratinócitos (n=10).140

Figura XXVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GC+, de CT de queratinócitos (n=10).....140

Figura XXIX – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....141

Figura XXX – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....141

Figura XXXI – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10)142

Figura XXXII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).....142

Figura XXXIII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....143

Figura XXXIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).....143

Figura XXXV – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).....	143
Figura XXXVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).....	143
Figura XXXVII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GQ- versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	145
Figura XXXVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GQ- versus GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).....	145
Figura XXXIX – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).	146
Figura XL – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- versus GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).	146
Figura XLI – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10)	147
Figura XLII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).....	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Desbridamento da necrose em queimadura e fragmentos de pele.....	35
Figura 2 – Cultura de queratinócitos (GC) com 80% de confluência.....	38
Figura 3 – Quantificação de RNA total por meio de Nanovue®.....	41
Figura 4 – Termociclador Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems.....	46
Figura 5 – Frequência dos genes da cicatrização nas seis comparações de expressão gênica relativa.....	56
Figura 6 – Frequência dos genes da cicatrização nas seis comparações de expressão gênica relativa.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Delianeamento da pesquisa.....	32
Quadro 2 – RT ² Profiler™ PCR Array <i>Human Wound Healing</i>	43
Quadro 3 – RT ² Profiler™ PCR Array <i>Human Innate & Adaptive Immune Responses</i>	44
Quadro 4 – Comparações nas expressões gênicas relativas.....	48
Quadro 5 – Expressão gênica da cicatrização em CT de queratinócitos de pacientes queimados.....	53
Quadro 6 – Expressão gênica da cicatrização em CT de queratinócitos de pacientes queimados.....	55
Quadro 7 – Expressão gênica da resposta imune em CT de queratinócitos de pacientes queimados.....	59
Quadro 8 – Expressão gênica da resposta imune em CT de queratinócitos de pacientes queimados.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Idade e sexo dos pacientes, por grupo.....	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CNT: Células não-tronco

CT: Células-tronco

KGF: Fator de crescimento de queratinócito, do inglês *keratinocyte growth factor*

FGF: Fator de crescimento de fibroblasto, do inglês *fibroblast growth factor*

FR: *Fold regulation* (valor de expressão gênica relativa)

GC: grupo controle

GC+: grupo controle com suplementação de KGF

GC-: grupo controle sem suplementação de KGF

GQ: grupo queimadura

GQ+: grupo queimadura com suplementação de KGF

GQ-: grupo queimadura sem suplementação de KGF

RT-qPCR: *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

RESUMO

INTRODUÇÃO: O tratamento de grandes queimaduras é um grande desafio. Estudos experimentais e clínicos evidenciam que a aplicação tópica de fatores de crescimento acelera a cicatrização de queimaduras. O fator de crescimento de queratinócito (KGF) é produzido por fibroblastos e estimula queratinócitos na reepitelização de feridas. **OBJETIVO:** Analisar o efeito do KGF na expressão de genes relacionados à cicatrização e à resposta imune em células-tronco de queratinócitos de pacientes queimados. **MÉTODO:** Cultura de queratinócitos de pacientes com grande queimadura foi suplementada com 40 ng de KGF. Na sequência, foram obtidas as células-tronco (CT), através do protocolo de Aldefluor[®], por citometria de fluxo e classificação celular, para a análise da expressão gênica por RT-qPCR Array. **RESULTADOS:** Houve maior número de genes expressos em CT, bem como maiores valores de expressão gênica relativa. Ainda, a expressão de genes relacionados à resposta imune foi maior do que a expressão genes relacionados à cicatrização, tanto em número de genes quanto em valores de expressão gênica relativa. Quarenta e um dos 84 genes relacionados à resposta imune apresentaram-se diferencialmente expressos, sendo 93% hiperexpressos e 7% hipoexpressos em CT. Dezoito dos 84 genes relacionados à cicatrização apresentaram-se diferencialmente expressos, sendo 89% hiperexpressos e 11% hipoexpressos em CT. **CONCLUSÃO:** O KGF promoveu expressão gênica diferencial em CT de queratinócitos de pacientes com grande queimadura, sendo os genes de interesse na cicatrização CSF3, IGF1, ITGA6, MMP2, MAPK1, TAGLN, ITGB3, IL10, FGF2 e FGF10 e, na resposta imune, a MAPK1, TLR7, CCR5, IL2, TRAF6, IRAK1, MAPK8, IL23A, RAG1 e IL17A.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Treatment of severe burn is a huge challenge. Experimental and clinical trials applying growth factors topically may accelerate wound healing in burns. The keratinocyte growth factor (KGF) is produced by fibroblasts and stimulates keratinocytes in the reepithelization of wounds. **OBJECTIVE:** To analyze the effect of KGF in the gene expression of wound healing- and immune response-related genes of keratinocyte-stem cells (KSC) from patients with severe burn. **METHOD:** Keratinocytes culture from severe burned patients were supplemented with 40 ng of KGF. Then, KSC were obtained by Aldefluor protocol, flow cytometry, and cell sorting for analyzing the wound healing-related genes and immune response-related genes expression by RT-qPCR Array. **RESULTS:** There was a greater number of genes expressed in KSC, as well as higher values of relative gene expression. Also, the gene expression of immune response-related genes was greater than wound healing-related genes, both in the number of genes and in the values of relative gene expression. Forty-one of the 84 immune response-related genes were differently expressed, with 93% up-regulated and 7% down-regulated in KSC. Eighteen of the 84 genes were differentially expressed, 89% of which were up-regulated and 11% down-regulated in KSC. **CONCLUSION:** The KGF promotes differentially gene expression in KSC of severe burned patients, and the interesting genes in wound healing are CSF3, IGF1, ITGA6, MMP2, MAPK1, TAGLN, ITGB3, IL10, FGF2 and FGF10 and, in the immune system are MAPK1, TLR7, CCR5, IL2, TRAF6, IRAK1, MAPK8, IL23A, RAG1, and IL17A.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A queimadura é um trauma que rompe a barreira protetora da pele e é considerada problema de saúde pública mundial (LACERDA *et al.*, 2010). Dados epidemiológicos mostram que mais de seis milhões de pessoas sofrem queimaduras anualmente no mundo, com estimativa de 265 mil mortes apenas por incêndios. Mais de 90% das queimaduras fatais relacionadas ao fogo ocorrem em países de baixa e média taxa de desenvolvimento social e econômico. Queimaduras não fatais também se enquadram como um problema de saúde pública, pois causam danos fisiológicos e emocionais ao paciente (WHO, 2011).

Queimaduras são classificadas de acordo com a profundidade, extensão e agente causador. Em relação à profundidade, queimaduras superficiais acometem apenas a epiderme e os sintomas limitam-se à hiperemia e dor. Queimaduras de espessura parcial apresentam bolhas ou vesículas e são subdivididas em espessura parcial superficial e profunda. Queimaduras de espessura parcial superficial atingem até a derme papilar, a base da bolha é rosa pálido e é bastante dolorosa. Já queimaduras de espessura parcial profunda acometem toda a derme, a base da bolha fica branca e é indolor. Por fim, queimaduras de espessura total atingem o tecido subcutâneo e/ou mais profundamente, com coloração variada e textura coriácea (TOUSSAINT & SINGER, 2014).

Associado à profundidade, a extensão também interfere na evolução e prognóstico da queimadura, sendo considerada grande queimadura, ou paciente grande queimado, quando a extensão ultrapassa 25% da superfície corporal queimada (SCQ), pois causam respostas inflamatórias locais e sistêmicas persistentes, levando à instabilidade hemodinâmica. Em grande

queimadura, o alto nível de mediadores inflamatórios séricos piora o prognóstico dos pacientes. Como consequência, há ampla alteração na expressão gênica das células, gerando distúrbios no metabolismo celular, na resposta imune e na capacidade de cicatrização (GRECO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012; PLICHTA *et al.*, 2017).

A resposta metabólica frente a uma grande queimadura é o hipermetabolismo. A taxa metabólica aumenta em até 80% durante meses após o trauma, com aumento do consumo de energia e da degradação proteica e muscular, um catabolismo intenso, podendo resultar em perda de peso, retardo de crescimento em crianças e deficiência na cicatrização (PORTER, 2016).

Diante disso, prevenir e tratar infecções torna-se um grande desafio, pois o paciente desenvolve um quadro de imunodeficiência aguda com a perda da pele. O tratamento cirúrgico se dá através da excisão da necrose e cobertura com auto-enxerto de pele, e deve ser realizado precocemente para diminuir o risco de morte. A cobertura cutânea em lesões mais superficiais ocorre por reepitelização, enquanto que em lesões mais profundas é necessário o enxerto de pele, e o processo de cicatrização tem papel fundamental (GRAGNANI *et al.*, 2014; PLICHTA *et al.*, 2017).

A pele desempenha função essencial na proteção contra agressões externas e patógenos. Além da função de barreira, a pele possui células e moléculas altamente sofisticadas as quais compõe o sistema imunológico da pele (ABDALLAH, MIJOUIN, PICHON, 2017). Sendo assim, o estudo da cicatrização e da resposta imune por meio de biologia molecular é primordial para elucidar os eventos celulares após um trauma tão complexo como a queimadura e a possível evolução dos pacientes (WOLF, TOMPKINS, HERNDON, 2014).

A análise da expressão gênica possibilita a detecção de mudanças epigenéticas, ou seja, mudanças funcionais no genoma sem que tenha havido alteração na sequência do DNA. Neste caso, auxilia na busca por biomarcadores, ou novos genes alvos, para o diagnóstico precoce de uma condição particular em um dado momento, e sua evolução, podendo contribuir para o tratamento de grande queimadura (YAN *et al.*, 2015).

Aliado a isso, evidências experimentais e clínicas tem demonstrado que fatores de crescimento participam ativamente do processo de cicatrização. Fatores de crescimento são proteínas produzidas por diversos tipos celulares e plaquetas, capazes de estimular o crescimento celular, a renovação tecidual e a cicatrização. Na pele, existem diversos tipos de fatores de crescimento produzidos por queratinócitos da epiderme, fibroblastos da derme, por células endoteliais do revestimento interno dos vasos sanguíneos, por plaquetas e por células do sistema imune (CHING *et al.*, 2011; CORNICK *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

O fator de crescimento de fibroblastos 7, conhecido como fator de crescimento de queratinócitos (do inglês, *keratinocyte growth factor*, KGF ou *fibroblast growth factor-7*, FGF-7), é um agente mitógeno sintetizado por fibroblastos, células mesenquimais, e atua em receptores de queratinócitos, células ectodérmicas, desempenhando um papel central na cicatrização de feridas por induzir a proliferação, diferenciação e migração dos queratinócitos (SINGER & CLARK, 1999; HSU, LI, FUCHS, 2014; YEN, THAO, THUOC, 2014). Por esse motivo, o KGF é alvo de estudos do Laboratório de Cirurgia Translacional da UNIFESP (SOBRAL *et al.*, 2007; GRAGNANI *et al.*, 2010; GRAGNANI *et al.*, 2013; NORONHA *et al.*, 2014a; CHOMISKI *et al.*, 2016).

Em relação a novas terapias para queimaduras, o uso de fatores de crescimento mostra-se promissor na cicatrização, embora a aplicação clínica efetiva ainda seja um desafio devido à inativação, por serem proteínas muito sensíveis e meia-vida curta (DENZINGER *et al.*, 2018). Fatores de crescimento são peptídeos sinalizadores, juntamente com citocinas e quimiocinas, produzidos por diversos tipos celulares. No processo de cicatrização, estimulam a proliferação, diferenciação e migração celular (BARRIENTOS *et al.*, 2008).

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado a efetividade do KGF no processo de cicatrização de feridas e em queimaduras (GRAGNANI *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2018; MUHAMED *et al.*, 2019). O KGF é um fator de crescimento fundamental, entre vários, para a reepitelização e cicatrização de lesões da pele. Essa sinalização ocorre na camada basal da epiderme, tanto em células-tronco (CT), quanto em células mais diferenciadas (HSU, LI, FUCHS, 2014).

A partir desses fatos, criou-se a hipótese de que o efeito do KGF em CT da pele ao redor das queimaduras poderia ser mais intenso, pois as CT são auto-renováveis e dão origem a outras células proliferativas da própria camada, acelerando a cicatrização. Sendo assim, foi delineado um experimento com CT de queratinócitos para analisar se a suplementação com KGF poderia modificar a expressão gênica da cicatrização e da resposta imune, com o propósito de sugerir genes alvos para serem analisados como biomarcadores iniciais da cicatrização.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito do fator de crescimento de queratinócitos na expressão de genes relacionados à cicatrização e à resposta imune em células-tronco de queratinócitos de pacientes queimados.

3. LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 Cicatrização e resposta imune em queimadura

SINGER & CLARK (1999) descreveram detalhes do processo de cicatrização de feridas. Trata-se de um processo complexo, com fases que se sobrepõem, frente a um dano tecidual. Esse processo estimula a síntese de uma variedade de fatores de crescimento por diferentes tipos celulares, entre eles, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-beta), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

BARRIENTOS *et al.* (2008) relataram que após lesão na pele, a barreira epidérmica é rompida e os queratinócitos liberam interleucina-1 (IL1). A IL1 é o primeiro sinal que alerta as células vizinhas para danos de barreira. Além disso, componentes do sangue também são liberados no local da ferida, ativando a cascata de coagulação. Em poucas horas após a lesão, inicia-se a reepitelização e a liberação de EGF, TGF-alfa e FGF, que estimulam a migração e a proliferação de células epiteliais. Este processo se inicia após dissolução dos contatos célula-célula e célula-substrato, promovendo polarização e migração dos queratinócitos sobre a matriz extracelular provisória. Uma vez que o fechamento da ferida é alcançado, os queratinócitos sofrem estratificação e diferenciação para restaurar a barreira. Ainda, relataram que os fatores de crescimento EGF, FGF, TNF-

α , PDGF e VEGF estão aumentados em feridas agudas, mas diminuídos em feridas crônicas. E as interleucinas IL1, IL6 e TNF- α estão aumentadas em feridas agudas e crônicas.

SONG *et al.* (2012) realizaram biópsias em pele e músculo de oito voluntários pediátricos com grande queimadura e compararam com pacientes pediátricos hígidos a fim de determinar a expressão do fator de alongação eucariótica 2 (eEF2), uma proteína responsável pela síntese proteica, e a inativação da eEF2 quinase (eEF2K), sendo que a inativação de eEF2K por fosforilação promove inativação de eEF2 e, por consequência, da síntese proteica. Coletaram os tecidos dos pacientes com queimadura em três momentos distintos, sendo o primeiro entre 0-10 dias pós-trauma, o segundo entre 11-49 dias pós-trauma, e o terceiro entre 50-365 dias pós-trauma. Avaliaram o gasto energético de repouso, ou taxa metabólica basal, a composição corporal e taxa de síntese de proteína muscular. Identificaram hipermetabolismo persistente nos pacientes com queimadura devido ao aumento da taxa metabólica basal e perda de massa muscular sem alteração da síntese proteica, indicando uma mudança para catabolismo pós-queimadura. Concluíram que a queimadura induz a ativação prolongada de eEF2K e eEF2 e que alterações nestes mediadores podem contribuir para o intenso hipermetabolismo observado em pacientes com grande queimadura.

JESCHKE *et al.* (2014) avaliaram se um painel de biomarcadores poderia ser utilizado para determinar a sobrevivência de pacientes pediátricos com grande queimadura, sendo que 79 das 230 crianças vieram a óbito. Foram analisadas características demográficas, resultados clínicos

e perfis sorológicos da resposta inflamatória aguda, como citocinas, hormônios e proteínas, em 11 momentos durante 180 dias pós-queimadura. Encontraram diferenças profundas nos biomarcadores da inflamação e do metabolismo em cada avaliação entre os pacientes sobreviventes e não sobreviventes. Dentre os pacientes que não sobreviveram, encontraram níveis séricos significativamente mais elevados de IL6, IL8, fator estimulante de colônias granulocitárias (GCSF ou CSF3), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína C-reativa, glicose, insulina, azoto de ureia no sangue, creatinina e bilirrubina. Além disso, os pacientes não sobreviventes apresentaram maior hipermetabolismo, que foi associado ao aumento da disfunção dos órgãos e à sepse quando comparado com os sobreviventes. Concluíram que os pacientes não sobreviventes apresentaram diferentes trajetórias na resposta inflamatória, no metabolismo e nas respostas de fase aguda, o que possibilita novos modelos preditivos para melhorar e personalizar a evolução da queimadura.

NAMAS *et al.* (2015) reuniram, em uma revisão, aspectos da resposta imune na inflamação induzida por trauma. Sabe-se que o trauma suprime respostas de linfócitos T CD4+. As células apresentadoras de antígeno (CAA) intermedeiam a ativação de células da resposta imune. Na ativação por CAA, linfócitos T CD4+ virgens se diferenciam em pelo menos quatro subconjuntos T auxiliares: Linfócitos Th1, que produzem interferon- γ (IFN γ) e medeia a resposta imune celular; linfócitos Th2, que produzem IL4, IL5, IL10 e IL13 e induzem à resposta imune humoral e respostas alérgicas; linfócitos Th17, que produzem IL17, IL21 e IL22 e estão envolvidos com a defesa e a auto-resposta imune do hospedeiro; e linfócitos T reguladores, que suprimem a resposta imune para alcançar a

homeostase. Sendo assim, respostas imunes do tipo Th1 podem ser reduzidas acentuadamente após uma lesão por queimadura. Ao contrário, o trauma pode promover respostas imunes do tipo Th2 bem como anergia dos linfócitos T, um mecanismo de tolerância do linfócito na presença do antígeno, permanecendo hiporresponsivo por um longo período. Frente a isso, postula-se que um trauma grave pode desencadear uma resposta imune adaptativa contra-inflamatória, desencadeando uma resposta inflamatória imune inata excessiva.

YAN *et al.* (2015) desenvolveram modelos preditivos para triagem precoce de pacientes com queimaduras, baseado na hiper-suscetibilidade a infecções repetidas. Reafirmaram que a infecção continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade após trauma grave, o que exige novas estratégias para combater infecções. E modelos preditivos de infecção não existiam até o momento. Realizaram análise secundária de 459 pacientes com queimaduras de terceiro grau e SCQ maior ou igual a 20% em seis centros de queimaduras nos EUA. Compararam os transcriptomas sanguíneos, com 180 horas de intervalo entre lesão e o transcriptoma, de 47 pacientes com menos de 1 episódio de infecção com 66 pacientes hiper-suscetíveis. Consideraram múltiplos episódios de infecção quando igual ou maior de 2. Três modelos preditivos foram desenvolvidos, sendo as variáveis: (1) características clínicas; (2) perfis de expressão de 14 sondas genômicas; (3) combinando (1) e (2). Os modelos genômicos e clínicos desenvolvidos foram altamente preditivos, evidenciando que pacientes hiper-suscetíveis apresentam alterações precoces nas vias de sinalização relacionadas à resposta imune, modulação epigenética e remodelamento da cromatina. Concluíram que a triagem

precoce de pacientes queimados mais suscetíveis a infecções pode ser realizada usando características clínicas e ou assinaturas genômicas. Assinaturas genômicas ampliam o conhecimento sobre a fisiopatologia da hiper-suscetibilidade à infecção, colaborando para o desenvolvimento de novos agentes profiláticos e terapêuticos.

BOHANNON *et al.* (2016) investigaram as alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias após queimadura e relacionaram com a extensão da queimadura em pacientes adultos. Amostras de sangue de 60 pacientes queimados e 9 pacientes hígidos foram analisados nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 após queimadura para analisar as concentrações de IL6, IL8, IL10, TNF- α e G-CSF. Os pacientes queimados foram divididos em três grupos de acordo com a extensão da queimadura, de 15 a 30%, 31 a 50% e acima de 50% da SCQ. Todas as citocinas analisadas apresentaram-se significativamente maiores em pacientes queimados durante o período observado. As concentrações de IL8, IL10 e G-CSF aumentaram de acordo com o tempo e com a extensão da queimadura. Concluíram que esses achados indicam que IL6, IL8, IL10, TNF- α e G-CSF são mediadores inflamatórios importantes para analisar alterações bioquímicas e fisiológicas após queimadura. Ressaltaram, também, que vários fatores podem influenciar as concentrações dessas citocinas, inclusive a extensão da queimadura.

3.2 Expressão gênica em queimadura

STEINSTRASSER *et al.* (2002) examinaram a expressão do gene CD14, mediador imunológico antimicrobiano, na pele humana após

queimadura. O CD14 é fundamental na ativação de células imunes quando reconhece lipopolissacarídeos (LPS) na superfície microbiana. Uma vez que os níveis de LPS em queimadura são frequentemente elevados, os autores investigaram a expressão de CD14 na pele humana após lesão térmica. Foram incluídos 57 pacientes com queimadura de segundo grau e compararam com pele de doadores hígidos. Realizaram RT-qPCR Array para análise da expressão do CD14 e imuno-histoquímica para localizar a expressão de CD14 em ambos os grupos. Notaram aumento significativo da expressão de CD14 imediatamente após a queimadura, atingindo níveis basais após 14 dias. A imuno-histoquímica revelou coloração mais intensa de CD14 após 24 horas da lesão, atingindo níveis normais entre 5 a 7 dias após a queimadura. Concluíram que esta perda de expressão de CD14 no local da ferida pode contribuir para o enfraquecimento da resposta imune após 5 a 6 dias pós-queimadura, momento em que os pacientes se tornam vulneráveis à infecção.

GRAGNANI *et al.* (2014a) avaliaram a expressão de 84 genes mediadores da resposta inflamatória em queratinócitos humanos primários cultivados da epiderme de pacientes com queimaduras pequenas (Qp), abaixo de 5% da SCQ, e grandes queimaduras (Qg), acima de 25% da SCQ. Sabe-se que a cicatrização é um evento dinâmico composto por fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento, e que o prolongamento da fase inflamatória aguda pode dificultar a cicatrização. Neste estudo, queratinócitos viáveis ao redor das lesões, provenientes do desbridamento cirúrgico, foram cultivados e tiveram a expressão gênica analisada por RT-qPCR. Foi utilizado o MetaCoreTM para a análise de redes e processos de *Gene Ontology*. Este estudo mostrou que as quimiocinas da família CXC e

as interleucinas IL8 e IL1B mostraram-se hiperexpressas, especialmente no grupo QG. Já as quimiocinas C, CC, CX3C, as interleucinas IL13RA1, IL13 e IL5RA mostraram-se hipoexpressas, especialmente no grupo QNG. Este estudo concluiu que houve diferenças no perfil da expressão gênica entre Qp e Qg, servindo de referência para futuros estudos intervencionais sobre inflamação aguda em queimaduras.

NORONHA *et al.* (2014b) avaliaram o perfil de expressão de genes relacionados ao sistema imune inato e adaptativo em queratinócitos epidérmicos primários humanos de pacientes com grande queimadura. Após a análise da expressão gênica, encontraram 63% desses genes expressos diferencialmente, dos quais 77% estavam hipoexpressos e 23% estavam hiperexpressos em relação ao grupo controle, de queratinócitos cultivados provenientes de pacientes hígidos, submetidos à cirurgia estética. Dentre os genes diferencialmente expressos, destacaram-se com hiperexpressão a IL8 (41), e com hipoexpressão o TNF (-92), HLA-E (-86), LYZ (-74) e HLA-A (-35), relacionados à resposta imune inata; IL6 (32), hiperexpresso, relacionado à resposta inflamatória e resposta imune adaptativa relacionada à Th2; CCR6 (-73) e CD86 (-41), hipoexpressos, relacionados à resposta imune adaptativa, sendo o primeiro marcador de linfócitos Th17 e o segundo marcador de linfócitos Th2. Este estudo contribuiu para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à infecção da ferida pós-queimadura.

CORNICK *et al.* (2014) avaliaram o perfil da expressão gênica relacionados aos receptores *toll-like* (TLR) em queratinócitos primários humanos epidérmicos de pacientes com grande queimadura e compararam

a um grupo controle, composto por queratinócitos de pacientes hígidos submetidos à cirurgia estética. TLR é uma classe de receptores de reconhecimento padrão (“*pattern recognition receptors*”, PRRs) de membrana celular, relacionados ao sistema imune inato. Geralmente, os TLRs são expressos na membrana de macrófagos e células dendríticas da pele ou mucosa do trato gastrointestinal, os quais ativam a resposta imune ao reconhecer padrões moleculares relacionados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). Este estudo revelou 21% dos genes diferencialmente expressos, todos hipoexpressos. Os sete genes mais hipoexpressos foram HSPA1A (-58) e HRAS (-36), relacionados à resposta específica a fungos e parasitas; FOS (-16), relacionados à resposta específica a bactérias; MAP2K3 (-23) e RELA (-18), relacionados à resposta sinalizadora de TLR; TOLLIP (-23), relacionado à sinalização de regulação negativa de TLR e TLR1 (-6,0), relacionado ao próprio TLR. Este estudo elucidou mecanismos moleculares da resposta imune inata em pacientes com grande queimadura, indicando diminuição da resposta imune inata.

BONUCCI *et al.* (2018) avaliaram a ação da vitamina C na expressão de 84 genes relacionados ao estresse oxidativo em fibroblastos, provenientes de pele de pacientes com grande queimadura. Sabe-se que a vitamina C tem ação antioxidante e, assim, poderia reduzir processos oxidativos e morte celular, contribuindo para o processo de cicatrização. Como controle, utilizaram cultura de fibroblastos de pacientes hígidos. A análise da expressão gênica, por RT-qPCR *array*, mostrou 10 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos. Desses 10 genes, cinco eram relacionados à processos antioxidantes e cinco pró-oxidantes, ou seja,

relacionados ao metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Concluiu-se que a vitamina C estimula a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, antioxidantes e pró-oxidantes, em fibroblastos de pacientes com grande queimadura.

3.3 KGF na cicatrização

SOBRAL *et al.* (2007) avaliaram o efeito do fator de crescimento de queratinócito (KGF) em modelo experimental *in vitro* de queimadura composto de substrato dérmico e queratinócitos humanos cultivados, na presença de *Pseudomona aeruginosa*. Trata-se de uma bactéria comumente presente em infecções de pacientes que sofrem queimadura, o que desencadeia a síntese de peptídeos específicos e ativação da resposta imunológica. Queratinócitos humanos derivados de prepúcio neonatal foram semeados sobre substituto dérmico composto de colágeno e matrigel, em filtro Millipore® em placas de Petri contendo uma camada sustentadora de células 3T3-J2 para simular um epitélio estratificado com diferentes concentrações de KGF (meio sem KGF, meio suplementado com 1, 5, 10 e 40 ng/mL) e também sobre camada sustentadora modificada geneticamente, produtora de KGF. Os pesquisadores concluíram que o KGF inibiu o crescimento bacteriano, com resposta dose-dependente. Embora o KGF sozinho não tenha apresentado ação antimicrobiana, o estudo sugere que os queratinócitos tratados com KGF aumentaram a síntese de defensinas na presença da bactéria, inibindo seu crescimento.

GRAGNANI *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do estresse oxidativo e da suplementação do KGF em queratinócitos humanos cultivados. O

estresse oxidativo foi produzido através da adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ao meio de cultura. Queratinócitos humanos cultivados foram divididos em quatro grupos: grupo controle, grupo KGF, grupo H_2O_2 e grupo H_2O_2 contendo KGF. A suplementação do KGF ao meio de cultura de queratinócitos determinou menor viabilidade celular quando comparado ao grupo controle. Porém, na presença de H_2O_2 , o KGF protegeu os queratinócitos contra o estresse oxidativo, aumentando a viabilidade celular.

GRAGNANI *et al.* (2013) analisaram a expressão gênica de KGF, TNF-alfa e IL1beta, em cultura de fibroblastos e queratinócitos de pacientes com grande e pequena queimaduras comparados com o grupo controle. Utilizando RT-qPCR *Array*, concluíram que há um padrão quantitativo na expressão do gene KGF e IL1, mais expresso de acordo com o maior tamanho da queimadura. Notaram também que o TNF-alfa não foi expresso, sugerindo que durante o processo de inflamação aguda outras células devem expressar esse gene.

DOU *et al.* (2014) avaliaram a aplicação tópica de gel contendo plasmídeos com DNA de KGF para o fortalecimento da pele e folículos pilosos em camundongos. Ressaltaram que a aplicação tópica de fatores de crescimento não tem sido efetiva devido à baixa absorção e fragilidade dos peptídeos frente às peptidases na derme. A intervenção foi realizada no dorso de camundongos, após depilação com creme e microdermoabrasão mecânica, com agulhas de 15 mm de diâmetro e sob pressão 20 mm Hg, a cada 12h durante quatro dias. Para o grupo controle, utilizaram gel contendo vetor controle. A avaliação histológica, feita por luminescência a

cada 12h até completar 120h, revelou a espessura epitelial significativamente aumentada no grupo de pele transfectada pelo KGF em comparação ao grupo controle (26 ± 2 versus 16 ± 4 μm) às 48h ($p=0,045$). A espessura dérmica também foi aumentada no grupo KGF (255 ± 36 versus 162 ± 16 μm) às 120h ($P = 0,057$). Avaliaram o nível de RNAm de KGF por RT-qPCR e a síntese proteica por imuno-histoquímica, resultando em um aumento significativo no grupo transfectado com KGF conforme já esperado. O teste biomecânico mostrou a pele significativamente mais resistente no grupo transfectado com KGF em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que o plasmídeo de DNA de KGF, administrado topicamente, pode aumentar a espessura e a resistência da pele, demonstrando o potencial terapêutico na cicatrização de feridas, e que podem ser administrados repetidamente devido à baixa resposta imune.

NORONHA *et al.* (2014a) avaliaram os níveis de KGF e beta defensina-4 humana (HBD-4) produzidos por fibroblastos e queratinócitos cultivados, provenientes de pele de pacientes queimados. Quatro pacientes tinham grandes queimaduras (Qg), acima de 25% da SCQ, quatro tinham queimaduras pequenas (Qp), abaixo de 25% da SCQ, e dois não tinham queimaduras, sendo o tecido proveniente de mamoplastia redutora para grupo controle (GC). Os genes HBD-4 e KGF foram analisados por RT-qPCR. Nos fibroblastos, a expressão do gene KGF foi de 220 ± 80 e $33,33 \pm 6,67$ ($M \pm DP$; $N = 4$) e do gene HBD-4 foi de $15,0 \pm 4,0$ e $11,5 \pm 0,5$ ($M \pm DP$; $N = 4$), para Qg e Qp respectivamente. Já nos queratinócitos, a expressão do gene KGF foi de $11,2 \pm 1,9$ e $3,45 \pm 0,37$ ($M \pm DP$; $N = 4$) e do gene HBD-4 foi de $0,0 \pm 0,0$ e $13,4 \pm 4,8$ ($M \pm DP$; $N = 4$), para os grupos Qg e Qp, respectivamente. Nota-se aumento da expressão do KGF

em pacientes queimados, em queratinócitos e fibroblastos, sendo maior em Qg do que em Qp. O gene HBD-4 apresentou aumento da expressão em fibroblastos, sendo maior em QG do que em QNG, e aumento da expressão em queratinócitos do grupo QNG, mas não houve expressão diferencial em fibroblastos do grupo QG. Com esse estudo, é possível concluir que a expressão gênica de KGF é maior em fibroblastos do que em queratinócitos de pacientes queimados, sendo maior em QG do que em QNG, e a expressão gênica de HBD-4, tanto em QG quanto QNG, é maior em queratinócitos do que em fibroblastos.

ZHANG *et al.* (2015) descreveram o complexo de sinalização intracelular induzida por KGF em queratinócitos cultivados. O KGF promove a proliferação, migração, e adesão de queratinócitos da pele via ligação do KGF ao receptor de KGF (KGFR), que ativa subunidade alfa das proteínas G (*Gai1/3*), recrutando a proteína-1 de ligação associada ao KGFR (*Gab1*), fosforilação e consequente ativação da via PI3K-AKT-mTORC1. Notaram que um curto RNA de *Gai1/3* inibiu a proliferação e migração celular induzida por KGF, bem como o acúmulo da ciclina CD1, relacionada com proliferação celular, e fibronectina. Além disso, observaram aumento da expressão de *Gai1/3* em feridas de pele humana e em queloides.

CHOMISKI *et al.* (2016), em estudo prévio que gerou a perspectiva de nova pergunta sobre o tema, avaliaram a ação do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) na expressão de 84 genes relacionados à cicatrização de feridas em cultura de queratinócitos de pacientes com grande queimadura, comparados a um grupo controle de

cultura de queratinócitos de pacientes hígidos. Foram avaliados quatro grupos: queratinócitos tratados com KGF de pacientes com grande queimadura (GQ+), queratinócitos não tratados de pacientes com grande queimadura (GQ-), queratinócitos tratados com KGF de pacientes hígidos (GQ+) e queratinócitos não tratados de pacientes hígidos (GQ-). Foram realizadas análises da expressão gênica relativa por RT-qPCR, sendo (1) GC+ *versus* GC-, (2) GQ- *versus* GC-, (3) GQ+ *versus* GC-, (4) GQ+ *versus* GQ-, (5) GQ+ *versus* GC+ e (6) GQ-*versus* GC+. A comparação 1 mostrou um gene hipoexpresso e um hiperexpresso; as comparações 2 e 3 resultaram nos mesmos cinco genes hipoexpressos; a comparação 4 não apresentou diferença significativa na expressão gênica relativa; a comparação 5 mostrou 26 genes hipoexpressos e 7 genes hiperexpressos; e a comparação 6 mostrou 25 genes hipoexpressos e 11 hiperexpressos. Concluíram diversos genes relacionados à cicatrização mostraram-se diferencialmente expressos em queratinócitos de pacientes com grande queimadura.

PAN *et al.* (2018) investigaram a aplicação tópica de um complexo de nanopartículas de ouro com KGF, desenvolvido pelos autores, na cicatrização de feridas. Os resultados experimentais *in vitro* demonstraram que o produto desenvolvido promoveu maior proliferação de queratinócitos quando comparado à nanopartículas de ouro ou ao KGF isolados. Em modelos de feridas com espessura total, em ratos, os resultados foram os mesmos. Notaram que o complexo de nanopartículas de ouro com KGF desenvolvido melhorou a cicatrização de feridas, promovendo a reepitelização. Concluíram que esse nanocomposto pode ser utilizado no

tratamento de feridas em humanos, já que é um produto estável e biocompatível.

DENZINGER *et al.* (2018) desenvolveram uma técnica para comparar a cicatrização de feridas utilizando RNA mensageiro (RNAm) de KGF, modificado *in vitro*. Após a transfecção celular, ou seja, introdução do RNAm modificado, os pesquisadores avaliaram os efeitos da proteína de KGF produzida em relação à migração celular e reepitelização de queratinócitos. Os resultados mostraram que as células transfectadas exibiram uma alta liberação de KGF, o suficiente para melhorar significativamente a reepitelização, sem interferir no DNA. Concluíram que essa técnica parece ser uma estratégia de terapia gênica promissora, especialmente para feridas difíceis de cicatrizar.

QU *et al.* (2018) investigaram a aplicação de membranas de colágeno quimicamente modificadas contendo KGF e FGF-2 na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Relataram que um dos principais desafios associados à regeneração da pele é a vascularização obstruída, além de um grau insuficiente de epitelização. Tendo em vista a complexidade desses processos, uma solução para essas limitações poderia ser simular o desenvolvimento da pele hígida e o reparo da ferida através da liberação exógena de múltiplas citocinas. Resultados *in vitro* evidenciaram que este sistema promoveu maior proliferação e migração celular. Após o transplante do biomaterial em um modelo de feridas, em ratos, o grupo contendo os dois fatores de crescimento mostrou redes vasculares mais desenvolvidas e regeneração epidérmica mais organizada nas feridas, quando comparado ao KGF e ao FGF-2 isolados. Concluíram que esta nova abordagem, a liberação de fatores de crescimento a partir de

uma membrana de colágeno modificada, abre novos caminhos para atender às necessidades clínicas no tratamento de feridas.

MUHAMED *et al.* (2019) desenvolveram um gel de fibrina com KGF para avaliar a cicatrização de feridas em camundongos. A fibrina é utilizada pela indústria farmacêutica como carreador de fármacos. Os autores realizaram experimentos *in vitro*, em fibroblastos humanos, e *in vivo*, em camundongos. *In vitro*, avaliaram a migração de fibroblastos na presença de fibrina associada ao KGF e compararam com fibrina livre, notando maior migração celular na presença de KGF. *In vivo*, avaliaram a taxa de cicatrização em modelo de lesão de espessura total comparando quatro intervenções: soro fisiológico, gel de fibrina isolado, KGF livre e gel de fibrina associado com nanopartículas de KGF. A análise histológica revelou que a presença de KGF, tanto livre quanto em gel, resultaram maior celularidade na epiderme. Em contrapartida, o gel de fibrina isolado estimulou a formação de uma camada mais espessa de fibrina no leito da ferida, aparentando uma cicatrização frágil. Concluíram que a presença do KGF aumentou a migração celular e taxa de cicatrização de feridas, sugerindo que o gel de fibrina pode ser utilizado como carreador de outros fatores de cicatrização.

3.4 Células-tronco de queratinócitos

As CT são células não especializadas no corpo humano. Elas são capazes de se autorreplicarem e de se diferenciarem em diversos tipos celulares. A potência de diferenciação é reduzida a nível em que se

diferenciam. As CT totipotentes são capazes de se dividir e se diferenciar em células de todo o organismo, formando estruturas embrionárias e extra-embrionárias. As CT pluripotentes formam células de todas as camadas germinativas embrionárias. As CT multipotentes, por sua vez, podem se especializar em células discretas de linhagens celulares específicas. Um exemplo é uma CT hematopoiética, que pode se desenvolver em vários tipos de células sanguíneas. A diferenciação de uma CT multipotente origina células oligopotentes, como uma CT mielóide originando diferentes glóbulos brancos, mas não glóbulos vermelhos. No entanto, algumas células multipotentes são capazes de se converter em tipos de células não relacionadas, o que sugere a denominação de células pluripotentes. Exemplos de células pluripotentes são osteoblastos, condrócitos e adipócitos, que são derivadas de CT mesenquimais multipotentes. Por fim, as CT unipotentes diferenciam-se do modo mais restrito e fazem divisões repetidas de um único tipo celular, como os fibroblastos por exemplo. Essa característica faz das CT promissoras para uso terapêutico em medicina regenerativa (DOMINICI, 2006; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

Estudos atuais identificam três populações de CT epidérmicas, como CT interfoliculares na camada basal epidérmica (ou CT de queratinócitos), CT na protuberância do folículo piloso e CT no canalículo da glândula sebácea, localizadas imediatamente acima da protuberância no folículo piloso. Em condições normais, essas três populações de CT parecem funcionar de forma independente para sintetizar a epiderme interfolicular, o folículo piloso e a glândula sebácea. No entanto, estudos recentes sugerem que cada uma dessas populações celulares possui capacidade de replicar qualquer estrutura da pele, o que pode ser particularmente importante

quando a epiderme sofre lesão (LEVY *et al.*, 2007; FUCHS & HORSLEY, 2008).

BARRANDON & GREEN (1987) demonstraram que as células humanas epidérmicas formadoras de colônias são heterogêneas em sua capacidade proliferativa, podendo ser classificadas em três classes distintas, como holoclone, paraclone e meroclone. O holoclone tem a maior capacidade reprodutiva e menos de 5% das colônias formadas se diferenciam terminalmente. O paraclone contém exclusivamente células com uma vida proliferativa curta, não mais de 15 gerações de células, diferenciando-se terminalmente. O meroclone contém uma mistura de células com diferentes potenciais de crescimento, sendo um estágio de transição entre o holoclone e o paraclone. A incidência dos diferentes tipos clonais é afetada pelo envelhecimento, uma vez que as células originárias da epiderme de doadores idosos dão origem a uma menor proporção de holoclones e uma maior proporção de paraclones.

HSU, LI, FUCHS (2014) aproveitaram-se dos avanços nas ferramentas genéticas e de imagem da pele para ilustrar a histologia da pele com suas diferentes populações celulares e a interação entre as CT e seus nichos para oferecer novos caminhos à terapêutica e medicina regenerativa. A epiderme é uma estrutura estratificada composta por quatro camadas de queratinócitos: basal, espinosa, granular e estrato córneo. As CT adultas residem em nichos espacialmente distintos na camada basal, onde há uma comunicação recíproca entre as CT e seus nichos. As CT adultas da epiderme expressam queratinas K5 e K14, são auto-renováveis, dão origem a outras células proliferativas da própria camada e, posteriormente, a células não proliferativas da camada espinhosa, da granular, as quais expressam K1, K10 e involucrina, e da camada de células mortas do estrato

córneo. As CT aderem-se a uma membrana basal subjacente, rica em laminina-5, por meio de integrinas $\alpha3\beta1$ e $\alpha6\beta4$. Fatores de crescimento secretados pelos fibroblastos dérmicos, como FGF7, FGF10, IGF, ligantes de EGFR e TNFalfa, estimulam a proliferação de células epidérmicas basais.

4. MÉTODO

4. MÉTODO

4.1 Desenho de pesquisa

Trata-se de um estudo primário, intervencional, experimental, *in vitro*, analítico, controlado, realizado em centro único.

A fim de contemplar os aspectos éticos, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), sendo aprovado em 05/04/2013 sob parecer número 238.354 (Apêndice I).

4.2 Amostra

Para o presente estudo, foram utilizados queratinócitos humanos primários, provenientes de fragmentos de pele de 10 pacientes queimados, para o grupo queimadura (GQ), e de 10 pacientes hígidos submetidos à mamoplastia redutora, para o grupo controle (GC).

A média de idade e sexo dos pacientes que participaram deste estudo está descrita na Tabela 1. A média da SCQ do GQ foi de 36,4% \pm 9,09.

Tabela 1 – Idade e sexo dos pacientes, por grupo.

Grupo	n³	Idade ± DP (anos)	Sexo
GC ¹	10	39,5 ± 12,7	10 F ⁴
GQ ²	10	35,9 ± 11,06	6 F e 4 M ⁵

¹GC: grupo controle; ²GQ: grupo queimadura; ³n: número de pacientes; ⁴F: feminino; ⁵M: masculino.

Todos os pacientes incluídos neste estudo concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.3 Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão para o GQ foram ambos os sexos, idade acima de 18 anos, estar internado na Unidade de Tratamento de Queimaduras (UTQ) da Disciplina de Cirurgia Plástica (DCP) da UNIFESP, com necessidade de procedimento operatório, apresentando de 25 a 50% da SCQ ou com necessidade de 10% de enxertia. Os critérios de inclusão para o GC foram idade acima de 18 anos, hígidos, submetidos à mamoplastia redutora pela DCP da UNIFESP.

Os critérios de não inclusão para ambos os grupos foram apresentar doença prévia de pele, lesão superficial (psoríase ou similares), processo infeccioso ou doença clínica que interferisse diretamente com o processo de cicatrização de feridas (colagenoses, como lúpus eritematoso, esclerodermia, dermatopolimiosite e doença mista do tecido conjuntivo).

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram contaminação de garrafas de cultura, baixa taxa de proliferação celular, menor que 80% de confluência, quantidade insuficiente de RNA extraído que impedisse a avaliação dos dados do paciente e perda do material extraído. Para qualquer perda, haveria reposição.

4.4 Cálculo amostral

A técnica de amostragem utilizada foi do tipo não-probabilística por conveniência (ELFIL & NEGIDA, 2017). No presente estudo, foram incluídos 20 pacientes, sendo 10 por grupo, e todos os experimentos realizados em triplicata.

4.5 Delineamento da pesquisa

Foram obtidos fragmentos de pele provenientes de 20 pacientes, sendo 10 pacientes queimados (GQ) e 10 de pacientes hígidos (GC). Na sequência, foram isolados e cultivados os queratinócitos de cada paciente, sendo que o cultivo primário em uma garrafa foi passado para duas novas garrafas ao atingir 80% de confluência, e assim sucessivamente para a expansão do número de células de cada paciente até a terceira passagem. Então, o KGF foi adicionado ao meio de cultura de dois dos quatro subgrupos a serem formados. Os grupos designados ao tratamento com KGF (+) tornaram-se GQ+ e GC+, enquanto os outros 2 subgrupos não designados ao tratamento receberam apenas o meio de cultura sem KGF (-), tornando-se GQ- e GC-. Após 48h, foram obtidas as subpopulações de

células-tronco (CT) e células não-tronco (CNT) de queratinócitos de cada paciente pelo método Aldefluor® modificado (NORONHA *et al.*, 2017). Finalmente, formaram-se oito subgrupos: CT (GQ+, GQ-, GC+, GC-) e CNT (GQ+, GQ-, GC+, GC-).

Na sequência, foi realizada a extração, purificação e quantificação de RNA dos queratinócitos de cada garrafa. Para a otimização de tempo e recursos, foi realizado em pool de RNA por subgrupo. Dessa forma, o RNA das CT de todos pacientes do grupo queimadura que foram tratadas com KGF (CTGQ+) ficaram reunidas em um único mini-frasco, fazendo o mesmo com os outros sete subgrupos.

Uma vez obtido o pool, foi feita a conversão do RNA em cDNA em cada um dos oito subgrupos para a distribuição dessa solução em duas placas, sendo uma de 84 genes mediadores da cicatrização e outra de 84 genes mediadores da resposta imune, para análise da expressão gênica no RT-qPCR Array. Essa análise foi feita em triplicata por subgrupo, totalizando 48 análises no RT-qPCR Array. O delineamento da pesquisa segue abaixo no Quadro 1.

Conforme o recomendado, o *Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments* (MIQE) Guidelines foi utilizado para descrever as informações mínimas necessárias para avaliar experimentos de qPCR e promover a consistência entre laboratórios (BUSTIN *et al.*, 2009).

Quadro 1 – Delineamento da pesquisa.							
10 PACIENTES QUEIMADOS (25-50% SCQ)				10 PACIENTES HÍGIDOS (MAMOPLASTIA)			
CULTURA DE QUERATINÓCITOS GRUPO QUEIMADURA (GQ): 10 GARRAFAS				CULTURA DE QUERATINÓCITOS GRUPO CONTROLE (GC): 10 GARRAFAS			
3ª passagem: Adição de 40ng de KGF em metade da cultura (+ / -)							
10 GARRAFAS GQ +		10 GARRAFAS GQ -		10 GARRAFAS GC +		10 GARRAFAS GC -	
Separação de células-tronco (CT) e células não-tronco (CNT)							
GQCT+ (10)	GQCNT+ (10)	GQCT- (10)	GQCNT- (10)	GCCT+ (10)	GCCNT+ (10)	GCCT- (10)	GCCNT- (10)
Extração do RNA de cada paciente							
Pool de RNA por subgrupo							
GQCT+	GQCNT+	GQCT-	GQCNT-	GCCT+	CCNT+	GCCT-	GCCNT-
Análise da expressão gênica da CICATRIZAÇÃO por RT-qPCR Array (em triplicata) * Expressão gênica relativa * por comparações entre todos os grupos							
Análise da expressão gênica da IMUNIDADE por RT-qPCR Array (em triplicata) * Expressão gênica relativa * por comparações entre todos os grupos							

4.6 Procedimentos

A coleta dos fragmentos de pele de pacientes queimados foi realizada na UTQ da DCP da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), localizada no Hospital Universitário (HU) – Hospital São Paulo (HSP). A coleta de fragmentos de pele de pacientes hígidos foi realizada no mesmo hospital.

O experimento *in vitro* foi realizado no Laboratório de Cirurgia Translacional (LCT) da DCP da UNIFESP, localizado no Edifício

Acadêmico Prof. Dr. Horácio Kneese de Mello (Edifício de Pesquisa I), na Rua Pedro de Toledo, 781, 4º andar (fundos), Vila Clementino, São Paulo/SP.

4.7 Preparo do meio de cultura de queratinócitos

O meio de cultura de queratinócitos é constituído de 750 mL de DMEM com 250 mL de meio Ham's F-12 (Gibco, Grand Island, EUA), totalizando 1 L, suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Hyclone, Logan, EUA) e 24 mg de adenina (6-aminopurine hydrochloride) (Sigma, St. Louis, USA) diluída em 20 mL da solução de DMEM/ Ham's F-12, resultando em uma concentração de $1,8 \times 10^{-4}$ mol/L. Adicionou-se ainda 1mL de toxina colérica (*Vibrio cholerae*, Type Inaba 569 B) 10^{-10} mol/L (Gibco, Grand Island, EUA), 2 mL de penicilina/estreptomicina (100 UI/mL, 100µg/mL), 2mL de de hidrocortisona 0,4ug/mL (Sigma, St. Louis, USA), 1mL de transferrina/triiodo-L-thionine 2×10^{-9} mol/L (Sigma, St. Louis, USA) e 1,3 mL de insulina (porcina) 5 µg/mL (Sigma, St. Louis, USA), obtendo concentração final 5 µg/mL do meio de queratinócitos.

O pH final foi ajustado para 7,4, com solução de bicarbonato de sódio 100 mg/mL (Sigma, St. Louis, USA) ou com ácido clorídrico 1 M (Sigma, St. Louis, USA), esterilizado com um filtro 0,22 µm e mantido a 4°C. O meio apresenta coloração avermelhada e a mudança de cor define mudança de pH.

4.8 Preparo da camada sustentadora

A cultura de queratinócitos foi realizada sobre uma cultura prévia de fibroblastos de ratos da linhagem 3T3-J2 (ATCC, Nova Iorque, EUA). Os fibroblastos serviram de camada sustentadora para a cultura de queratinócitos, os quais produziram fatores de crescimento vitais para a proliferação de queratinócitos.

A cultura de fibroblastos com 1×10^6 células foi preparada no dia anterior, com meio de cultura de fibroblastos, composto por DMEM com 10% de FBS, e acondicionada em garrafa de cultura de 75cm². Estas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de gás carbônico (CO₂) para confluência de 50%. Na manhã do isolamento dos queratinócitos, o meio de cultura de fibroblastos foi retirado da garrafa de cultura de 3T3-J2 e foi adicionado mitomicina 0,5 mg/mL (Sigma, St. Louis, USA) para cessar a proliferação dos fibroblastos. Após duas horas, a mitomicina foi retirada e a garrafa foi lavada duas vezes com PBS cuidadosamente. O meio de cultura de queratinócitos foi, então, adicionado à garrafa com fibroblastos.

4.9 Obtenção da amostra

Fragmentos de pele estéreis, medindo cerca de 1 cm², foram obtidos de cada paciente por um cirurgião plástico durante o procedimento operatório padrão, tanto no desbridamento ou excisão cirúrgica para o tratamento da queimadura, quanto na mamoplastia redutora. Para padronização das amostras, os fragmentos de pele dos pacientes queimados

foram provenientes do tórax ou abdome, acima da cicatriz umbilical (RINN *et al.*, 2006).

O desbridamento cirúrgico de queimaduras (Figura 1) de 2º grau profundo e de 3º grau é realizado, geralmente, após três dias decorridos do trauma. Durante o desbridamento cirúrgico, parte da pele com vitalidade acaba sendo retirada nas adjacências da necrose, pois os limites da queimadura são irregulares e o instrumento utilizado para a excisão, a faca de Blair, é retilíneo e impreciso. Assim, esses fragmentos de pele com vitalidade foram coletados para a obtenção dos queratinócitos do GQ. Para a obtenção dos queratinócitos do GC, foram coletados fragmentos de pele que seriam descartados em mamoplastia redutora.



Figura 1 – Desbridamento da necrose em queimadura (à esquerda) e fragmentos de pele (à direita).

As amostras obtidas foram imediatamente imersas em um tubo Falcon de 50 mL contendo 30 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC, New York, EUA), suplementado com 100 UI/mL de penicilina (Gibco, Grand Island, EUA) e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA) para o transporte ao LCT da DCP da

UNIFESP, sendo mantido em geladeira a 4°C para manipulação em até seis horas subsequentes.

4.10 Isolamento da epiderme

A limpeza dos fragmentos de pele foi realizada sob fluxo laminar, para manter o ambiente estéril, mergulhando-os em oito tubos consecutivos, contendo 30 mL de solução tampão fosfato-salino modificado (Dulbecco's PBS, sem cloridrato de cálcio e magnésio) (Sigma, St. Louis, USA), suplementado com 100 UI/mL de penicilina e de 100 µg/mL estreptomicina, agitando vigorosamente cada tubo por 45 segundos para remover sangue e outras impurezas existentes.

Para dissociar a epiderme da derme, os fragmentos de pele foram segmentados em 0,5 cm x 0,5 cm e acondicionados em tubo Falcon contendo 20 mL de dispase II em meio DMEM (0,6 – 2,4 U/mL) (04942078001 - Roche, Indianapolis, USA; ATCC, New York, NY, EUA).

Após 18 horas, os fragmentos foram pinçados e lavados uma única vez com 30 mL de Versene (15040-066) (Gibco, Grand Island, EUA) para neutralizar a dispase. Em seguida, foram colocados em placa de Petri de 100 mm² para separar manualmente a epiderme da derme, utilizando duas pinças e tração em sentidos opostos. A epiderme apresenta uma coloração mais acinzentada, enquanto que a derme apresenta uma coloração rósea.

4.11 Cultura de queratinócitos

A cultura de queratinócitos humanos primários foi realizada no LCT-DCP-UNIFESP, seguindo o protocolo definido por GREEN, KEHINDE, THOMAS (1979) e GREEN (1991).

Para obtenção dos queratinócitos, a epiderme foi acondicionada em um tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de solução de tripsina 0,1% (Gibco, Grand Island, EUA) e EDTA 0,04% (Gibco, Grand Island, EUA) que foi incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 10 minutos. Em seguida, os fragmentos maiores foram retirados e colocados em um segundo tubo Falcon de 15 mL contendo 5 mL de solução de tripsina a 0,25%, sendo incubado novamente, da mesma forma, para se obter mais queratinócitos.

Enquanto o segundo tubo estava sendo incubado, foi adicionado ao primeiro tubo, que continha células soltas em solução de PBS e tripsina, o meio de queratinócito para neutralizar a tripsina. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 800 rpm por cinco minutos para a obtenção do botão de queratinócitos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o botão em meio de queratinócitos. Em seguida, essa suspensão de células foi semeada na garrafa de cultura previamente preparada com fibroblastos 3T3-J2, sendo incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 10 minutos. O mesmo procedimento foi feito com o segundo tubo.

Após 24 horas, os queratinócitos aderiram à garrafa e o meio de cultura foi trocado para meio de queratinócitos com fator de crescimento epidermal (EGF) 1ηL/mL (Sigma, St. Louis, USA) para estimular a proliferação e migração dos queratinocitos na garrafa. Durante o cultivo, as garrafas foram acondicionadas em incubadora úmida a 37°C com 5% de

CO₂. As trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 48 horas, utilizando 10 mL de meio de cultura de queratinócitos com EGF em cada garrafa de 75 cm². Quando a confluência atingia 80% (Figura 2), entre 10 a 12 dias de cultivo, era realizada a passagem dos queratinócitos para uma nova garrafa.

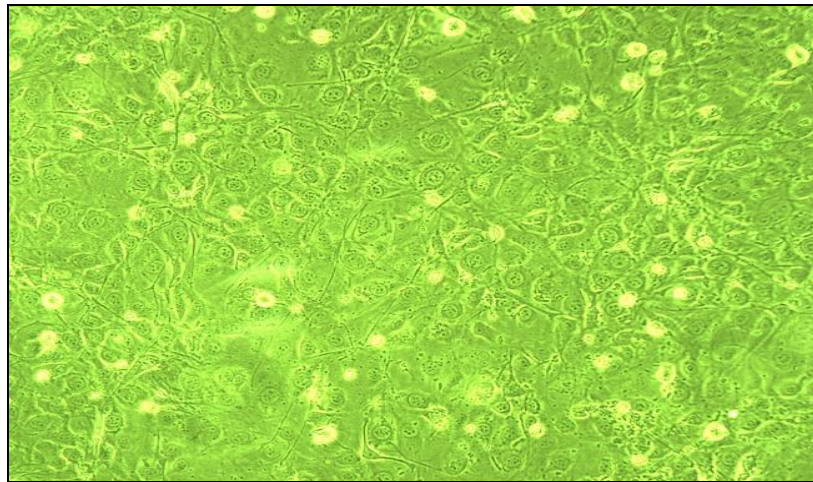


Figura 2 – Cultura de queratinócitos (GC) com 80% de confluência.

4.12 Suplementação com KGF

Na terceira passagem, uma das garrafas de cada paciente recebeu 15 mL de meio de cultura de queratinócitos, sem EGF, suplementado com 40 ng/mL de KGF (Sigma, St. Louis, USA) (pH 7,4), baseado em estudo prévio no LCT-UNIFESP, obtendo-se assim GQ⁺ ou GC⁺. A outra garrafa do mesmo paciente recebeu apenas o meio de cultura de queratinócitos, sem EGF e sem KGF, obtendo-se assim o GQ⁻ ou GC⁻. A ausência do EGF na terceira passagem garantiu sinalização exclusiva do KGF antes da análise da expressão gênica (SOBRAL *et al.*, 2007).

Após a suplementação com KGF, as garrafas foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 48h, até ser atingida a sub-confluência de 80%. Na sequência, as células foram destacadas da garrafa e, por citometria de fluxo, foram separadas as populações de CT e CNT.

4.13 Separação das populações de CT e CNT

A obtenção de CT de queratinócitos da pele de pacientes queimados foi por meio de um protocolo com ALDEFLUOR™ (Stem Cell Technologies, Durham, USA) e DEAB, desenvolvido em estudo anterior no LCT da UNIFESP (NORONHA *et al.*, 2017). Esse protocolo foi utilizado para a obtenção de CT dos subgrupos GQ+, GQ-, GC+, GC-, formando-se assim oito subgrupos, sendo 4 subgrupos por paciente queimado, CTGQ+, CTGQ-, CNTGQ+, CNTGQ-, e 4 subgrupos por pacientes hígido, CTGC+, CTGC-, CNTGC+ e CNTGC-.

O sistema de reagente ALDEFLUOR™ é um método não imunológico para identificação de CT, ou progenitoras, com base na atividade da aldeído-desidrogenase (ALDH). Elevada expressão de ALDH é relatada em diversas linhagens celulares precursoras normais e linhagens cancerígenas, incluindo células hematopoiéticas, mamárias, endoteliais, mesenquimais e neurais. Quando expressas, são classificadas como fluorescentes brilhantes (ALDHbr) e podem ser identificadas num citometro de fluxo por cell sorter para purificação e caracterização (STORMS *et al.*, 1999).

O efluxo ativo do produto da reação é inibido por um inibidor de efluxo no tampão de ensaio ALDEFLUOR™. Um inibidor específico da

ALDH, dietilaminobenzaldeído (DEAB), é usado para controlar a fluorescência de fundo. O ALDEFLUOR™ é otimizado para a detecção de células hematopoiéticas ALDHbr no sangue e medula óssea humanas, mas também pode ser usado com células não hematopoiéticas (VASSALLI, 2019).

Na sequência, foram realizadas 12 análises seguindo as instruções do ALDEFLUOR™ Kit (Stem Cell Technologies, WA, USA), utilizando duas concentrações de células (1 x 10⁵ e 1 x 10⁶ células), três tempos de incubação a 37° C (15, 30 e 60 minutos) e duas soluções para extração (1.5µL ALDEFLUOR™ e 1.5µL ALDEFLUOR™ + 15 µL N, N-Dimetilaminobenzaldeído (DEAB)). A contagem de CT foi realizada por meio de citômetro de fluxo BD FACSAria® II (BD Biosciences, US). O melhor resultado foi obtido utilizando 1 x 10⁶ células, com 1.5µL de solução de ALDEFLUOR™ + 15 µL DEAB, durante 15 minutos. A taxa média de obtenção de CT de queratinócitos foi de 10,8% (NORONHA et al., 2017).

4.14 Extração, purificação e quantificação de RNA total

Após obtenção das 8 subpopulações de queratinócitos, as células foram submetidas à extração de RNA total. O RNA total foi extraído dos queratinócitos utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Foster City, EUA) e purificado utilizando o kit de membrana de sílica ArrayGrade® Total RNA Isolation (SABioscience Corporation), que filtra e retém o RNA durante a centrifugação, permitindo maior rendimento e pureza. O tampão

utilizado estabiliza o RNA e previne sua degradação, ajudando a reter o RNA na coluna de centrifugação.

Após dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas, a separação de fase foi obtida com clorofórmio (Sigma, St. Louis, USA) e centrifugação, a 10.000 rpm por cinco minutos. O RNA precipitado a partir da fase aquosa da solução foi lavado com etanol a 75%, seco e dissolvido em água livre de RNase. O RNA total foi, em seguida, purificado com RNeasy MiniKit (Qiagen, Valencia, EUA) e submetidos a tratamento com DNase.

A quantidade e a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas por espectrofotometria NanoVue Plus GE (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EUA) (Figura 3).



Figura 3 – Quantificação de RNA total por meio de NanoVue[®] Plus GE

4.15 Obtenção do *pool* de RNA, por subgrupo

Uma vez obtido o RNA dos queratinócitos, CT e CNT separadamente, de cada paciente, foi feito um *pool* por subgrupo para

otimizar tempo e recursos. Dessa forma, cada um dos oito subgrupos (CTGQ+, CTGQ-, CNTGQ+, CNTGQ- e CTGC+, CTGC-, CNTGC+, CNTGC-) passou a ter o RNA dos 10 pacientes queimados e dos 10 pacientes hígidos reunidos nos respectivos subgrupos, resultando em 8 tubos com o material genético dos 20 pacientes (4 tubos GQ, n=10; 4 tubos GC, n=10).

4.16 Conversão do RNA total em cDNA e análise da expressão gênica por RT-qPCR Array

A reação em cadeia de polimerase baseada na fluorescência (qPCR) é um método de análise molecular, capaz de detectar e quantificar DNA, mesmo em baixas concentrações. A transcrição reversa combinada à qPCR (RT-qPCR) é um método analítico semelhante, capaz de quantificar a expressão gênica a partir de RNA, que é convertido em DNA complementar (cDNA), o qual foi realizado neste estudo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Foi utilizado 1 µg de RNA total, por subgrupo, para cada uma das 48 placas analisadas no RT-qPCR *Array*. Os dois modelos de placas utilizadas foram a PAHS-121Z (Quadro 2), que contém 84 genes relacionados à cicatrização, e a PAHS-052Z (Quadro 3), que contém 84 genes relacionados à resposta imune. Ambas podem ser visualizadas em: <https://www.qiagen.com/us/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/two-step-qrt-pcr/rt2-profiler-pcr-arrays/#orderinginformation>.

Quadro 2 – RT² Profiler™ PCR Array Human Wound Healing (PAHS-121Z) (Qiagen, Maryland, EUA)

1. EXTRACELLULAR MATRIX & CELL ADHESION

- ECM Components: COL14A1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1, COL4A3, COL5A1, COL5A2, COL5A3, VTN
- Remodeling Enzymes: CTSG, CTSK, CTSL2, F13A1, F3 (Tissue Factor), FGA (Fibrinogen), MMP1, MMP2, MMP7, MMP9, PLAT (tPA), PLAU (uPA), PLAUR (uPAR), PLG, SERPINE1 (PAI-1), TIMP1
- Cellular Adhesion: CDH1 (E-cadherin), ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB5, ITGB6
- Cytoskeleton: ACTA2 (a-SMA), ACTC1, RAC1, RHOA, TAGLN

2. INFLAMMATORY CYTOKINES & CHEMOKINES

- CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-3), CD40LG (TNFSF5), CXCL1, CXCL11 (ITAC/IP-9), CXCL2, CXCL5 (ENA-78/LIX), IFNG, IL10, IL1B, IL2, IL4, IL6

3. GROWTH FACTORS

- ANGPT1, CSF2 (GM-CSF), CSF3 (GCSF), CTGF, EGF, FGF10, FGF2, FGF7, HBEGF (DTR), HGF, IGF1, MIF, PDGFA, TGFA, TGFB1, TNF, VEGFA

4. SIGNAL TRANSDUCTION

- TGFβ: TGFB1, TGFB3, STAT3
- WNT: CTNNB1, WISP1, WNT5A
- Phosphorylation: MAPK1 (ERK2), MAPK3 (ERK1), PTEN
- Receptors: EGFR, IL6ST (GP130)
- Other: PTGS2

Quadro 3 – RT² Profiler™ PCR Array Human Innate & Adaptive Immune Responses (PAHS-52ZA) (Qiagen, Maryland, EUA)

1. INNATE IMMUNITY

- Pattern Recognition Receptors (PPRs): DDX58 (RIG-I), NLRP3, NOD1 (CARD4), NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9.
- Cytokines: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNB1, IL18, IL1A, IL1B, IL2, CXCL8, TNF.
- Other Innate Immunity Genes: APCS, C3, CASP1 (ICE), CD14, CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, HLA-A, HLA-E, IL1R1, IRAK1, IRF3, IRF7, ITGAM, LY96 (MD-2), LYZ, MAPK1 (ERK2), MAPK8 (JNK1), MBL2, MPO, MX1, MYD88, NFKB1, NFKBIA (I κ B α , MAD3), STAT1, TICAM1 (TRIF), TRAF6.

2. ADAPTIVE IMMUNITY

- Th1 Markers & Immune Response: CCR5, CD80, CXCR3, IFNG, IL18, IL23A, SLC11A1, STAT4, TBX21, TLR4, TLR6.
- Th2 Markers & Immune Response: CCR4, CCR8, CD86, GATA3, IFNB1, IL10, IL13, IL18, IL4, IL5, IL6, NOD2, STAT6.
- Th17 Markers: CCR6, IL17A, RORC, STAT3.
- Treg Markers: CCR4, CCR8, FOXP3, IL10.
- T-Cell Activation: CD80, CD86, ICAM1, IFNG, IL23A, IL6, SLC11A1.
- Cytokines: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNG, IL10, IL13, IL17A, IL18, IL2, IL23A, IL4, IL5, IL6, CXCL8, TNF.
- Other Adaptive Immunity Genes: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG (TNFSF5), CD8A, CRP, FASLG (TNFSF6), HLA-A, IFNAR1, IFNGR1, IL1B, IL1R1, IRF3, IRF7, ITGAM, JAK2, MAPK8 (JNK1), MBL2, MX1, NFKB1, RAG1, STAT1.

3. HUMORAL IMMUNITY

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

4. INFLAMMATORY RESPONSE

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

5. DEFENSE RESPONSE TO BACTERIA

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

6. DEFENSE RESPONSE TO VIRUSES

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

Inicialmente, cada solução de 1µg de RNA total foi tratada com RT² First Strand[®] (SABioscience Corporation), conforme protocolo da Qiagen (Valencia, EUA), para que o DNA genômico fosse completamente eliminado, mantendo apenas o RNA total. Em seguida, foi utilizado o RT² Profiler[®] PCRarray (SABioscience Corporation), que contém uma placa com 96 poços, contendo em cada poço nucleotídeos de DNA tri-fosfatados, *primers*, que são sequências iniciais para a polimerização de DNA, e DNA polimerase para a amplificação gênica cíclica e obtenção de DNA complementar (cDNA) (BUSTIN *et al.*, 2009; SANDERS *et al.*, 2014).

O termociclador, que compõe o RT-qPCR, utiliza como molde inicial a molécula de RNA e, por transcrição reversa, gera cDNA. Os valores da fluorescência do cDNA gravados durante cada ciclo, resultam em um gráfico sigmoide, permitindo a análise da expressão gênica (BUSTIN *et al.*, 2009; SANDERS *et al.*, 2014).

A tecnologia de RT-qPCR permite dois tipos de quantificação gênica: absoluta e relativa. A quantificação gênica absoluta determina o número de cópias transcritas de um gene de interesse. Já a quantificação gênica relativa descreve a mudança de razão (do inglês, *Fold Regulation - FR*) na expressão do gene de interesse de uma amostra comparada à expressão desse mesmo gene em outra amostra, ou grupo referência. Nesse caso, o grupo referência pode ser um grupo controle ou mesmo uma amostra no tempo zero, em um estudo de curso de tempo (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Dessa forma, a expressão relativa da RT-qPCR correlaciona os valores relevantes C_T através de uma equação matemática, gerando a taxa de expressão gênica relativa por meio do FR entre um grupo de interesse e um grupo referência. Com isso, a mudança de razão pode se mostrar

hiperexpressa, com FR maior que 2,0; hipoexpressa, com FR menor que -2,0; ou ainda sem mudança de razão, com FR entre -2,0 e 2,0 (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; BUSTIN *et al.*, 2009; PAGE & STROMBERG, 2011; SANDERS *et al.*, 2014).

A amplificação, aquisição e análise dos dados foram realizadas por RT-qPCR, no termociclador *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) (Figura 4). As condições dos ciclos térmicos, ou amplificação, foram os seguintes: 30 segundos a 48°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos, desnaturação a 95°C e 60 segundos de anelamento a 60°C. Foram realizadas reações em triplicata para cada grupo para assegurar a significância estatística.

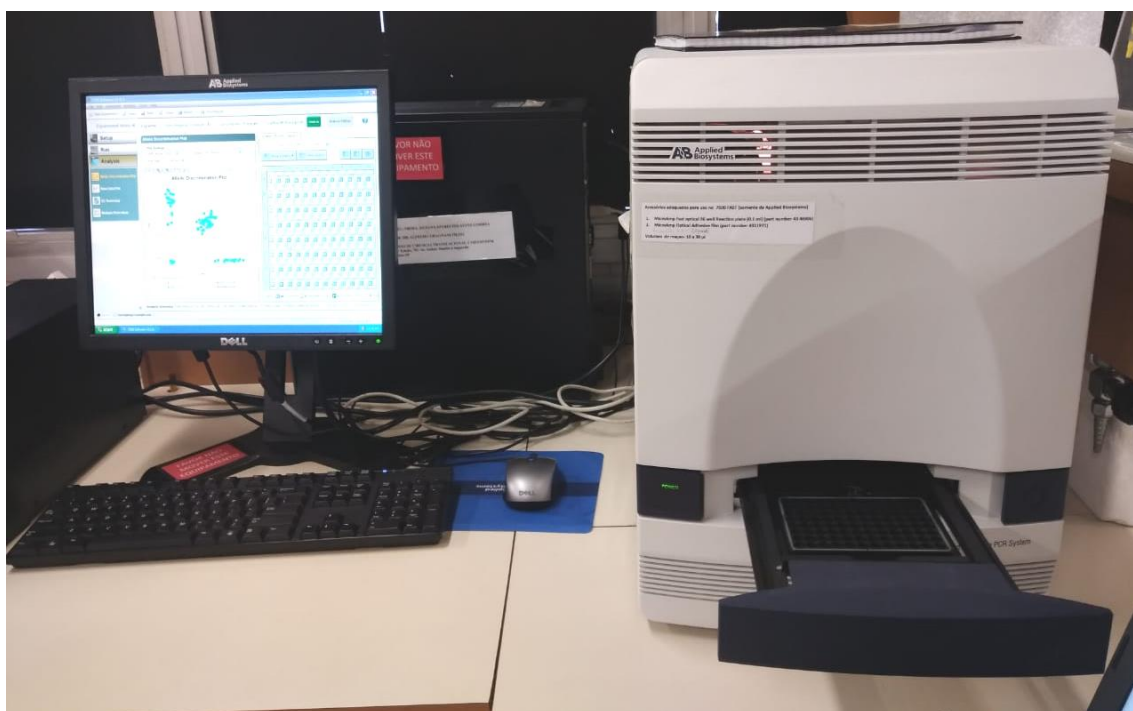


Figura 4 - Termociclador *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems*

Em cada curva, cada gene foi checado para eficiência, limiar máximo e mínimo e curva padrão. Para garantir comparações entre curvas, o mesmo limiar foi estabelecido para todos os genes e corridas. A média do valor C_T foi usada para padronizar a expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) e determinar a diferença entre os grupos.

Os resultados podem ser mostrados de diversas apresentações. Numa delas, no *Heat Map*, ou mapa de calor, apresenta por meio de coloração quais os genes diferencialmente expressos, sendo que a cor verde representa os genes hipoexpressos, a cor vermelha representa os genes hiperexpressos, a cor próxima ao preto mostra os genes sem expressão gênica significativa e a cor cinza representa os genes não expressos. Esse mapa de calor traz informações gerais, e não apenas os genes diferencialmente expressos e estatisticamente significantes.

O *Scatter Plot*, ou gráfico de dispersão, apresenta o valor do *FR* da expressão gênica relativa do grupo analisado em relação ao grupo referencial. A linha central representa a expressão gênica do grupo de referência ou controle, enquanto que os pontos revelam valores do *FR* do grupo em análise. As outras linhas, acima e abaixo da linha central, delimitam *FR* igual a dois, sendo que pontos que ultrapassam a linha superior, que aparecem em verde, representam genes hiperexpressos e pontos que ultrapassam a linha inferior, que aparecem em vermelho, revelam genes hipoexpressos. Os pontos que aparecem dentro das linhas, com *FR* entre 2 e -2, aparecem em colorações próximas ao preto e representam genes sem diferença na expressão gênica relativa.

O conceito de expressão gênica relativa está relacionado com a diferença entre os valores absolutos do *FR* de cada grupo. Dessa forma, em cada análise comparativa, para se obter um resultado relativo, há uma

intenção específica de análise para avaliar uma ou duas variáveis presentes no grupo teste e no grupo referência. Tais intenções estão descritas no Quadro 4, sendo utilizadas tanto para avaliar a expressão dos genes relacionados à cicatrização, quanto à resposta imune, em CT e CNT.

Quadro 4 – Comparações das expressões gênicas relativas.				
Comparação	Grupo Teste	x⁵	Grupo Referência	Intenção da Avaliação
a)	GQ ^{-1,2}	x	GQ+	KGF ⁶
b)	GC ⁻³	x	GC+	KGF
c)	GC ⁺⁴	x	GQ+	Queimadura
d)	GC-	x	GQ-	Queimadura
e)	GC-	x	GQ+	Queimadura e KGF
f)	GC+	x	GQ-	Queimadura e KGF

1- Grupo Queimadura; 2- Sem KGF; 3-Grupo Controle; 4- Com KGF; 5- versus; 6- Fator de Crescimento de Queratinócito

4.17 Análise Estatística

As placas utilizadas nas análises com 84 genes, relacionados à cicatrização ou à resposta imune, continham ainda mais doze genes endógenos de referência para controle interno (do inglês, *housekeeping*), ou seja, para a identificação de variações ao acaso, totalizando os 96 poços.

Para a obtenção dos dados estatísticos, paramétricos e não paramétricos, foi utilizado o programa *RT2 Profiler PCR Array DATA Analysis online* (*SABiosciences Corporation*), disponível em:

(<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Este programa utiliza a derivação da equação $2^{-\Delta\Delta C_T}$, incluindo hipóteses, desenho experimental e testes de validação, descrita no Boletim de Usuário nº 2 da *Applied Biosystems* (P/N4303859). Esse método é uma maneira conveniente de analisar as alterações relativas na expressão gênica de experimentos de RT-qPCR e é amplamente utilizada em estudos de expressão gênica (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Para a análise dos resultados do qPCR *Array*, são considerados relevantes apenas os genes com FR maior que 2 ou menos que -2, com comentários OK ou A, dados pelo sistema após análise, e que indicam confiabilidade. Genes que apresentam comentários B e C não são considerados diferencilmente expressos, mesmo com nível de significância menor que 0,05. O comentário B indica expressão gênica muito elevada, maior que 30 vezes, o que significa que pode haver grandes variações nos resultados obtidos e baixa expressão gênica relativa. Já comentário C significa que a ciclagem não foi determinada ou não foi interpretada, podendo gerar um resultado errôneo. Os resultados de regulação ou expressão diferenciada na análise estatística pelo *software* são mostrados somente se o valor-p é menor que 0,05.

Para a análise de variância (ANOVA), considerou-se o valor-p < 0,05 estatisticamente significante. A ANOVA é uma técnica estatística que compara simultaneamente médias de diferentes populações para verificar se existem diferenças amostrais reais ou casuais, ou seja, diferenças estatisticamente significantes entre essas médias.

5. RESULTADOS

5.RESULTADOS

5.1 Expressão gênica da cicatrização

Abaixo, serão descritas cada uma das 6 comparações que representam as expressões gênicas relativas da cicatrização obtidas por RT-qPCR, em CT e em CNT. As figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da cicatrização estão no Apêndice II.

5.1.1 Células-tronco

a) GQ- *versus* GQ+ (análise do KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos, houve 4 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (CSF3 = 3,46; ITGA6 = 3,35, IGF1 = 3,00 e MAPK1 = 1,97).

b) GC- *versus* GC+ (análise do KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC- *versus* GC+, analisando a suplementação do KGF em CT de queratinócitos, houve 2 genes diferencialmente expressos, sendo um gene hipoexpresso (FGF10 = -2,70) e um gene hiperexpresso (CSF3 = 2,05).

c) GC+ versus GQ+ (análise da queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC+ versus GQ+, de CT de queratinócitos, houve 3 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (CSF3 = 2,64; MMP2 = 2,49 e IGF1 = 2,20).

d) GC- versus GQ- (análise da queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC- versus GQ-, de CT de queratinócitos, não houve gene diferencialmente expresso.

e) GC- versus GQ+ (análise da queimadura e do KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos, houve 9 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (CSF3 = 5,42; TAGLN = 5,21; ITGB3 = 4,81; IL10 = 4,57; ITGA6 = 4,44; IGF1 = 4,38; MMP2 = 2,63; FGF2 = 2,36; MAPK1 = 2,08).

f) GC+ versus GQ- (análise da queimadura e do KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos, houve 1 gene diferencialmente expresso, sendo hipoexpresso (FGF10 = -3,55).

A seguir, o Quadro 5 reúne os genes da cicatrização diferencialmente expressos, em valores de FR, em CT de queratinócitos nas seis comparações avaliadas.

Quadro 5 – Expressão gênica da cicatrização em CT de queratinócitos de pacientes queimados	
CT	Genes diferencialmente expressos
a) GQ- <i>versus</i> GQ+	CSF3 = 3,46 ITGA6 = 3,35 IGF1 = 3,00 MAPK1 = 1,97
b) GC- <i>versus</i> GC+	CSF3 = 2,05 FGF10 = -2,70
c) GC+ <i>versus</i> GQ+	CSF3 = 2,64 MMP2 = 2,49 IGF1 = 2,20
d) GC- <i>versus</i> GQ-	Zero
e) GC- <i>versus</i> GQ+	CSF3 = 5,42 TAGLN = 5,21 ITGB3 = 4,81 IL10 = 4,57 ITGA6 = 4,44 IGF1 = 4,38 MMP2 = 2,63 FGF2 = 2,36 MAPK1 = 2,08
f) GC+ <i>versus</i> GQ-	FGF10 = -3,55

5.1.2 Células não-tronco

a) GQ- *versus* GQ+ (análise de KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos, houve 3 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (CSF3 = 3,46 e ITGA6 = 3,35; IGF1 = 3,00).

b) GC- versus GC+ (análise de KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC- versus GC+, de CNT de queratinócitos, houve 4 genes diferencialmente expressos, todos hipoexpressos (CTNNB1 = -2,22; SERPINE1 = -3,44; FGF2 = -3,74 e IL10 = -4,53).

c) GC+ versus GQ+ (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC+ versus GQ+, de CNT de queratinócitos, houve 3 genes diferencialmente expressos, sendo 1 hipoexpresso (COL1A1 = -2,82) e 2 hiperexpressos (ITGA6 = 4,35 e PLG = 3,32).

d) GC- versus GQ- (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC- versus GQ-, de CNT de queratinócitos, houve 1 gene diferencialmente expresso, mostrando-se hipoexpresso (COL1A1 = -2,28).

e) GC+ versus GQ- (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da cicatrização de GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos, houve 1 gene diferencialmente expresso, mostrando-se hipoexpresso (FGF10 = -3,55).

f) GC- versus GQ+ (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa de GC- versus GQ+, de CNT de queratinócitos, não houve gene diferencialmente expresso.

A seguir, o Quadro 6 reúne os genes da cicatrização diferencialmente expressos, em valores de FR, em CT de queratinócitos nas seis comparações avaliadas.

Quadro 6 – Expressão gênica da cicatrização em CNT de queratinócitos de pacientes queimados.	
CNT	Genes diferencialmente expressos (FR)
a) GQ- <i>versus</i> GQ+	CSF3 = 3,46 ITGA6 = 3,35 IGF1 = 3,00
b) GC- <i>versus</i> GC+	CTNNB1 = -2,22 SERPINE1 = -3,44 FGF2 = -3,74 IL10 = -4,53
c) GC+ <i>versus</i> GQ+	ITGA6 = 4,35 PLG = 3,32 COL1A1 = -2,82
d) GC- <i>versus</i> GQ-	COL1A1 = -2,28
e) GC- <i>versus</i> GQ+	Zero
f) GC+ <i>versus</i> GQ-	FGF10 = -3,55

A seguir, a Figura 5 reúne todos os genes da cicatrização diferencialmente expressos em CT e CNT, bem como quantas vezes se mostraram diferencialmente expressos nas expressões gênicas relativas analisadas.

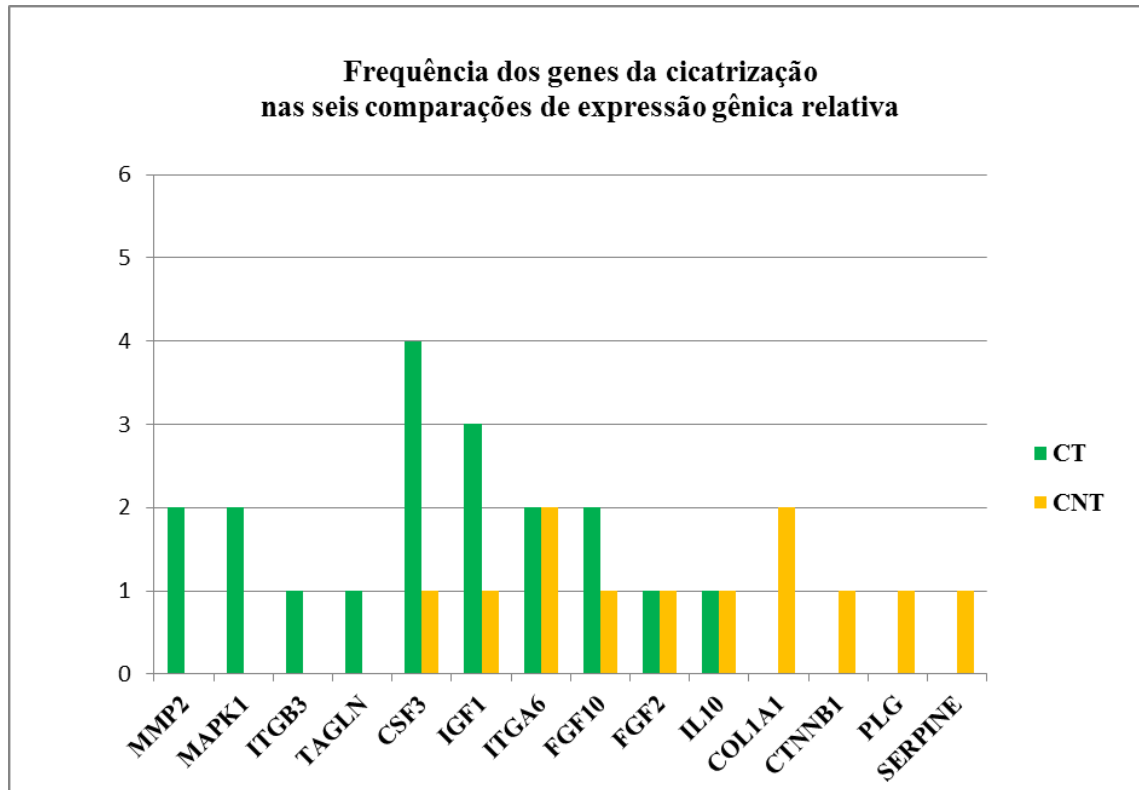


Figura 5 – Frequência dos genes da cicatrização nas seis comparações de expressão gênica relativa. Dez genes mostraram-se diferencialmente expressos em CT e 10 em CNT, sendo 6 genes comuns entre CT e CNT (CSF3, IGF1, ITGA6, FGF10, FGF2 e IL10).

5.2 Expressão gênica da resposta imune

Abaixo, serão descritas cada uma das 6 comparações que representam as expressões gênicas relativas à resposta imune obtidas por RT-qPCR, em CT e em CNT. As figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da resposta imune estão no Apêndice III.

5.2.1 Células-tronco

a) GQ- *versus* GQ+ (análise de KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos, houve 6 genes diferencialmente expressos, mostrando-se hiperexpressos (IL23A = 4,70; RAG1 = 4,66; TLR7 = 4,65; IL17A = 4,62; IL1R1 = 4,36 e MAPK1 = 4,17).

b) GC- *versus* GC+ (análise de KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- *versus* GC+, de CT de queratinócitos, houve 8 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (TLR7 = 2,87; TLR9 = 2,58; CCR5 = 2,36; IL2 = 2,34; TRAF6 = 2,32; IRAK1 = 2,26, MAPK8 = 2,24 e IL5 = 1,95).

c) GC+ *versus* GQ+ (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC+ *versus* GQ+, de CT de queratinócitos, houve 6 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (IL23A = 10,92; RAG1 = 10,84; IL17A = 10,74; TLR9 = 9,81; TLR7 = 8,98 e MAPK1 = 6,65).

d) GC- *versus* GQ- (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- *versus* GQ-, de CT de queratinócitos, houve 8 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (IL1R1 = 5,82; CCR5 = 5,50; IL2 = 5,45;

TRAF6 = 5,40; IRAK1 = 5,25; MAPK8 = 5,21; IL5 = 4,54 e MAPK1 = 2,39).

e) GC- versus GQ+ (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- versus GQ+, de CT de queratinócitos, houve 11 genes diferencialmente expressos, todos hiperexpressos (IL23A = 26,01; RAG1 = 25,83; TLR7 = 25,77; IL17A = 25,60; CCR5 = 25,17; IL2 = 24,96; TRAF6 = 24,75; IRAK1 = 24,03; MAPK8 = 23,86; IL5 = 20,78 e MAPK1 = 9,98).

f) GC+ versus GQ- (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC+ versus GQ-, de CT de queratinócitos, houve 3 genes diferencialmente expressos, ambos hipoexpressos (TLR7 = -1,93, TLR9 = -2,14 e IL1R1 = -2,44).

A seguir, o Quadro 7 reúne os genes da resposta imune diferencialmente expressos, em valores de FR, em CT de queratinócitos nas seis comparações avaliadas.

Quadro 7 – Expressão gênica da resposta imune em CT de queratinócitos de pacientes queimados	
CT	Genes diferencialmente expressos (FR)
GQ- <i>versus</i> GQ+	IL23A = 4,70 RAG1 = 4,66 TLR7 = 4,65 IL17A = 4,62 IL1R1 = 4,36 MAPK1 = 4,17
GC- <i>versus</i> GC+	TLR7 = 2,80 TLR9 = 2,58 CCR5 = 2,36 IL2 = 2,34 TRAF6 = 2,32 IRAK1 = 2,26 MAPK8 = 2,24 IL5 = 1,95
GC+ <i>versus</i> GQ+	IL23A = 10,92 RAG1 = 10,84 IL17A = 10,74 TLR9 = 9,81 TLR7 = 8,98 MAPK1 = 6,65
GC- <i>versus</i> GQ-	IL1R1 = 5,82 CCR5 = 5,50 IL2 = 5,45 TRAF6 = 5,40 IRAK1 = 5,25 MAPK8 = 5,21 IL5 = 4,54 MAPK1 = 2,39

GC- <i>versus</i> GQ+	IL23A = 26,01 RAG1 = 25,83 TLR7 = 25,77 IL17A = 25,60 CCR5 = 25,17 IL2 = 24,96 TRAF6 = 24,75 IRAK1 = 24,03 MAPK8 = 23,86 IL5 = 20,78 MAPK1 = 9,98
GC+ <i>versus</i> GQ-	IL1R1 = -2,44 TLR9 = -2,14 TLR7 = -1,93

5.2.2 Células não-tronco

a) GQ- *versus* GQ+ (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos, houve 3 genes diferencialmente expressos, todos hipoexpressos (CRP = -1,93, TLR9 = -2,52 e IL6 = -2,13).

b) GC- *versus* GC+ (análise do KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- *versus* GC+, de CNT de queratinócitos, houve 2 genes diferencialmente expressos, mostrando-se hipoexpressos (CD80 = -3,31; e CXCL8 = -3,16).

c) GC+ versus GQ+ (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC+ versus GQ+, de CNT de queratinócitos, não houve nenhum gene diferencialmente expresso.

d) GC- versus GQ- (análise de queimadura)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- versus GQ-, de CNT de queratinócitos, não houve nenhum gene diferencialmente expresso.

e) GC- versus GQ+ (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC+ versus GQ-, de CNT de queratinócitos, não houve nenhum gene diferencialmente expresso.

f) GC+ versus GQ- (análise de queimadura e KGF)

Quando realizada a expressão gênica relativa da resposta imune de GC- versus GQ+, de CNT de queratinócitos, houve 4 genes diferencialmente expressos, mostrando-se hipoexpressos (TLR9 = -5,42; CCR4 = -5,12; IL6 = -4,57 e CXCL8 = -4,17).

O Quadro 8, a seguir, reúne todos achados da expressão gênica da resposta imune em CNT de queratinócitos do GQ e do GC, na presença ou não de KGF.

Quadro 8 – Expressão gênica da resposta imune em CNT de queratinócitos de pacientes queimados	
CNT	Genes diferencialmente expressos
a) GQ- <i>versus</i> GQ+	TLR9 = -2,52 IL6 = -2,13 CRP = -1,93
b) GC- <i>versus</i> GC+	CD80 = -3,31 CXCL8 = -3,16
c) GC+ <i>versus</i> GQ+	Zero
d) GC- <i>versus</i> GQ-	Zero
e) GC- <i>versus</i> GQ+	Zero
f) GC+ <i>versus</i> GQ-	TLR9 = -5,42 CCR4 = -5,12 IL6 = -4,57 CXCL8 = -4,17

A seguir, a Figura 6 reúne todos os genes da resposta imune diferencialmente expressos em CT e CNT, bem como quantas vezes se mostraram diferencialmente expressos nas expressões gênicas relativas analisadas.

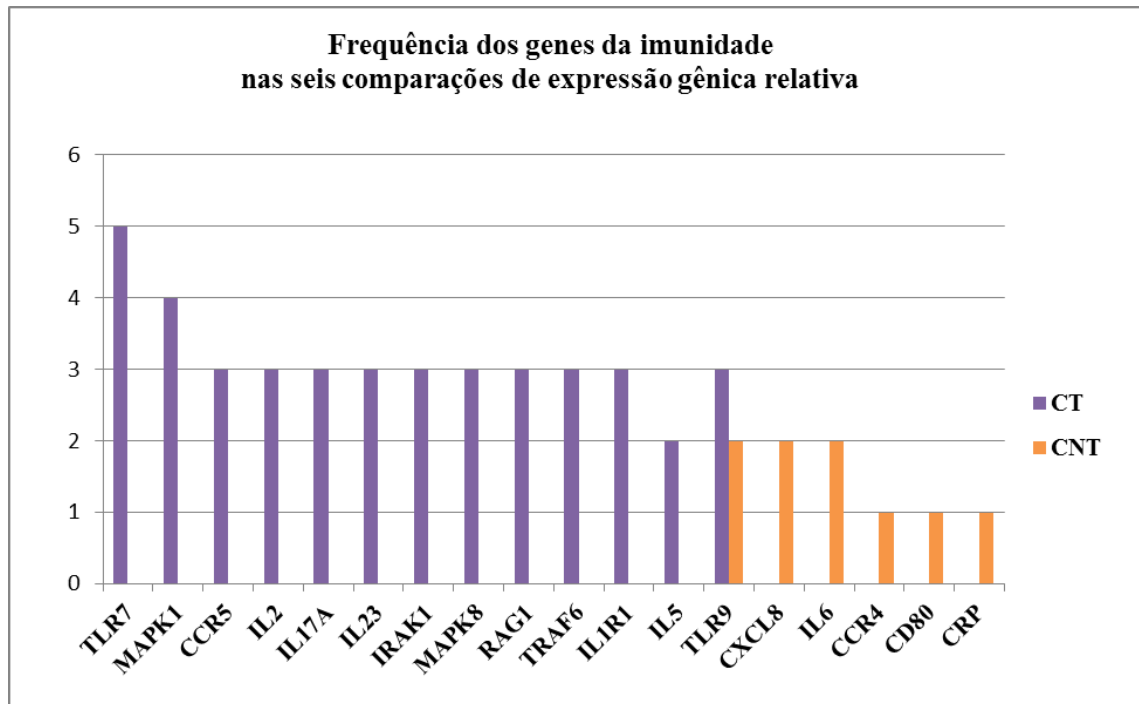


Figura 6 – Frequência dos genes da resposta imune nas seis comparações de expressão gênica relativa. Treze genes mostraram-se diferencialmente expressos em CT e 6 em CNT, sendo apenas um gene comum entre CT e CNT (TLR9).

6.DISSCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Este estudo analisou o efeito da suplementação do KGF na expressão gênica da cicatrização e da resposta imune em queratinócitos cultivados, provenientes de pacientes queimados comparados a pacientes hígidos, em CT e CNT de queratinócitos cultivados da epiderme. O KGF foi escolhido por estudos anteriores evidenciarem ação mitogênica, com resultados positivos na cicatrização, bem como alteração positiva em relação à resposta imune, diminuindo a proliferação de microorganismos em modelo experimental de queimadura (SOBRAL *et al.*, 2007; GRAGNANI *et al.*, 2010; DOU *et al.*, 2014; YEN, THAO, THUOC, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; CHOMISKI *et al.*, 2016, PAN *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2019, MUHAMED *et al.*, 2019). A CT de queratinócito foi escolhida pela sua ação primordial na reepitelização de feridas superficiais na queimadura e na cicatrização de feridas profundas (SINGER & CLARK, 1999; BILOUSOVA, CHEN, ROOP, 2011; HSU, LI, FUCHS, 2014; ULUER *et al.*, 2019). Portanto, o efeito do KGF e o comportamento de CT de queratinócitos de pacientes com grande queimadura foram o foco do presente estudo.

Em relação às amostras, não houve perda de amostra ou material processado neste estudo. Para o cálculo amostral, foi procurado o serviço de estatística, sendo que o mesmo não tem ferramentas para indicar esse cálculo, tanto para estudo *in vitro*, como para estudos de Biologia Molecular. Estudos experimentais *in vitro*, em cultura de células e biologia molecular onde o número de variáveis é mínimo, a estatística tem dificuldade em calcular o tamanho da amostra, pois os experimentos baseiam-se em repetições e o resultado obtido nessas repetições pode

definir esse tamanho. Outro fator importante na sua definição é o tipo de pergunta e objetivo do estudo que se tem em foco, pode ser adotado desde um mínimo de três pacientes ou amostra por grupo de estudo e realizada todos os experimentos em triplicata, permitindo ter resultados adequados.

Diferentemente dos estudos clínicos, que necessitam grande número de participantes para ter uma amostra representativa e estatisticamente significativa para gerar um bom nível de evidência, os estudos experimentais *in vitro* permitem que suas hipóteses sejam analisadas com apenas três participantes dependendo da pergunta e do tipo de análise. E, geralmente, sem necessidade de estatística sofisticada, pois seus sistemas experimentais podem ser feitos de formas múltiplas e independentes. Para isso, a evidência do experimento deve ser consistente (VAUX, 2012).

Em relação à cultura de queratinócitos, vale ressaltar que após a terceira passagem, as sinalizações sistêmicas deixam de ser importantes, não havendo outras variáveis além da carga genética e conteúdo celular de cada paciente que foi alterada pelo trauma da queimadura, mostrando uma expressão diferenciada. Passagem é o termo que se refere ao processo do uso da tripsina, ou outra enzima, para terminar a adesão das células proliferativas que crescem aderidas à garrafa, neutralizar essa ação da enzima com meio de cultura com soro fetal bovino e centrifugar para retirar a enzima, contar as células e semear com um número adequado de células ao tamanho da nova garrafa sempre até antes de atingir a confluência máxima de 80%, definindo assim uma linhagem de células desse doador de pele.

Analisando as seis comparações na expressão gênica da cicatrização em CT de queratinócitos de pacientes queimados, 10 (11,9%) dos 84 genes da cicatrização mostraram-se diferencialmente expressos em CT, sendo que

alguns genes se repetiram nas diferentes comparações, totalizando 19 aparições. Os genes mostraram-se majoritariamente hiperexpressos, em 14 das 19 aparições (73,7%). Já em CNT, houve 10 genes da cicatrização diferencialmente expressos em CNT e 12 aparições. Os genes mostraram-se majoritariamente hipoexpressos, em sete das 12 aparições (58,3%). Essa diferença mostra a ação importante das CT quando comparada as células diferenciadas no processo final de cicatrização de feridas na queimadura.

Analisando as seis comparações na expressão gênica da resposta imune e em CT de queratinócitos de pacientes queimados, 13 (15,5%) dos 84 genes da resposta imune mostraram-se diferencialmente expressos em CT, sendo que alguns genes se repetiram nas diferentes comparações, totalizando 41 aparições. Os genes mostraram-se majoritariamente hiperexpressos, em 38 das 41 aparições (92,7%). Já em CNT, houve seis genes da resposta imune diferencialmente expressos em CT e 9 aparições. Todos os genes mostraram-se hipoexpressos. Essa grande diferença mostra que as CT respondem fortemente frente à queimadura, especialmente por efeito do KGF na expressão de diversos genes relacionados à resposta imune.

Estes resultados evidenciam o efeito do KGF em CT, principais responsáveis nos processos de reepitelização de feridas superficiais e de cicatrização de feridas profundas, na expressão gênica da cicatrização e da resposta imune de queratinócitos de pacientes com grande queimadura. Dessa forma, o presente estudo é original, com metodologia não realizada anteriormente na literatura. O modelo mimetiza o provável efeito tópico do KGF em feridas de queimadura, pois o meio de cultura utilizado para a cultura de queratinócitos de pacientes que sofreram grande queimadura foi suplementado com KGF. Esse contato direto do KGF com as células

cultivadas seria como uma formulação tópica com KGF administrado no leito da ferida, circundada por pele hígida.

6.1 Genes relacionados à Cicatrização

A seguir, serão discutidos os 10 genes diferencialmente expressos em CT de acordo com as categorias apresentadas no Quadro 2, uma vez que CT é o foco do presente. As análises em CNT serviram inicialmente de base para comparação e uma primeira análise em relação às CT, mas não serão discutidas. Dos 10 genes mais diferencialmente expressos em CT, quatro são relativos à matriz extracelular e célula de adesão (ITGA6, ITGB3, MMP2 e TAGLN); um é relativo às citocinas inflamatórias e quimiocinas (IL10); quatro são relativos aos fatores de crescimento (CSF3, IGF1, FGF2 e FGF10) e, por fim, um é relativo à transdução de sinal (MAPK1).

6.1.1 Genes relacionados à matriz extracelular e células de adesão

a) ITGA6: Integrina alfa 6 – FR = 3,35 (KGF) e 4,44 (KGF e queimadura)

O produto da proteína ITGA6 é a integrina alfa da cadeia alfa 6. As integrinas são proteínas integrais da superfície celular compostas por uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Sabe-se que as integrinas participam na adesão celular, bem como na sinalização mediada pela superfície celular. Estão presentes especialmente em plaquetas e células epiteliais, atuando na adesão superficial e sinalização. As integrinas desempenham um papel

importante na hematopoiese, facilitando as interações entre células hematopoiéticas e componentes da MEC da medula óssea e tecidos hematopoiéticos. Ainda, o ITGA6 é essencial para a sinalização do IGF1, um fator de crescimento estruturalmente semelhante à insulina e com propriedades anabólicas (PHILLIPS *et al.*, 2018).

As CT do folículo piloso desempenham um papel crucial no processo de reconstrução da pele. Eles não estão envolvidos apenas na construção do epitélio interfolicular, mas também na formação de folículos capilares e outros apêndices cutâneos. Essas células expressam citoqueratina 15 (Krt15), CD200 e integrina A6 (ITGA6), localizam-se no nicho do folículo piloso, na protuberância do folículo, e mantêm um estado de repouso, células de ciclo lento, antes da ativação. Alguns substitutos da pele baseados em CT do folículo piloso foram estudados. No entanto, ainda é um desafio obter CT foliculares puras o suficiente para construir substitutos da pele (ZHOU *et al.*, 2019).

YANG *et al.* (2014) induziram células-tronco pluripotentes (iPSC) à partir de CT epidérmicas que expressam marcadores específicos para folículos capilares CD200 e ITGA6, regulando a via de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGF). Essas células expressavam não apenas genes específicos para as CT dos folículos capilares, mas também possuíam habilidades semelhantes às CT dos folículos capilares: formando um novo epitélio interfolicular e anexos cutâneos, como folículos capilares e glândulas sudoríparas sebáceas. Portanto, essas células são denominadas CT epiteliais foliculogênicas. Devido à proliferação ilimitada das iPSC e ao grande potencial das CT do folículo piloso como CT para substitutos da pele, os EpSCs CD200 + / ITGA6 + derivados do iPSC podem ser CT promissoras para substitutos da pele.

No presente estudo, o ITGA6 mostrou-se hiperexpresso na presença de KGF, com maior valor na presença de KGF e queimadura simultaneamente, corroborando com os achados de YANG *et al.* (2014), PHILLIPS *et al.* (2018) e ZHOU *et al.* (2019).

b) ITGB3: Integrina beta 3 – FR = 4,81 (KGF e queimadura)

O produto da proteína ITGB3 é a cadeia beta integrina beta 3. As integrinas são proteínas integrais da superfície celular compostas por uma cadeia alfa e uma cadeia beta. Uma determinada cadeia pode combinar-se de várias formas, resultando em diferentes integrinas. A integrina beta 3 é encontrada junto com a cadeia alfa IIb nas plaquetas. Sabe-se que as integrinas participam na adesão celular, bem como na sinalização mediada pela superfície celular. O gene ITGB3 fornece instruções para a produção da subunidade beta3 de uma proteína receptora chamada integrina alfaIIb / beta3 (α IIb β 3), encontrada na superfície de plaquetas. A subunidade beta3 se liga (liga) à subunidade alfaIIb, que é produzida a partir do gene ITGA2B, para formar a integrina α IIb β 3. Estima-se que 80.000 a 100.000 cópias da integrina α IIb β 3 estejam presentes na superfície de cada plaqueta.

Durante a formação do coágulo, a integrina α IIb β 3 se liga ao fibrinogênio, participando ativamente da coesão plaquetária para formar um coágulo sanguíneo. Os coágulos sanguíneos protegem o corpo após a lesão, selando os vasos sanguíneos danificados e impedindo mais perdas de sangue. Ainda, pode ligar-se outras proteínas nas plaquetas e no sangue, bem como em proteínas da matriz extracelular para garantir a formação adequada do coágulo e promover a cicatrização (HOOK *et al.*, 2017).

O gene ITGB3 apresentou-se no presente estudo hiperexpresso na comparação do grupo CT entre GC- *versus* GQ+, sendo que nessa comparação, como no gene antecedente, temos o efeito do KGF e a queimadura, variáveis distintas na comparação. Não existindo dados na literatura que relacionem esse gene e queimadura, CT ou KGF, fica como novo dado para confirmação em futuros projetos.

c) MMP2: Metaloproteinase-2 – FR = 2,49 (queimadura)

A colagenase de 72 kDa tipo IV, também conhecida como MMP2 e gelatinase A é uma enzima que em humanos é codificada pelo gene MMP2. O gene MMP2 está localizado no cromossomo 16 na posição 12.2. As proteínas da família de MMP estão envolvidas na quebra da MEC em processos fisiológicos normais, como desenvolvimento embrionário e remodelação tecidual, bem como em processos de doenças, como artrite e metástase. A maioria das MMP é secretada como proteínas inativas, sendo ativadas quando clivadas por proteinases extracelulares. A MMP2 degrada o colágeno tipo I, ativando assim diferentes mecanismos de padronização do VEGF, e o colágeno tipo IV, principal componente estrutural das membranas basais. Também desempenha um papel na regulação da vascularização e na resposta inflamatória.

Inflamação, reepitelização e remodelação tecidual são três etapas essenciais durante a cicatrização de feridas. O processo de reepitelização desempenha o papel mais importante que envolve principalmente a proliferação e migração de queratinócitos. YANG *et al.* (2017) levantaram a hipótese de que a hiperexpressão do miR-155 nas bordas da ferida poderia acelerar a cicatrização da ferida mediada pela migração aprimorada de queratinócitos e evidenciaram uma relação direta entre o miR-155 e a

MMP2. O MiR-155 é um microRNA que desempenha um papel em vários processos fisiológicos e patológicos. O controle molecular exógeno *in vivo* da expressão do miR-155 pode inibir o crescimento tumoral maligno, infecções virais, e melhorar a progressão de doenças cardiovasculares. Está envolvido especialmente na migração e transformação celular, no entanto, sua função na cicatrização de feridas cutâneas não era conhecida. Para testar a hipótese, os pesquisadores injetaram um plasmídeo de hiperexpressão miR-155 nas bordas da ferida em ratos. Os resultados mostraram que o miR-155 promoveu a cicatrização e reepitelização em comparação ao controle, enquanto não afetou a contração da ferida. Além disso, a superexpressão do miR-155 acelerou a migração de queratinócitos cultivados *in vitro*, mas não teve efeito na proliferação celular. É importante ressaltar que a análise por western blot mostrou que a MMP-2 foi significativamente hiperregulada, enquanto seu inibidor TIMP-1 foi regulado negativamente após tratamento com miR-155. Ainda, a adição de ARP-101, um inibidor da MMP-2, atenuou efetivamente os efeitos aceleradores na migração celular induzida pelo miR-155. Ao comparar esses achados com o presente estudo, nossos resultados corroboram com YANG *et al.* (2017) e fornecem uma justificativa para o efeito terapêutico do miR-155, o qual parece acelerar a migração de queratinócitos via aumento de MMP-2 no processo de cicatrização.

Em estudo anterior realizado no LCT-DCP-UNIFESP que avaliou o efeito da suplementação do KGF na expressão gênica da cicatrização em cultura de queratinócitos de pacientes queimados, CHOMISKI *et al.* (2016) relataram que o gene MMP2 apresentou-se majoritariamente hipoexpresso, em quatro de 6 expressões gênicas relativas, mas a metodologia utilizada foi diferente, não separando CT e CNT. Neste estudo, o gene MMP2

apresentou-se hiperexpresso em duas comparações no grupo CT, mostrando um discreto aumento quando estimulado por KGF e queimadura, compatível com o conhecimento atual de que a hiperexpressão do MMP2 está relacionado à reepitelização nessa fase inicial do trauma.

d) TAGLN: Transgelin – FR = 5,21 (KGF e queimadura)

O transgelin é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene TAGLN. A proteína codificada por esse gene é uma proteína de ligação cruzada / gelatina de actina sensível à transformação e alteração de forma encontrada em fibroblastos e músculo liso. Sua expressão é regulada para baixo em muitas linhagens de células, e essa regulação para baixo pode ser um marcador precoce e sensível para o início da transformação. Um papel funcional desta proteína não é claro. Duas variantes de transcrição que codificam a mesma proteína foram encontradas para esse gene.

Esse gene codifica uma proteína de ligação à actina sensível à mudança de forma e à transformação, que pertence à família das calponinas. É expresso no músculo liso vascular e visceral e um marcador precoce da diferenciação do músculo liso. Trata-se de uma proteína envolvida na contração do músculo liso independente do cálcio. Atua como supressor de tumor e a perda de sua expressão é um evento precoce na transformação celular e no desenvolvimento de alguns tumores, coincidindo com a plasticidade celular.

Na busca da literatura relacionando TAGLN e cicatrização não existe resultado, e uma referência da relação do gene TAGLN2 que inibiu a viabilidade celular, migração e habilidade de invasão de células HeLa no câncer cervical (ZHOU *et al.*, 2019).

O gene TAGLN mostrou-se no presente estudo hiperexpresso na comparação do grupo CT entre GC- *versus* GQ+, sendo que nessa comparação temos o efeito do KGF e a queimadura, variáveis distintas na comparação. Não existindo dados na literatura que relacionem esse gene e queimadura, CT ou KGF, fica como novo dado para confirmação em futuros projetos.

6.1.2 Genes relacionados às citocinas inflamatórias e quimiocinas

a) IL10: Interleucina 10 – FR = 4,57 (KGF e queimadura)

A interleucina 10 (IL10), também conhecida como fator inibidor da síntese de citocinas humanas (CSIF), é uma citocina anti-inflamatória. Em humanos, a interleucina 10 é codificada pelo gene IL10. A IL10 sinaliza através de um complexo receptor composto por duas proteínas do receptor 1 da IL10 e duas proteínas do receptor 2 da IL10. Conseqüentemente, o receptor funcional consiste em quatro moléculas receptoras de IL10. A ligação à IL10 induz a sinalização STAT3 por meio da fosforilação das caudas citoplasmáticas do receptor 1 de IL10 + receptor 2 de IL10 por JAK1 e Tyk2, respectivamente.

A presença de IL10 é capaz de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como CSF, IL1, IL6, IL8 e TNF-alfa, por células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e monócitos. Assim, é capaz de inibir a via de diferenciação de linfócitos em Th1, a expressão de MHC-II e de moléculas co-estimulantes em macrófagos, reduzindo a resposta a patógenos intracelulares. Também, é capaz de inibir a transcrição via NF-kappa B, envolvida na resposta celular ao estresse oxidativo, antígenos virais e bacterianos. Por outro lado, a IL10 aumenta a sobrevivência,

proliferações e produção de anticorpos por linfócitos B. A ligação de IL10 ao seu receptor ativa a transcrição gênica, via sinalização JAK-STAT, em processos como resposta imune, divisão celular, morte celular e formação de tumor (STELZER *et al.*, 2016).

Contudo, os seus efeitos anti-inflamatório e anti-inflamatório específico tornam a manipulação terapêutica da IL10 desafiador. O progresso nessa área exigirá uma compreensão mais profunda da biologia da IL10, especificamente dos mecanismos moleculares que governam a produção e ação da IL10, bem como dos papéis contrastantes que essa citocina pode desempenhar em diferentes contextos (SARAIVA, VIEIRA, O’GARRA, 2019).

O gene IL10 apresentou-se no presente estudo hiperexpresso na comparação do grupo CT entre GC- *versus* GQ+, sendo que nessa comparação, como no gene antecedente, temos o efeito do KGF e a queimadura, variáveis distintas na comparação. E foi hipoexpresso no grupo CNT. Como referido, trata-se de uma citocina anti-inflamatória, mostrando-se como um gene importante para o paciente queimado onde o estado de inflamação é intenso e persistente até que seja realizada a cobertura cutânea definitiva das feridas.

6.1.3 Genes relacionados aos fatores de crescimento

a) CSF3: Fator Estimulador de Colonias de Granulócitos (G-CSF ou CSF3) – FR = 2,05 (KGF); 2,64 (queimadura); 3,46 (KGF) e 5,42 (KGF e queimadura)

O gene G-CSF, também conhecido como fator estimulador de colônias 3 (CSF3) é uma glicoproteína que estimula a produção,

diferenciação e função dos granulócitos, monócitos, macrófagos e CT sanguíneas. Funcionalmente, é uma citocina produzida por diversos tecidos. As vias do sistema imune inato e de hematopoiese são dependentes de CSF3, já a neutropenia é uma doença associada com a falta dessa citocina (NOEL *et al.*, 2017).

A interação entre queratinócitos e fibroblastos desempenha um papel crítico na manutenção da integridade da pele em condições normais e patológicas. Já foi demonstrado que fatores liberados por queratinócitos influenciam na expressão dos principais componentes da MEC, como colágeno e metaloproteinases de matriz (MMP), em fibroblastos dérmicos. Em experimento avaliando a expressão gênica e proteica, por RT-PCR e western blot, do fator estimulador de colônia (G-CSF) em fibroblastos cocultivados com queratinócitos, em relação a células monocultivadas, notou-se que o G-CSF é um importante fator hematopoiético e tem um papel benéfico na cicatrização de feridas por estimular a proliferação de queratinócitos. Sabendo que os queratinócitos liberam IL1, o que estimula a expressão de G-CSF em várias células imunes, várias experiências foram realizadas e mostraram que a adição de IL1 recombinante aumentou significativamente a expressão do G-CSF em fibroblastos. Estes achados ressaltam a importância da comunicação entre queratinócitos e fibroblastos para a produção de citocinas necessárias para a cicatrização de feridas cutâneas e manutenção da integridade da pele (CARR *et al.*, 2016).

Em estudo anterior do LCT-DCP-UNIFESP, foi mostrado que em grande queimadura existiu a expressão de KGF por fibroblastos estava aumentada 220 vezes e por queratinocitos com aumento de 11 vezes o controle de pele normal. Também foi evidenciado que a IL1 estava hipoexpressa em fibroblastos, e estava hiperexpressa 15 vezes a mais em

queratinocitos. Isso sugere que o aumento da produção de IL1 por queratinócitos esta associada ao aumento da expressão do KGF pelos fibroblastos e esse por sua vez tem ação mitótico sobre os queratinocitos, ressaltando a sinalização intensa entre epiderme e derme na reparação das lesões (GRAGNANI *et al.*, 2013).

Esse dado, associado ao referido por CARR *et al.* (2016), onde queratinócitos produzem mais IL1 após queimadura e que estimulam além do KGF por fibroblastos também CSF3, ou G-CSF, por várias células imunes, todos envolvidos no reparo das feridas. Comparando com os achados de hiperexpressão no presente estudo, nessa fase inicial do paciente, após 3 dias de queimadura, nota-se a importância do CSF3 para que o processo de reparo das lesões. No presente estudo não foi observada expressão diferencial da IL1, mas sim do gene IL1R1 na análise da resposta imune de CT, mostrando uma sinalização aumentada do processo envolvendo a IL1.

Num estudo retrospectivo sobre dois grupos de pacientes pediátricos que sobreviveram e não sobreviveram a queimadura, 16 citocinas foram analisadas, e de acordo com JESCHKE *et al.* (2014), dentre as citocinas identificadas em pacientes não sobreviventes à queimadura, o CSF3, IL6 e IL8 apresentaram níveis séricos significativamente elevados, 10 mil vezes acima dos pacientes sobreviventes, e que aumentaram rapidamente após a queimadura, sendo que o pico de CSF3 nos sobreviventes ocorreu até a primeira semana, enquanto nos não sobreviventes esse pico ocorreu ao redor de 30 dias, sendo foram realizados vários momentos de coleta e análise até 180 dias. Esse aumento precoce nos sobreviventes é compatível com os achados no presente estudo em que a hiperexpressão ocorreu no tecido retirado no terceiro dia após queimadura.

Neste estudo, o gene CSF3 apresentou-se hiperexpresso em três comparações. Esses diferentes níveis de expressão, quando existiu somente o efeito do KGF foram observados valores menores, assim como quando somente existiu a análise da queimadura, mas quando foi superposto a ação da queimadura e do KGF foi obtido o maior valor de expressão do CSF3. Os dados obtidos estão coerentes com o conhecimento atual de que existe o aumento de CSF3 nessa fase inicial após a queimadura, sugerindo uma relação com processo de cicatrização de feridas.

b) IGF1: Fator de crescimento semelhante à Insulina tipo 1 – *FR* = 2,20 (queimadura); 3,00 (KGF) e 4,38 (KGF e queimadura)

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, somatomedina C ou IGF1 é uma proteína produzida no fígado em resposta ao hormônio de crescimento (GH) com papel importante no crescimento, desenvolvimento da musculatura, aumenta os níveis de glicose no sangue, reduz os níveis de gordura corporal altera a oxidação lipídica e aumenta a síntese de proteínas. Enquanto as ações sobre o crescimento são tempo limitado, as ações metabólicas e cardiovasculares do eixo GH/IGF1 perduram durante toda a vida. Apesar de muito similar à insulina, enquanto o receptor de insulina é altamente comum no fígado e tecido adiposo branco em adultos, o receptor de IGF1 é raro nesses locais, sendo mais comum no músculo esquelético, onde estimula a diferenciação celular. A proteína codificada por esse gene é semelhante à insulina em função e estrutura e é membro de uma família de proteínas envolvidas na mediação do crescimento e desenvolvimento.

O IGF1 é utilizado pelos queratinócitos da pele para desenvolvimento e manutenção da epiderme. Na pele humana, o IGF1 regula a forma e a migração dos queratinócitos para a mediação da

epitelização da ferida. Os fibroblastos têm sido sugeridos como a principal fonte de IGF1 na pele. Para investigar se as células T epidérmicas humanas podem contribuir para esse aspecto do reparo de feridas, as células T humanas foram isoladas da epiderme da pele normal e avaliadas quanto à produção de IGF1 por citometria de fluxo. A pele de 17 doadores saudáveis foi examinada. Para cada doador, as células epidérmicas foram incubadas com Brefeldin A, droga antiviral por 6 horas, na presença ou ausência de PMA e ionomicina. Descobriu-se que as células epidérmicas $\alpha\beta + e V\delta 1 +$ produzem constitutivamente IGF1 em níveis baixos, conforme descrito anteriormente para DETCs de camundongos. Além disso, observou-se um aumento significativo de três vezes na produção de IGF1 pelas células T residentes na pele após estimulação. Não foi observada correlação entre a idade do doador e a produção de IGF1 ($r < 0,8$). Curiosamente, estudos anteriores mostraram que os níveis de IGF1 aumentam após a lesão epidérmica, atingindo o pico em 3 dias após a lesão, e o IGF1 no fluido humano da ferida atinge níveis máximos dentro de 24 horas após a lesão. Coletivamente, os resultados demonstraram que as células T da pele humana são uma fonte local não reconhecida anteriormente de IGF1 na epiderme e têm a capacidade de regular a expressão do fator de crescimento após a ativação, o que pode afetar o reparo da ferida (TOULON *et al.*, 2009).

No presente estudo, o IGF1 apresentou-se hiperexpresso em três comparações no grupo CT e em uma no grupo CNT. Em CT, houve o mesmo padrão de expressão que aumenta quando somente estimulado pela queimadura, aumentando quando estimulado somente pelo KGF, mas tem o maior nível de expressão quando estimulado por KGF e queimadura. Portanto, o resultado é compatível com o conhecimento atual de que o

IGF1 está mais expresso no processo de reparação da pele e em especial nos primeiros dias após o trauma, como nesse estudo onde se analisou o terceiro dia após queimadura.

c) FGF2: Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 – FR = 2,36 (KGF e queimadura)

O FGF2, também conhecido como fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) e FGF- β , é um fator de crescimento e uma proteína de sinalização codificada pelo gene FGF2. É sintetizado principalmente como um polipeptídeo de 155 aminoácidos, resultando em uma proteína de 18 kDa. Geralmente, a forma de baixo peso molecular (LMW) de 155 aa / 18 kDa é considerada citoplasmática e pode ser secretada pela célula, enquanto as formas de alto peso molecular (HMW) são direcionadas ao núcleo da célula. O FGF2 se liga e exerce efeitos através de proteínas específicas do receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), que constituem uma família de moléculas estreitamente relacionadas.

Como outros membros da família FGF, o fator básico de crescimento de fibroblastos possui amplas atividades mitogênicas e de sobrevivência celular. No tecido normal, o bFGF está presente nas membranas basais e na matriz extracelular subendotelial dos vasos sanguíneos. Foi levantada a hipótese de que, durante a cicatrização de tecidos normais e o desenvolvimento de tumores, a ação das enzimas degradadoras de sulfato de heparano ativa o bFGF, mediando assim a formação de novos vasos sanguíneos, um processo conhecido como angiogênese. Além disso, é sintetizado e secretado por adipócitos humanos e a concentração de FGF2 se correlaciona com o IMC em amostras de sangue. Também demonstrou atuar em pré-osteoblastos - na forma de uma proliferação aumentada - após

ligação ao receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos e ativação da fosfoinositida 3-cinase (YUN *et al.*, 2010).

Além disso, o FGF2 é um componente crítico do meio de cultura de células-tronco embrionárias humanas (CTEH), sendo necessário para que as células permaneçam em um estado indiferenciado. O FGF2, em conjunto com BMP4, o qual é um membro da família TGF β , promove a diferenciação de CT em linhagens mesodérmicas. Após a diferenciação, as células tratadas com BMP4 e FGF2 geralmente produzem quantidades mais altas de diferenciação osteogênica e condrogênica do que as células-tronco não tratadas. No entanto, baixa concentração de bFGF pode exercer um efeito inibitório na diferenciação dos osteoblastos (DAKHORE, NAYER, HASEGAWA, 2018).

As CTEH são candidatas à medicina regenerativa e reparadora. Tratamentos para queimaduras e lesões na pele que usam enxertos de pele autólogos ou alogênicos derivados de células-tronco adultas ou embrionárias são promissores. Em estudo conduzido por ULUER *et al.* (2019), foi investigado a utilidade dos queratinócitos, células já diferenciadas das CT embrionárias, na cicatrização de feridas utilizando um modelo de ferida cirúrgica. A cicatrização de feridas foi mais rápida no grupo experimental em comparação aos grupos sham e controle. O grupo experimental exibiu expressão aumentada de IL8, FGF-2 e MCP-1 durante os estágios iniciais da cicatrização (inflamação) e expressão de colágeno-1 e EGF durante os estágios finais da cicatrização (proliferação e remodelação). Queratinócitos derivados de CT melhoraram a cicatrização de feridas e influenciaram os estágios de cicatrização (ULUER *et al.*, 2019).

Neste estudo, FGF2 mostrou-se hiperexpresso na comparação do grupo CT entre GC- *versus* GQ+, quando se analisa o efeito do KGF e da queimadura. Porém, mostrou-se hipoexpresso no grupo CNT, na comparação que analisava somente o KGF. Como referido na literatura tem importância na cicatrização de feridas em geral e em queimaduras, em especial relacionado a CT, e é um gene de importância para futuros estudos.

d) FGF10: Fator de crescimento de fibroblastos 10 – FR = -2,70 (KGF)

A proteína codificada por esse gene é um membro da família do fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os FGFs possuem amplas atividades mitogênicas e de sobrevivência celular e estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparo de tecidos, crescimento e invasão de tumores. O fator de crescimento de fibroblastos 10 é uma molécula de sinalização parácrina vista primeiro no desenvolvimento de brotos de membros e organogênese. O FGF10, também é conhecido como fator de crescimento de queratinócito 2 (KGF2), inicia o desenvolvimento dos membros e está envolvido na ramificação da morfogênese em múltiplos órgãos, como pulmões, pele, ouvido e glândulas salivares. O desenvolvimento pulmonar usa a mesma sinalização epitelial-mesenquimal do FGF10 no mesênquima do antebraço com o receptor FGFR2 no epitélio do antebraço. A sinalização de FGF10 é necessária para ramificação epitelial. Portanto, todos os órgãos morfogênicos ramificados, como pulmões, pele, ouvido e glândulas salivares, exigem a expressão constante de FGF10. Essa proteína exibe atividade mitogênica para células

epidérmicas queratinizadas, mas nenhuma atividade para fibroblastos, que é semelhante à atividade biológica do FGF7 (ITOH, 2016).

A maioria dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) foi extensivamente avaliada, mas apenas alguns foram evidenciados por participar da cicatrização de feridas. Em particular, o FGF-10 é fortemente aumentado no microambiente da ferida após lesão e demonstrou capacidade de promover a cicatrização da ferida *in vitro* e *in vivo*. Os glicosaminoglicanos (GAGs) são carboidratos lineares que participam do reparo de feridas, influenciando a localização de citocinas e fator de crescimento, bem como a interação com seus receptores. Recentemente, a combinação de FGF-10 e dermatan sulfato (DS) demonstrou o potencial de acelerar a cicatrização de feridas através do aumento da proliferação e migração de queratinócitos. O DS tem potencial para servir como cofator para o FGF-10 e, juntos, é provável que acelerem a cicatrização, estimulando a atividade dos queratinócitos. Como um subtipo específico de feridas, o processo geral de cicatrização de lesões por queimadura não difere significativamente de outros tipos de feridas, onde o reparo ideal resulta em regeneração da matriz e reepitelização completa. Atualmente, o tratamento padrão de queimadura envolve principalmente a aplicação tópica de agentes antimicrobianos, enquanto nenhuma terapia de rotina visa à aceleração da reepitelização, a chave para o fechamento da ferida. Assim, essa nova combinação terapêutica poderia ser usada em conjunto com algumas das terapias atuais, mas teria a capacidade exclusiva de iniciar a cicatrização de feridas, estimulando a epitelização de queratinócitos (PLICHTA & RADEK, 2012).

O FGF10 recombinante humano (rhFGF10) é freqüentemente usado para tratar pacientes com lesões na pele, inclusive pode promover o

crescimento do cabelo. LI *et al.* (2017) avaliaram a capacidade de um rhFGF10 penetrar na pele, após aplicação tópica, em feridas no dorso de camundongos e promover a cicatrização. Concluíram que o sistema de liberação da molécula que criaram promoveu absorção acelerada do rhFGF10, promovendo regeneração da epiderme, acelerou o fechamento da ferida, promoveu maior formação de tecido subcutâneo e crescimento capilar. No presente estudo, o FGF10 foi o único gene hipoxpresso, sendo visto na avaliação das variáveis KGF, na comparação GC- versus GC+, e KGF e queimadura, na comparação GC+ versus GQ-. Como referido na literatura, o FGF10 tem forte presença na cicatrização de feridas em geral e em queimaduras, tornando-se um gene de grande importância para futuros estudos.

Portanto, podemos resumir que, em relação à análise dos genes da cicatrização, os genes CSF3, IGF1, ITGA6, MMP2, MAPK1, TAGLN, ITGB3, IL10, FGF2 e FGF10 são de interesse para maior aprofundamento do conhecimento.

6.1.4 Genes relacionados à transdução de sinal

a) MAPK1: Proteína Quinase 1 ativada por mitógeno – FR = 1,97 (KGF) e 2,08 (KGF e queimadura)

A proteína quinase 1 ativada por mitógeno, também conhecida como MAPK1, p42MAPK e ERK2, é uma enzima que em humanos é codificada pelo gene MAPK1.

A proteína codificada por esse gene é um membro da família MAP quinase. As MAP quinases, também conhecidas como quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), atuam como um ponto de integração para

múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação de transcrição e desenvolvimento. A ativação desta quinase requer sua fosforilação pelas quinases a montante. Após a ativação, essa quinase se transloca para o núcleo das células estimuladas, onde fosforila os alvos nucleares. Duas variantes transcritas de splicing alternativo que codificam a mesma proteína, mas diferem nas UTRs, foram relatadas para esse gene.

As c-Jun c-Jun N-terminal (JNKs, também chamadas de proteínas quinases ativadas por estresse) e as quinases responsivas a sinais extracelulares (ERKs ou MAPKs) exercem diferentes funções na mitogênese, maturação e diferenciação de células imunes e epiteliais. Investigaram-se funções específicas das isoformas JNK e ERK individuais no reparo da barreira da permeabilidade da pele e na cicatrização de feridas. Camundongos deficientes em JNK1, mas não em JNK2 ou JNK3, revelaram um atraso no reparo da barreira de permeabilidade após lesão superficial da pele por remoção da fita, bem como um atraso na cicatrização de feridas com espessura total da pele. A lesão da barreira cutânea induziu um aumento na atividade da enzima epidérmica JNK1 na pele de camundongos in vivo, e a atividade JNK1 correlacionou-se com o grau de diferenciação nas culturas organotípicas de queratinócitos. A lesão cutânea ativou a enzima ERK2, com picos após 30 minutos e 3 horas após lesão, sendo que a atividade foi independente do estado de diferenciação na cultura de queratinócitos. Em resumo, a cicatrização superficial e profunda da ferida depende da atividade diferencial das MAP quinases, como JNK1 na diferenciação epidérmica e ERK2 na proliferação (KOEHLER *et al.*, 2011).

O gene MAPK1 mostrou-se hiperexpresso em duas comparações de CT na placa dos genes relacionados com a cicatrização e em uma no grupo CNT, com FR muito baixa (1,97), mas como o comentário foi *OKAY* e o valor-p significativo, está sendo contabilizado apenas pela importância deste gene, embora pudesse ter sido excluído. Também, mostrou-se hiperexpresso em 4 comparações de CT na placa dos genes relacionados com a resposta imune, a qual será discutida mais adiante. Em estudo anterior do LCT-DCP-UNIFESP, a MAPK1 apresentou-se hipoexpressa em duas comparações, mas as células cultivadas não haviam sido separadas por *sorter* em citometria de fluxo como no presente estudo. Entretanto, coerentemente, a MAPK1 apresentou-se hipoexpressa também no grupo CNT (CHOMISKI *et al.*, 2016).

6.2 Genes relacionados à Resposta Imune

A seguir, serão discutidos 10 dos 13 genes diferencialmente expressos em CT de acordo com as categorias apresentadas no Quadro 3, uma vez que é o foco do presente estudo. As análises em CNT serviram inicialmente de base para comparação e uma primeira análise em relação às CT. Dos 10 genes diferencialmente expressos em CT, quatro são relativos à imunidade adaptativa (CCR5, IL17A, IL23A e RAG1); cinco são relativos à imunidade inata (IL2, IRAK1, MAPK1, MAPK8 e TRAF6) e um gene é relativo à resposta contra vírus (TLR7).

6.2.1 Genes relacionados à imunidade inata

a) **CCR5: Receptor de quimiocina C-C tipo 5 – FR = 2,36 (KGF); 5,50 (queimadura) e 25,17 (KGF e queimadura)**

O C-C receptor quimiocina tipo 5 também conhecido como CCR5 é uma proteína que nos humanos é codificada pelo gene CCR5. CCR5 é membro da família de receptores beta quemoquina das proteínas das membranas integrais. Essa proteína é expressa por células T e macrófagos e é conhecida por ser um co-receptor importante para o vírus trópico de macrófagos, incluindo o HIV. Alelos defeituosos desse gene têm sido associados à resistência à infecção pelo HIV e a heterozigose ao desenvolvimento da doença é mais lento.

Uma interação complexa de quimiocina-receptor de quimiocina está envolvida na migração de células imunes para o microambiente tumoral. Recentemente, foi demonstrado que os ligantes CCL3, CCL4 e CCL5 secretados pelas células supressoras derivadas de células mielóides infiltrantes de tumores recrutam altos números de células Tregs, favorecendo o crescimento do linfoma. Em murinos, as Tregs que expressam CCR5 respondem às quimiocinas CCR5, orientando o retorno das células Tregs aos tecidos infectados por *Leishmania major* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Além disso, maior produção de CCL5 foi associada ao aumento da migração de CCR5 + Tregs em um modelo de camundongo de adenocarcinoma pancreático. O acúmulo de células CCR5 no tecido tumoral promove a angiogênese do câncer, a metástase pulmonar e protege as células cancerígenas da resposta imune antitumoral. Foi estabelecida, também, uma correlação entre CCR5 e Tregs na progressão do carcinoma espinocelular, mostrando que essas células regulam aspectos

críticos dessa doença e abrem novas perspectivas para um alvo de imunoterapia (de OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O CCR5 é predominantemente expresso em células T, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, microglia e uma subpopulação de células cancerígenas da mama ou da próstata. A expressão do CCR5 é induzida seletivamente durante o processo de transformação do câncer e não é expressa em células epiteliais normais da mama ou da próstata. Aproximadamente, 50% do câncer de mama humano expressou CCR5, principalmente no câncer de mama triplo negativo. Os inibidores de CCR5 bloquearam a migração e as metástases das células de câncer de mama e próstata que expressavam CCR5, sugerindo que o CCR5 pode funcionar como um novo alvo terapêutico. Estudos recentes sugerem que o CCR5 é expresso em um subconjunto de células cancerígenas com características de CT cancerígenas, conhecidas por impulsionar a resistência à terapia, e que os inibidores do CCR5 aumentaram o número de células mortas pela quimioterapia atual. É provável que o CCR5 tenha um papel nas respostas inflamatórias à infecção, embora seu papel exato na função imunológica normal não seja claro (VANGELISTA & VENTO, 2018)

O CCR5 revela um valor mais elevado quando existe a expressão após a queimadura e após suplementação de KGF, mostrando que os dois fatores associados aumentaram bem mais quando somente cada um dos fatores é analisado separadamente. Não foi encontrado estudo correlacionando CCR5 e queimadura, mas sim com doenças virais, infecção por HIV e câncer. Como o gene CCR5 mostrou-se diferencialmente expresso em algumas comparações, é um gene de interesse para futuros estudos.

b) IL17A: Interleucina 17A – FR = 4,62 (KGF); 10,74 (queimadura) e 25,60 (KGF e queimadura)

A interleucina-17A é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene IL17A. Trata-se de uma citocina pró-inflamatória produzida por células T ativadas. Esta citocina regula as atividades das proteínas quinases ativadas por NF-kappaB e mitogênio, estimula a expressão de IL6 e ciclo-oxigenase-2 (PTGS2/ COX-2) e aumenta a produção de óxido nítrico (NO).

A IL17A, muitas vezes referida apenas como IL17, foi originalmente descoberta em nível transcricional em 1993, de um hibridoma de células T de roedor, derivado da fusão de um clone de células T citotóxicas de camundongo e um linfoma de células T de rato. A IL17A humana e de camundongo foram clonadas alguns anos depois. Linfócitos, incluindo CD4+, CD8+, gama-delta T ($\gamma\delta$ -T), NKT invariante e células linfóides inatas (ILCs) são as principais fontes de IL17A. Também foi relatado que células não-T, como neutrófilos, também produzem IL17A sob determinadas circunstâncias. As células T produtoras de IL17A, conhecidas como células Th17, são de uma linhagem distinta das linhagens Th1 e Th2 CD4+. A diferenciação das células Th17 requer STAT3 e RORC. O receptor A da IL17A (IL17RA) foi isolado e clonado a partir de células de timoma de camundongo, sendo que a bioatividade da IL17A foi confirmada por estimular a atividade do fator transcricional NF-kappa B e a secreção de interleucina-6 (IL6) por fibroblastos. IL17RA emparelha-se com IL17RC para permitir a ligação e sinalização de IL17A e IL17F. Altos níveis dessa citocina estão associados a várias doenças inflamatórias crônicas, incluindo artrite reumatóide, psoríase e esclerose múltipla (HARRINGTON *et al.*, 2005).

A IL17A é uma importante citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crítico no início e na amplificação das respostas inflamatórias. Nos estágios iniciais da inflamação, a IL17A é derivada principalmente de células $T\gamma\delta$, embora seja secretada primordialmente por células Th17 nos estágios finais da inflamação. A IL17A é necessária para a cicatrização eficiente da ferida na pele, pois os camundongos IL17A- apresentam defeitos no reparo da ferida. Dessa forma, as células T dendríticas epidérmicas foram identificadas por serem fontes de IL17A após lesão na pele, o que promove a cicatrização de feridas ao induzir queratinócitos epidérmicos a expressarem as moléculas de defesa do hospedeiro β -defensina 3 e RegIII γ . As células T V γ 4 foram identificadas como a principal fonte de IL17A. Além disso, estudos anteriores mostraram que a produção de IL17A foi prejudicada ao redor de feridas cutâneas, o que explica a cicatrização prejudicada em diabéticos, e as células T V γ 4 positivas para IL17A transferidas para o leito da ferida poderiam melhorar a cicatrização de feridas em diabéticos. Mais estudos são necessários para esclarecer os papéis exatos das células T, IL17A e V γ 4 na cicatrização de feridas cutâneas (LI *et al.*, 2018).

Lesões por trauma ou queimadura que afetam a derme profunda podem produzir cicatriz hipertrófica, limitando o movimento das articulações nos pacientes, além de ser um problema estético. Acredita-se que a inflamação seja um dos principais mecanismos patogênicos da cicatriz hipertrófica. Foi visto que a IL17 estava aumentada nos tecidos cicatrizados de pacientes com cicatriz hipertrófica em comparação com a pele normal. A IL17 de rato recombinante foi injetada por via subcutânea em ratos para investigar seu papel da IL17 na formação da cicatriz. Os ratos estimulados com IL17 mostraram fibrogênese agravada, atraso na

cicatrização de feridas e aumento da inflamação. Além disso, a infiltração de macrófagos também foi aumentada. Após o esgotamento dos macrófagos com lipossomas de clodronato, o efeito da IL17 desapareceu. Níveis das proteínas quimiotáticas monócitas (MCP) 1, MCP2 e MCP3 (juntas denominadas MCPs) foram aumentadas por estimulação com IL17. Bindarit (um inibidor de MCPs) foi usado para verificar o papel dos MCPs. Além do que, além do mais, os macrófagos com baixo nível de Ly6C foram responsáveis pela fibrogênese da ferida em camundongos. No estudo, foram detectados níveis aumentados de IL17 pela primeira vez e os autores concluíram que IL17 induziu a infiltração de um subtipo específico de macrófagos, agravando a fibrose através de um mecanismo dependente do MCP. Assim, os resultados forneceram uma melhor compreensão da formação de cicatrizes e novas estratégias para prevenção de cicatrizes (ZHANG *et al.*, 2018).

Neste estudo, o gene IL17A mostrou-se hiperexpresso em três comparações com o grupo CT, mantendo o mesmo padrão dos genes discutidos anteriormente. Por estar envolvido em inflamação e em cicatrização alterada, o IL17A é um gene de grande interesse para futuros estudos.

c) IL23A: Interleucina 23A – FR = 4,70 (KGF); 10,92 (queimadura) e 26,01 (KGF e queimadura)

A interleucina-23 (IL23) é uma citocina pró-inflamatória composta por duas subunidades, p19 e p40. A subunidade p40 é compartilhada com a IL12. As IL23 e IL12 têm diferentes receptores e promovem efeitos distintos. Enquanto a IL12 induz o desenvolvimento de células Th1, que produzem IFN γ , a IL23 está envolvida na diferenciação de células Th17

em um contexto pró-inflamatório e especialmente na presença de TGF- β e IL6. As células Th17 ativadas produzem IL17A, IL17F, IL6, IL22, TNF- α e GM-CSF. Os macrófagos inflamatórios expressam receptores de IL23 (IL23R) e são ativados por IL23 para produzir IL1, TNF- α e a própria IL23. Esses efeitos identificam a IL23 como uma citocina central na autoresposta imune e um alvo de tratamento altamente promissor para doenças inflamatórias. A IL23 é encontrada na pele de pacientes com psoríase, na parede intestinal de pacientes com doença inflamatória intestinal crônica e na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide. O ustekinumab, que inibe a IL12 e a IL23 pelo bloqueio de p40, e foi eficaz na psoríase cutânea e na artrite psoriática, bem como na doença de Crohn. Tratamentos direcionados estão sendo desenvolvidos especificamente com a IL23 (DUVALLET *et al.*, 2011).

A psoríase é uma doença crônica imunomediada que afeta mais de 100 milhões de pessoas em todo o mundo. Pensa-se que a etiologia da psoríase se origine de uma interação de fatores genéticos, ambientais, infecciosos e de estilo de vida. A maneira pela qual os fatores genéticos e ambientais interagem para contribuir com os mecanismos de doenças moleculares permanece não definida. No entanto, o eixo imunológico da IL23 / T helper 17 (TH17) foi identificado como uma importante via imunológica na patogênese da doença psoríase. Central para essa via é a citocina IL23, um heterodímero composto por uma subunidade p40 também encontrada na IL12 e uma subunidade p19 exclusiva da IL23. A IL23 é importante para manter as respostas TH17, e os níveis de IL23 são elevados na pele psoriática em comparação com a pele não lesional. Atualmente, vários agentes que inibem especificamente a IL23-p19 estão em desenvolvimento para o tratamento da psoríase em placas moderada a

grave, com ensaios clínicos recentes demonstrando eficácia com um bom perfil de segurança e tolerabilidade. Um melhor entendimento do eixo imune da IL23 / TH17 é vital para o desenvolvimento de alvos adicionais para a psoríase e outras doenças inflamatórias que compartilham etiologia genética e caminhos patogénicos semelhantes (GIROLOMONI *et al.*, 2017). Um novo medicamento chamado tildrakizumabe mostrou-se ser uma opção terapêutica promissora para pacientes com psoríase em placas crônica moderada a grave. A especificidade do fármaco dá-se pela inibição da subunidade p19 da IL23, permitindo a alta eficácia e segurança do tratamento à longo prazo, como demonstrado em ensaios clínicos (REICH *et al.*, 2017).

Neste estudo, o gene IL23A apresentou-se hiperexpresso e presente em todas as comparações em que se tem GQ+, enquadrando-se hiperexpresso ao se analisar as três variáveis: KGF, Queimadura e KGF e queimadura. Como referido na literatura, a IL23 está fortemente presente em doenças autoimune e em processos inflamatórios, que é o estado típico do paciente grande queimado, o qual cursa com síndrome da resposta inflamatória sistêmica logo após o trauma. Portanto, o gene IL23A é de extrema importância para futuros estudos sobre grande queimadura.

d) RAG1: Gene de ativação de recombinação 1 – FR = 4,66 (KGF); 10,84 (queimadura) e 25,83 (KGF e queimadura)

O gene de ativação de recombinação 1, também conhecido como RAG1, é uma proteína que em humanos é codificada pelo gene RAG1. Os genes RAG1 e RAG2 são amplamente conservados em seres humanos. A proteína codificada por esse gene está envolvida na recombinação de anticorpos e receptores de células T. O RAG1 está envolvido no

reconhecimento do substrato do DNA, mas a atividade estável de ligação e clivagem também requer o RAG2. O complexo RAG1/2 reconhece seqüências de sinais de recombinação (RSSs) em regiões V, D e J nos genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos e componentes de receptores de células T. O complexo liga-se aos RSSs, segmentando o DNA. Isso leva à remoção do DNA intermediário e à eventual ligação das seqüências V, D e J. Defeitos nesse gene podem causar diversas doenças (CARMONA & SCHATZ, 2017).

Devido a esses efeitos, a exclusão de RAG1 é usada em modelos de doenças de camundongos para prejudicar o desenvolvimento das células T e B, e exclui funcionalmente células T e B maduras do sistema imunológico. A deficiência de RAG é considerada uma doença autossômica recessiva. A perda total de função no RAG1/2, os principais componentes responsáveis pela atividade de recombinação V(D)J, produz imunodeficiência grave em humanos (CARMONA & SCHATZ, 2017).

No presente estudo, o gene RAG1 apresentou-se hiperexpresso em três comparações no grupo CT, mantendo o mesmo padrão de valores de hiperexpressão dos genes anteriores. Por esse motivo, é um gene de interesse para futuros estudos. Não existem estudos em humanos correlacionando-o com queimadura. Há somente estudo com camundongo geneticamente modificado para não exibir expressão do RAG1 e, assim, apresentando imunodeficiência.

6.2.2 Genes relacionados à imunidade adaptativa

a) IL2: Interleucina 2 – FR = 2,34 (KGF); 5,45 (queimadura) e 24,96 (KGF e queimadura)

A interleucina-2 (IL2) é uma citocinas de sinalização no sistema imunológico. É uma proteína que regula a ativação, diferenciação e expansão de células NK e T, que são responsáveis pela resposta imune. A IL2 faz parte da resposta natural frente à infecção microbiana, mediada por células NK e Th1, discriminando o agente invasor. A IL2 medeia seus efeitos ligando-se aos receptores de IL2, que são expressos por linfócitos. As principais fontes de IL2 são as células T CD4+ ativadas e as células T CD8+ ativadas. Por seu papel no desenvolvimento da memória imunológica das células T, que depende da expansão do número e da função dos clones de células T selecionados por antígeno, a IL2 tem um papel fundamental na resposta imune (WEIST *et al.*, 2015).

A produção inadequada de IL2 é um componente fundamental da supressão imunológica pós-queimadura, ocorrendo uma diminuição da IL2 no nível da transcrição gênica. Achados mostram níveis séricos de IL2 diminuídos e de seus receptores, sIL2R, aumentados em pacientes traumatizados ou com queimadura. Esses estudos também sugerem que os níveis ideais de IL2 podem estar vinculados a uma terapêutica e que tanto as deficiências absoluta e relativa de IL2 podem ter importância clínica em relação aos níveis elevados de sIL2R, associando a um prognóstico negativo em pacientes com queimaduras e sepse. Contudo, a modificação do nível de IL2 é complexa. Assim, novos estudos devem ser realizados para delinear os níveis ideais de IL2 (MILLER, RASHID, ELAMIN, 2007).

O estudo prospectivo de FRANKEL *et al.* (2018) teve como objetivo abordar mudanças na resposta inflamatória entre diferentes populações de idosos que sofreram queimaduras e lesões por inalação. Amostras de plasma e lavagem broncoalveolar (LBA) foram coletadas de 104 pacientes dentro de 15h após o tempo estimado de lesão por queimadura. No plasma coletado dentro de 15h após a lesão por queimadura, apresentou aumentos significativos nas concentrações de antagonista do receptor da interleucina 1 (IL1RA), interleucina 2 (IL2), interleucina 4 (IL4), interleucina 6 (IL6), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína 10 induzida por IFN (IP-10) e proteína quimioatraente 1 de monócitos (MCP-1) foram observados no grupo ≥ 65 anos. No líquido do LBA, a MCP-1 aumentou três vezes no grupo ≥ 65 . Este estudo sugere que alterações em certos mediadores imunológicos estavam presentes na coorte mais velha, em associação com a mortalidade hospitalar.

Correlacionando os achados com a literatura, a IL2 é importante no entendimento da evolução da grande queimadura, e por termos obtido um resultado divergente de vários estudos na literatura onde é observado diminuição da IL2 no pior prognóstico dos pacientes, com a hiperexpressão obtida no presente estudo associada às especificidades dos pacientes e da relação com outros genes, poderemos ter um gene de forte importância para futuros estudos.

**b) IRAK1: Quinase 1 associada ao receptor da Interleucina 1 –
FR = 2,26 (KGF); 5,25 (queimadura) e 24,03 (KGF e queimadura)**

A quinase 1 associada ao receptor da interleucina-1 é uma enzima codificada pelo gene IRAK1 em humanos. Esse gene é parcialmente

responsável pela regulação positiva induzida por IL1 do fator de transcrição NF-kappa B.

O estudo de CHANDRA *et al.* (2014) revelaram que o mosaicismismo para a expressão de IRAK1, ou seja, quando um indivíduo possui dois materiais genéticos distintos de IRAK1, fornece a mesma proteção contra a mortalidade induzida por sepse. Essa proteção é acompanhada pela redução de IL6 e IL10 em indivíduos com deficiência de mosaico e de IRAK1. Com base na taxa de expressão gênica específica, o mecanismo de proteção mais provável é um aumento de células com deficiência de IRAK1 em CT e no sangue de indivíduos saudáveis em mosaico IRAK1, que o pré-condiciona a uma resposta séptica aprimorada semelhante à observada em indivíduos com deficiência, indicando uma proteção contra sepse na deficiência de IRAK1.

O IRAK1 apresentou o mesmo padrão de expressão gênica relativa do gene supracitado, tornando-o de interesse para futuros estudos. Não há estudo correlacionando IRAK1 e queimadura.

c) MAPK1: Proteína Quinase 1 Ativada por Mitógeno – FR = 2,39 e 6,65 (queimadura); 4,17 e 9,98 (KGF e queimadura)

A proteína quinase 1 ativada por mitógeno, também conhecida como MAPK1, p42MAPK e ERK2, é uma enzima que em humanos é codificada pelo gene MAPK1. As MAP quinases, também conhecidas como quinases reguladas por sinais extracelulares (ERKs), atuam como um ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação de transcrição e desenvolvimento.

Após a infecção por patógenos ou danos nos tecidos, o estímulo dos receptores de reconhecimento de padrões na superfície celular, bem como no citoplasma das células imunes inatas, ativa membros de cada uma das principais subfamílias da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) - a quinase regulada por sinal extracelular (subfamílias ERK1/2), p38 e Jun N-terminal quinase (JNK). Em conjunto com a ativação do fator nuclear κ B e fatores de transcrição do fator regulador do interferon (IFN), a ativação da MAPK induz a expressão de múltiplos genes que juntos regulam a resposta inflamatória. A ativação de MAPK em células da resposta imune inata tem sido estudada principalmente no contexto de antagonismo aos TLRs, os quais estão envolvidos com reconhecimento de patógeno. O uso de inibidores altamente específicos de MKK1 e MKK2 mostrou que a ativação de ERK1 e ERK2 tem efeitos complexos sobre respostas inflamatórias, induzindo a produção de TNF, IL1 β e IL10 após estímulo com TLR, mas regulando negativamente a produção de IL12, IFN β e iNOS (ARTHUR & LEY, 2013).

No estudo de XU *et al.* (2019), único artigo na Pubmed quando usado os descritores MAPK1 e resposta imune e pele, tiveram como objetivo investigar a existência de RNAs longos não codificantes (lnc) associados à imunorregulação mediados por linfócitos T na superfície da ferida de úlceras nos pés diabéticos (DFUs). Foram obtidos os tecidos cutâneos da ferida dos pacientes que receberam desbridamento por trauma ou DFUs associados à infecção e as alterações histológicas dermatológicas foram observadas por coloração patológica, e subconjuntos de linfócitos T e citocinas associadas à inflamação foram identificadas. Os resultados sugeriram que um distúrbio imunológico funcional dos linfócitos T pode estar intimamente associado ao desenvolvimento de DFUs. Além disso, a

ativação da via de transdução de sinal MAPK mediada pelo eixo lncRNA -ENST00000411554 / MAPK1 pode afetar o desequilíbrio regulatório imune da DFU (XU *et al.*, 2019).

Como exposto anteriormente, o gene MAPK1 que apareceu na placa de cicatrização assim como na placa de resposta imune em várias comparações, tornando-se uma importante fonte de perspectiva para futuros projetos. Na placa da cicatrização apresentou-se hiperexpresso em CT e CNT, enquanto na placa de resposta imune apareceu hiperexpresso 4 vezes somente no grupo CT. Com pode-se pontuar do conhecimento na literatura, existe uma relação direta com a cicatrização e com a resposta imune, e com várias outras funções, sendo o gene MAPK1 um gene de grande interesse no estudo de CT em queimadura aguda.

d) MAPK8: Proteína quinase 8 ativada por mitógeno – FR = 2,24 (KGF); 5,21 (queimadura) e 23,86 (KGF e queimadura)

A proteína quinase 8 ativada por mitógeno, também conhecida como JNK1, é uma enzima codificada pelo gene MAPK8 em humanos. A proteína codificada por esse gene é um membro da família MAP quinase e JNK. As MAP quinases atuam como um ponto de integração para múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação de transcrição e desenvolvimento. Essa quinase é ativada por vários estímulos celulares e tem como alvo fatores específicos de transcrição e, assim, medeia a expressão gênica imediata-precoce em resposta a estímulos celulares. A ativação da MAPK8 pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) é necessária para a apoptose induzida por TNF-alfa. A MAPK8 também está envolvida na apoptose induzida por radiação UV, que se

acredita estar relacionada à via de morte celular mediada pelo citocromo C. Estudos desse gene em camundongos sugeriram que essa quinase desempenha um papel fundamental na proliferação, apoptose e diferenciação de células T.

Foi demonstrado que a lesão térmica diminuiu o uso de glicose no cérebro de ratos durante a fase aguda. ZHANG *et al.* (2008) analisaram o efeito da lesão por queimadura nas atividades de proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e sinalização de insulina no tecido cerebral. Os ratos foram submetidos a 50% de lesão por queimadura por espessura total da área da superfície corporal. Amostras do cérebro foram coletadas 6 horas após a lesão. Os lisados de tecidos foram analisados quanto às atividades de MAPKs, expressão do substrato receptor de insulina (IRS) -1 e atividade de Akt que foram determinadas por western blot e imunoprecipitação. Os dados sugerem que a ativação das três principais vias de MAPKs parece ser um evento envolvido nos mecanismos de lesão por queimadura e induzem resistência à insulina e encefalopatia. Alterações nas vias de transdução de sinal no cérebro após lesão por queimadura, fornece o mecanismo molecular subjacente de anormalidades neurológicas (ZHANG *et al.*, 2008).

No presente estudo, o gene MAPK8 apresentou-se hiperexpresso em três comparações no grupo CT, mantendo o mesmo padrão dos genes apresentados anteriormente, com maior hiperexpressão na comparação onde foi analisado KGF e queimadura.

e) TRAF6: Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral – FR = 2,32 (KGF); 5,40 (queimadura) e 24,75 (KGF e queimadura)

A proteína codificada pelo TRAF6 é um membro da família de proteínas do fator associado ao receptor de TNF (TRAF). As proteínas TRAF estão associadas e medeiam a transdução de sinal de membros da superfamília do receptor de TNF e também dos membros da família Toll / IL1. Essa proteína funciona como um transdutor de sinal na via NF-kappaB em resposta a citocinas pró-inflamatórias.

O TRAF6 ativa NFκB mediada por receptor de interleucina-1 (IL1R), sendo um dos principais receptores com funções imunorreguladoras, incluindo membros da superfamília do TNFR, receptores do tipo toll (TLR), receptores do fator de crescimento β do tumor (TGFβR) e receptores das células T (TCR). No contexto do sistema imunológico, os sinais mediados pelo TRAF6 mostraram-se críticos para o desenvolvimento, homeostase e / ou ativação de células B, células T e células mielóides, incluindo macrófagos, células dendríticas e osteoclastos, além de organogênese dos tecidos linfóides tímicos e secundários. Em vários contextos celulares, a função do TRAF6 é essencial não apenas para a ativação adequada do sistema imunológico, mas também para manter a tolerância imunológica e interações proteicas reguladoras e regulação do RNA mensageiro por microRNAs (WALSH, LEE, CHOI, 2015).

TRAF6 também foi identificado como um marcador de estresse do retículo endoplasmático (RE) e da resposta à proteína desdobrada (RPD). O músculo esquelético contém uma extensa rede de RE, chamado retículo sarcoplasmático, que desempenha um papel importante na regulação da proteostase e homeostase do cálcio. Para aliviar o estresse e restaurar a

homeostase, o RE ativa uma rede de sinalização chamada RPD. Estudos recentes sugerem que as vias RPD desempenham papéis fundamentais na homeostase das células-tronco musculares, diferenciação miogênica e regeneração do músculo esquelético lesionado. Além disso, marcadores do estresse do RE e da RPD são ativados no músculo esquelético em diversas condições catabólicas, como exercícios, denervação, fome, inanição, dieta rica em gorduras, caquexia do câncer e envelhecimento. Evidências sugerem, ainda, que o estresse no RE pode ter um papel importante na patogênese de miopatias inflamatórias e distúrbios musculares genéticos. TRAF6 foi identificado como mediador na degradação proteolítica de proteínas de filamentos grossos e finos no músculo esquelético. Assim, a deleção de TRAF6 evita a perda do músculo esquelético em condições catabólicas e, a queimadura mostra esse tipo de intenso catabolismo (BOHNERT, MCMILLAN, KUMAR, 2017).

Este gene apresentou o mesmo padrão dos anteriores, com aumento da hiperexpressão na associação de KGF e queimadura. Ainda, está relacionada com catabolismo, estresse, perda de músculo esquelético, características estas do paciente grande queimado. Sendo assim, é um gene importante para futuros estudos.

6.2.3 Genes relacionados à transdução de sinal

a) TLR7: Toll Like Receptor 7 – FR = 2,80 e 4,65 (KGF); 8,98 (queimadura), -1,93 e 25,77 (KGF e queimadura)

O receptor Toll Like 7, também conhecido como TLR7, é uma proteína codificada pelo gene TLR7 em humanos. É um membro da família de receptores toll-like (TLR) e detecta RNA de fita simples, comum dos

genomas virais que são internalizados por macrófagos e células dendríticas. A família TLR desempenha um papel importante no reconhecimento de patógenos e na ativação da resposta imune inata. Eles reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são expressos por agentes infecciosos e mediam a produção de citocinas necessárias para a resposta imune eficaz. Esse gene é predominantemente expresso no pulmão, placenta e baço e fica próximo de outro membro da família, TLR8, no cromossomo X humano.

A pele é um exemplo ideal do sistema imunológico inato, fornecendo barreiras físicas e outras respostas imunológicas inatas rápidas celulares. O sistema imunológico inato cutâneo alerta seletivamente o hospedeiro da presença de patógenos microbianos, detectando PAMPs ou sinais endógenos de lesão via TLRs e outros receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e responde rapidamente produzindo citocinas, peptídeos antimicrobianos ou intermediários antimicrobianos, por exemplo, espécies radicais de oxigênio e óxido nítrico. A ativação do TLR também contribui para esse processo, iniciando e modelando a resposta imune adaptativa através da ativação da maturação das células dendríticas e influenciando a função das células T e B. No entanto, respostas superativadas podem causar danos ao paciente, como em queimaduras, sepse ou doenças autoimunes (LAI & GALLO, 2008).

O TLR7 desempenha um papel significativo na patogênese de distúrbios autoimunes, como o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), bem como na regulação da resposta imune antiviral. Embora ainda não tenha sido totalmente elucidado, foi demonstrado que o receptor TREML4 atua como um regulador positivo essencial da sinalização de TLR7. A deficiência de TREML4 reduziu a produção de citocinas inflamatórias e

autoanticorpos em camundongos, sugerindo que o TLR7 é um componente vital da resposta imune antiviral e um fator que precede a patogênese de doenças reumáticas, como o LES (DUFFY L & O'REILLY, 2016).

A psoríase também é uma doença inflamatória autoimune crônica e parece ser iniciada pela ativação excessiva de receptores endossômicos TLRs, especialmente TLR7, TLR8 e TLR9 (LAI *et al.*, 2017). NAPOLITANI *et al.* (2005) notaram que o estímulo sinérgico de diferentes TLRs (TLR3, 4, 7, 8 e 9) ativa células dendríticas (CD), aumentando a produção de IL12 e IL23, com resposta Th1. Esses resultados identificaram um código combinatório pelo qual as CDs discriminam patógenos.

Os TLRs são relevantes na formação de quelóides. Foi demonstrado por imuno-histoquímica que fibroblastos de queleide pode expressar TLR4 ou TLR7. Em análise por RT-PCR, a expressão TLR4 estava aumentada, enquanto a expressão de TLR7 estava diminuída no grupo cicatriz de quelóide, quando comparada à do grupo cicatriz normal. Outro estudo também demonstrou que um agonista do TLR7 poderia inibir efetivamente a hiperplasia do queleide e a recorrência após cirurgia de ressecção quelóide. Esses resultados demonstraram fortemente que a formação de quelóides é afetada pela diminuição do TLR7 e aumento do TLR4 (JIALIANG *et al.*, 2013).

Como referido na literatura, o TLR7 participa da patogênese de doenças virais, autoimunes, como psoríase e LES, e em processos inflamatórios e cicatriciais, como queleide. Por ter várias conexões dentro da resposta imune da pele, o gene TLR7 é de importância para futuros estudos no tema.

Perspectivas

Recentemente, foram demonstrados que vários tipos de células, que fazem a ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa, desempenham papéis importantes na cicatrização de feridas na pele. Após a lesão, as células dendríticas plasmocitóides (pDCs) se infiltram nas feridas da pele ao mesmo tempo que os neutrófilos. Os pDCs detectam ácidos nucleicos derivados do hospedeiro liberados na ferida e produzem transitoriamente interferons do tipo I (IFN- α / β) via mecanismos dependentes de TLR7 e TLR9, cujo processo é crítico para a indução de respostas inflamatórias precoces e reepitelização de lesões de pele.

As células de Langerhans (LCs) são um subconjunto especializado de células dendríticas epidérmicas, que servem como defensor de primeira linha, contribuindo para a vigilância imune epidérmica. LCs epidérmicos aumentados foram observados nas bordas da ferida durante as fases iniciais da cicatrização normal da ferida, embora o mecanismo protetor exato dessas células seja desconhecido. Além disso, foi relatado que um número maior de CLs na epiderme de úlceras nos pés diabéticos se correlaciona com o resultado da cicatrização.

Diferente da célula $\alpha\beta$ T bem definida, a célula $\gamma\delta$ T é um subconjunto de células T que expressam o receptor de reconhecimento de antígeno da célula T (TCR) composto pelas subunidades γ e δ . A subpopulação de células $\gamma\delta$ T na epiderme é conhecida como células T epidérmicas dendríticas (DETC). Nas feridas cutâneas, as células $\gamma\delta$ T podem reconhecer e eliminar queratinócitos danificados, liberar fatores de crescimento, por exemplo, fator de crescimento de fibroblastos-7 (FGF7), fator de crescimento de queratinócitos-1 (KGF1) e fator de crescimento

semelhante à insulina-1 (IGF1), que estimulam proliferação de queratinócitos saudáveis vizinhos.

Em feridas agudas humanas, as células T residentes na pele $\alpha\beta$ - e $\gamma\delta$ -demonstraram produzir ativamente IGF1, enquanto as células T residentes na pele isoladas de feridas crônicas não expressam IGF1 e exibem um estado de não resposta. Além disso, uma subpopulação de células $\gamma\delta$ T produz IFN- γ , melhorando as funções antimicrobiana, antitumoral e outras funções das células NK e $\alpha\beta$ T. Outra subpopulação de células $\gamma\delta$ T produz IL17 e induz a expressão de múltiplas moléculas de defesa do hospedeiro em queratinócitos epidérmicos, promovendo a cicatrização de feridas (LANDÉN, LI, STAHL, 2016).

Ao analisar a expressão gênica da cicatrização, com todas as comparações possíveis realizadas, notou-se maior número de genes diferencialmente expressos no grupo de CT, sendo que nesse grupo os genes apresentaram-se majoritariamente hiperexpressos. Dentre esses, alguns genes hiperexpressos se destacaram, como o CSF3, IGF1, ITGA6, MMP2 e MAPK1, enquanto como hipoexpresso somente o gene FGF10 ou KGF. No geral, as CNT apresentaram metade dos genes hiperexpressos e a metade hipoexpressa, sendo que dois genes destacaram-se: ITGA6 hiperexpresso, e COL1A1 hipoexpresso, nas diferentes comparações.

Ao analisar a expressão gênica da resposta imune, notou-se um importante predomínio de genes diferencialmente expressos no grupo de células-tronco, cerca de 84% do total dos genes, sendo que 93% dos genes foram hiperexpressos no grupo de CT. Dentre esses genes hiperexpressos destacaram-se o TLR7, MAPK1, CCR5, IL2, TRAF6, IRAK1, MAPK8, IL23A, RAG1, IL17A. No geral, as CNT apresentaram genes

hipoexpressos, sendo os genes de destaque TLR9, CXCL8 e IL6 nas diferentes comparações.

Novos estudos são necessários para investigar esses genes preferenciais ou de maior interesse, utilizando gene individual ou mesmo substâncias agonistas e antagonistas para modificar a expressão do mesmo.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O fator de crescimento de queratinócito e a queimadura promoveram um padrão de expressão diferencial de genes na população de CT de queratinócitos de pacientes queimados, sendo os genes relacionados à cicatrização de maior interesse CSF3, IGF1, ITGA6, MMP2, MAPK1, TAGLN, ITGB3, IL10, FGF2 e FGF10 e, relacionados à resposta imune, MAPK1, TLR7, CCR5, IL2, TRAF6, IRAK1, MAPK8, IL23A, RAG1 e IL17A.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Abdallah F, Mijouin L, Pichon C. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:5095293.

Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature Rev Immunol.* 2013;13(9):679-92.

Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84:2302-6.

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:585-601.

Bilousova G, Chen JA, Roop DR. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. *J Invest Dermatol.* 2011;131:857-64.

Bohannon JK, Luan L, Hernandez A, *et al.* Role of G-CSF in monophosphoryl lipid A-mediated augmentation of neutrophil functions after burn injury. *J Leukoc Biol.* 2016;99(4):629-40.

Bohnert KR, McMillan JD, Kumar A. Emerging roles of stress and unfolded protein response pathways in skeletal muscle health and disease. *J Cell Physiol.* 2017;233(1):67-78.

Bonucci J, Gragnani A, Trincado MM, Vincentin V, Correa SAA, Ferreira LM. The role of vitamin C in the gene expression of oxidative stress markers in fibroblasts from burn patients. *Acta Cir Bras.* 2018;33(8):703-12.

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

Carmona LM, Schatz DG. New insights into the evolutionary origins of the recombination-activating gene proteins and V(D)J recombination. *FEBS J.* 2017;284(11):1590-605.

- Carr MJ, Li Y, Rezakhanlou AM Ghahary A. Keratinocyte-releasable factors stimulate the expression of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in human dermal fibroblasts. *J Cell Biochem.* 2016;18(2):308-17.
- Chandra R, Federici S, Németh ZH, Csóka B, Thomas JA, Donnelly R, Zóltan S. Cellular mosaicism for X-linked polymorphisms and IRAK1 expression presents a distinct phenotype and improves survival following sepsis. *J Leukoc Biol.* 2014;95(3):497-507.
- Ching YH, Sutton TL, Pierpont YN, Robson MC, Payne WG. The use of growth factors and other humoral agents to accelerate and enhance burn wound healing. *ePlasty.* 2011;11:e41.
- Chomiski V, Gragnani A, Bonucci J, Correa SAA, Noronha SMR, Ferreira LM. Keratinocyte growth factor and the expression of wound healing-related genes in primary human keratinocytes from burn patients. *Acta Cir Bras.* 2016;31(8)505-12.
- Cornick SM, Noronha SA, Noronha SM, Cezillo MV, Ferreira LM, Gragnani A. Toll like receptors gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir Bras.* 2014;29(3):33-8.
- Dakhore S, Nayer B, Hasegawa K. Human Pluripotent Stem Cell Culture: Current Status, Challenges, and Advancement. *Stem Cells Int.* 2018;2018:7396905.
- de Oliveira CE, Gasparoto TH, Pinheiro CR, Amôr NG, Nogueira MRS, Kaneno R, Garlet GP, Lara VS, Silva JS, Cavassani KA, Campanelli AP. CCR5-dependent homing of T regulatory cells to the tumor microenvironment contributes to skin squamous cell carcinoma development. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(12):2871-80.
- Denzinger M, Link A, Kurz J, Krauss S, Thoma R, Schlensak C, Wendel HP, Krajewski S. Keratinocyte Growth Factor Modified Messenger RNA Accelerating Cell Proliferation and Migration of Keratinocytes. *Nucleic Acid Ther.* 2018;28(6):335-47.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

Dou C, Lay F, Ansari AM, Rees DJ, Ahmed AK, Kovbasnjuk O, Matsangos AE, Du J, Hosseini SM, Steenbergen C, Fox-Talbot K, Tabor AT, Williams JA, Liu L, Marti GP, Harmon JW. Strengthening the skin with topical delivery of keratinocyte growth factor-1 using a novel DNA plasmid. *Mol Ther*. 2014;22(4):752-61.

Duffy L, O'Reilly SC. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: recent and emerging translational developments. *Immunotargets Ther*. 2016;5:69-80.

Duvallet E, Semerano L, Assier E, Falgarone G, Boissier MC. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med*. 2011;43(7):503-11.

Elfil M, Negida A. Sampling methods in Clinical Research; an Educational Review. *Emerg (Tehran)*. 2017;5(1):e52.

Frankel JH, Boe DM, Albright JM, O'Halloran EB, Carter SR, Davis CS, Ramirez L, Burnham EL, Gemelli RL, Afshar M. Age-related immune responses after burn and inhalation injury are associated with altered clinical outcomes. *Exp Gerontol*. 2018;105:78-86.

Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin. *Genes Dev*. 2008;22:976-985.

Girolomoni G, Strohal R, Puig L, Bachelez H, Barker J, Boehncke WH, Prinz JC. The role of IL23A and the IL23/TH17 immune axis in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(10):1616-26.

Graghani A, Rossi MB, Albuquerque JCM, Brito GSS, Aloise AC, Ferreira LM. Fator de crescimento de queratinócitos protegeu queratinócitos humanos cultivados expostos ao estresse oxidativo. *Acta Cir Bras*. 2010;25(1):93-7.

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

Graghani A, Dell'Aquila AM, Doi AM, Müller BR, Lacerda LA, Machado AMO, Ferreira LM. Perfil microbiológico da unidade de queimaduras da

EPM/UNIFESP, São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Cir. Plást. 2014a;29(1):114-9.

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

Greco JA, Pollins AC, Boone BE, Levy SE, Nanney LB. A microarray analysis of temporal gene expression profiles in thermally injured human skin. Burns. 2010;36(2):192-204.

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

Green H. Cultured cells for treatment of disease. Sci Am. 1991;265(5):96-102.

Hook P, Litvinov RI, Kim OV, Xu S, Xu Z, Bennett JS, Alber MS, Weisel JW. Strong Binding of Platelet Integrin α IIb β 3 to Fibrin Clots: Potential Target to Destabilize Thrombi. Sci Rep. 2017;7(1):13001.

Hsu YC, Li L, Fuchs E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. Nat Med. 2014;20(8):847-56.

Itoh N. FGF10: A multifunctional mesenchymal-epithelial signaling growth factor in development, health, and disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2016;28:63-9.

Jeschke MG, Gauglitz GG, Finnerty CC, Kraft R, Mlcak RP, Herndon DN. Survivors versus non survivors post burn: differences in inflammatory and hypermetabolic trajectories. Ann Surg. 2014;259(4):814-23.

Jialiang C, Biwei Z, Hangping Y, Jinghong X. The effect of TLR4/7 on the TGF-beta induced Smad signal transduction pathway in human keloid. Burns. 2013;39:465-72.

Koehler K, Mielke K, Schunck M, Neumann C, Herdegen T, Proksch E. Distinct roles of JNK-1 and ERK-2 isoforms in permeability barrier and wound healing. Eur J Cell Biol. 2011;90(6-7):565-71.

Lacerda LA, Carneiro AC, Oliveira AF, Gragnani A, Ferreira LM. Estudo epidemiológico da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo. *Rev Bras Queimaduras*. 2010; 9(3):82-8.

Lai CY, Su YW, Lin KI, Hsu LC, Chuang TH. Natural modulators of endosomal Toll-Like receptor-mediated psoriatic skin inflammation. *J Immunol Res*. 2017;15 pag.

Lai Y, Gallo RL. Toll-like receptors in skin infectious and inflammatory diseases. *Infect Discord Drug Targets*. 2008;8(3):144-55.

Landén NX, LI D, Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sciences*. 2016;73(20):3861-85.

Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J*. 2007;21:1358–1366.

Li W, Yang J, Cai J, Wang H, Tian H, Huang J, Qiang W, Zhang L, Li H, Li X, Jiang C. Oil Body-Bound Oleosin-rhFGF-10: A Novel Drug Delivery System that Improves Skin Penetration to Accelerate Wound Healing and Hair Growth in Mice. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(10):2177.

Li Y, Wang Y, Zhou L, Liu M, Liang G, Yan R, Jiang Y, Hao J, Zhang X, Hu X, Huang Y, Wang R, Yin Z, Wu J, Luo G, He W. Vy4 T cells inhibit the pro-healing functions of dendritic epidermal T cells to delay skin wound closure through IL17A. *Front Immunol*. 2018;12(9):240.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2011;25(4):402-8.

Miller AC, Rashid RM, Elamin EM. The T in trauma: the Helper T-cell response and the role of immunomodulation in trauma and burn patients. *J Trauma*. 2007;63(6):1407-17.

Moura J, Sørensen A, Leal EC, Svendsen R, Carvalho L, Willemoes RJ, Jørgensen PT, Jenssen H, Wengel J, Dalgaard LT, Carvalho E. microRNA-155 inhibition restores Fibroblast Growth Factor 7 expression in diabetic skin and decreases wound inflammation. *Sci Rep*. 2019;9(1):5836.

- Muhamed I, Sproul E, Ligler FS, Brown AC. Fibrin nanoparticles coupled with keratinocyte growth factor enhance dermal wound healing rate. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019; 11(4):3771-3780.
- Namas RA, Mi Q, Namas R, Almahmoud K, Zaaqoq AM, Abdul-Malak O, Azhar N, Day J, Abboud A, Zamora R, Billiar TR, Vodovotz Y. Insights into the Role of Chemokines, Damage-Associated Molecular Patterns, and Lymphocyte-Derived Mediators from Computational Models of Trauma-Induced Inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2015;10;23(17):1370-87.
- Noel JG, Ramser BJ, Cancelas JA, McCormack FX, Gardner JC. Thermal injury of the skin induces G-CSF-dependent attenuation of EPO-mediated STAT signaling and erythroid differentiation arrest in mice. *Exp Hematol*. 2017;56:16–30.
- Noronha SAAC, Noronha SMR, Lanziani LE, Ipolito MZ, Ferreira LM, Gragnani A. Human beta defensin-4 and keratinocyte growth factor gene expression in cultured keratinocyte and fibroblasts of burned patients. *Acta Cir Bras*. 2014a;29(3):39-43.
- Noronha SAAC, 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*. 2014b;29(3):60-7.
- Noronha SMR, Gragnani A, Pereira TAC, Correa SAA, Bonucci J, Ferreira LM. Aldefluor protocol to sort keratinocytes stem cells from skin. *Acta Cir Bras*. 2017; 32(11):984-94.
- Page RB, Stromberg AJ. Linear methods for analysis and quality control of relative expression ratios from quantitative real-time polymerase chain reaction experiments. *Scientific World J*. 2011;11:1383-93.
- Pan A, Zhong M, Wu H, Peng Y, Xia H, Tang Q, Huang Q, Wei L, Xiao L, Peng C. Topical Application of Keratinocyte Growth Factor Conjugated Gold Nanoparticles Accelerate Wound Healing. *Nanomedicine*. 2018;14(5):1619-28.
- Phillips, JL, Taberlay, PC, Woodworth, AM, Hardy K, Brettingham- Moore KH, Dickinson JL, Holloway AF. Distinct mechanisms of regulation of the ITGA6 and ITGB4 genes by RUNX1 in myeloid cells. *J Cell Physiol*. 2018;233:3439–53.

Plichta JK, Gao X, Lin H, Dong Q, Toh E, Nelson DE, Gamelli RL, Grice EA, Radek KA. Cutaneous Burn Injury Promotes Shifts in the Bacterial Microbiome in Autologous Donor Skin: Implications for Skin Grafting Outcomes. *Shock*. 2017;48(4):441-8.

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

Porter C, Tompkins RG, Finnerty CC, Sidossis LS, Suman OE, Herndon DN. The metabolic stress response to burn trauma: current understanding and therapies. *Lancet*. 2016;388(10052):1417-26.

Qu Y, Cao C, Wu Q, Huang A, Song Y, Li H, Zuo Y, Chu C, Li J, Man Y1. The dual delivery of KGF and bFGF by collagen membrane to promote skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(6):1508-18.

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*. 2006;2(7):e119.

Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analyzing clinical samples. *Anal Biochem*. 2014;406(26):6471-83.

Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1). pii:e20190418

Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.

Sobral CS, Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM. Inhibition of proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* by KGF in an experimental burn model using human cultured keratinocytes. *Burns*. 2007;33(5):613-20.

Song J, Finnerty CC, Herndon DN, Kraft R, Boehning D, Brooks NC, Tompkins RG, Jeschke MG. Thermal Injury Activates eEF2k-Dependent eEF2 Pathway in Pediatric Patients. *J Parenter Enteral Nutr*. 2012;36(5):596-602.

Steinstraesser L, Alarcon W, Fan MH, Klein RD, Aminlari A, Zuccaro C, Su GL, Wang SC. Thermal injury induces expression of CD14 in human skin. *Burns*. 2002;28(3):223-30.

Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, Smith C. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(16):9118-23.

Toussaint J, Singer AJ. The evaluation and management of thermal injuries: 2014 update. *Clin Exp Emerg Med*. 2014;1(1):8-18.

Toulon A, Breton L, Taylor KR, Tenenhaus M, Bhavsar D, Lanigan C, Rudolph R, Jameson J, Havran WL. A role for human skin-resident T cells in wound healing. *J Exp Med*. 2009;204(4):743-50.

Uluer ET, Vatansever HS, Aydede H, Ozbilgin MK. Keratinocytes derived from embryonic stem cells induce wound healing in mice. *Biotech Histochem*. 2019;94(3):189-98.

Vangelista L, Vento S. The Expanding Therapeutic Perspective of CCR5 Blockade. *Front Immunol*. 2018;8:1981.

Vassalli, G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2019;1–15.

Vaux DL. Research methods: Know when your numbers are significant. *Nature*. 2012;492(7428):180-1.

Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function and homeostasis of the immune system. *Immune Rev*. 2015;266(1):72-92.

Weist BM, Kurd N, Boussier J, Chan SW and Robey EA: Thymic regulatory T cell niche size is dictated by limiting IL-2 from antigen-bearing dendritic cells and feedback competition. *Nat Immunol*. 16:635–641. 2015.

Wolf SE, Tompkins RG, Herndon DN. On the horizon: Research priorities in burns for the next decade. *Surg Clin North Am*. 2014;94(4):917-30.

WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Burn prevention: success stories and lessons learned. World Health Organization 2011. Disponível

em:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/97938/9789241501187_eng.pdf?sequence=1. Acesso em 20/02/2020.

Xu S, Weng X, Wang Y, Lv D, Zeng M, Zhao F, Sun Y. Screening and preliminary validation of T lymphocyte immunoregulation-associated long non-coding RNAs in diabetic foot ulcers. *Mol Med Rep.* 2019;19(3):2368-76.

Yan S, Tsurumi A, Que YA, Ryan CM, Bandyopadhaya A, Morgan AA, Flaherty PJ, Tompkins RG, Rahme LG. Prediction of Multiple Infections After Severe Burn Trauma: a Prospective Cohort Study. *Ann Surg.* 2015;261(4):781-92.

Yang Q, Orman MA, Berthiaume F, Ierapetritou MG, Androulakis IP. Dynamics of short-term gene expression profiling in liver following thermal injury. *J Surg Res.* 2012;176(2):549-58.

Yang RF, Zheng Y, Burrows M, Liu SJ, Wei Z, Nace A, *et al.*. Generation of folliculogenic human epithelial stem cells from induced pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 2014;5:3071.

Yang L, Zheng Z, Zhou Q, Bai X, Fan L, Yang C, Su L, Hu D. miR-155 promotes cutaneous wound healing through enhanced keratinocytes migration by MMP-2. *J Mol Histol.* 2017;48(2):147-55.

Yen TT, Thao DT, Thuoc TL. An overview on keratinocyte growth factor: from the molecular properties to clinical applications. *Protein Pept Lett.* 2014;21(3):306-17.

Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng.* 2010;2010:218142.

Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):68. Published 2019 Feb 26. doi:10.1186/s13287-019-1165-5).

Zhang Q, Carter EA, Ma B, Fischman AJ, Tompkins RG. Burn-related metabolic and signaling changes in rat brain. *J Burn Care & Res.* 2008;29(2):346-52.

Zhang Y, Wang T, He J, Dong J. Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis. *Int Wound J*. 2014;13(3):354-66.

Zhang YM, Zhang ZQ, Liu YY, Zhou X, Shi XH, Jiang Q, Fan DL, Cao C. Requirement of Gαi1/3-Gab1 signaling complex for keratinocyte growth factor-induced PI3K-AKT-mTORC1 activation. *J Invest Dermatol*. 2015;135(1):181-91.

Zhang J, Qiao Q, Liu M, He T, Shi J, Bai X, Zhang Y, Li Y, Cai W, Han S, Guan H, Hu D. IL17 promotes scar formation by inducing macrophage infiltration. *Am J Pathol*. 2018;188(7):1693-702.

Zhou H, Wang L, Zhang C, Hu J, Chen J, Du W, Liu F, Ren W, Wang J, Quan R. Feasibility of repairing full-thickness skin defects by iPSC-derived epithelial stem cells seeded on a human acellular amniotic membrane. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):155.

Zhou Q, Jiang X, Yan W, Dou X. Transgelin 2 overexpression inhibits cervical cancer cell invasion and migration. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):4919-2.

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

- Altman DG. Practical Statistics for Medical Research. London: Chapman & Hall; 1991.
- Comitê de Ética em Pesquisa [internet]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); [citado 2013 Jan 27]. Disponível em: <http://www.unifesp.br/reitoria/orgaos/comites/etica/>
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir. Bras. 2005;20(2):2-9.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

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

APÊNDICE

APÊNDICE I – Parecer Consubstanciado do CEPUNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** FATOR DE CRESCIMENTO DE QUERATINÓCITOS NA EXPRESSÃO GÊNICA DO SISTEMA IMUNOLÓGICO E DA CICATRIZAÇÃO EM CÉLULAS-TRONCO DA PELE DE PACIENTES QUEIMADOS**Pesquisador:** Samuel Marcos Ribeiro de Noronha**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 13545013.7.0000.5505**Instituição Proponente:** Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 238.354**Data da Relatoria:** 19/04/2013**Apresentação do Projeto:**

As queimaduras causadas por diversos tipos de agentes 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 destes traumas são fatais, tornando este tipo de injúria a quarta principal causa de morte por lesões não intencionais nesse país. Os pacientes vitimados por queimaduras possuem alta susceptibilidade a infecções, fator determinante na evolução da área afetada e no sucesso do tratamento clínico, pois está diretamente relacionada às taxas de morbidade e de mortalidade do grupo. A fim de se evitar a entrada e a proliferação de patógenos o organismo possui dois tipos de resposta imune: a imunidade inata (ou natural) e a imunidade adquirida (ou específica). A resposta imune 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. As 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. Sendo assim, avaliar a expressão de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa assim como à cicatrização em diferentes tipos celulares que compõem a epiderme de pacientes queimados torna-se um ponto chave para melhor compreender os mecanismos

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



moleculares subjacentes à resposta produzida por células-tronco da epiderme. Ademais estas células estão inseridas num microambiente no qual os tipos de citocinas e de fatores de crescimento ali presentes desencadeiam um tipo de resposta imunológica que pode não ser a mais adequada para debelar o ataque de micro-organismos após o trauma pela queimadura. Além disso, torna-se relevante também analisar as citocinas produzidas nas inter-relações estabelecidas entre as células envolvidas no processo de cicatrização (principalmente aquelas mais diferenciadas) neste tipo de lesão. Sendo assim, acreditamos que o presente estudo poderá nos trazer preciosas informações acerca de queimaduras e, com isto, propor possíveis mecanismos de se evitar a disseminação da infecção nestes pacientes.

Metodologia proposta do estudo presente: Avaliar a expressão de 84 genes mediadores da resposta imune em células-tronco e de outros 84 genes associados à cicatrização em células diferenciadas da epiderme, além de avaliar o efeito desencadeado pelo KGF nestes mesmos grupos de genes por meio da comparação dos perfis de expressão gênica (arranjos de PCR) de células-tronco de queratinócitos humanos primários provenientes de dois grupos, pacientes sem queimadura e pacientes com queimadura. Serão incluídos doze pacientes neste estudo, sendo seis no grupo controle e seis no grupo experimento, internados na Unidade de Tratamento de Queimaduras da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo que fica no Hospital Universitário, Hospital São Paulo (HU-HSP). Além disso, no intuito de validar os dados de expressão gênica, estes serão confrontados com uma avaliação de expressão de proteínas traduzidas por alguns dos mesmos genes aqui estudados por meio de imunofluorescência.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar um perfil de expressão de genes relacionados ao sistema imune e à cicatrização da resposta local à queimadura em células-tronco e em não-tronco por meio de uma série de ensaios biomoleculares e celulares

Objetivo Secundário:

Possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que sucedem a injúria por queimadura na pele com o intuito de conduzir este tipo de paciente a uma intervenção clínica racional e com embasamento translacional, visando obter a diminuição das taxas de morbimortalidade neste grupo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores descrevem que não há grandes riscos associados aos pacientes que participarão deste estudo, uma vez que os fragmentos de pele aqui empregados seriam descartados após o procedimento cirúrgico

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

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.023-061

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5539-7162

Fax: (11)5571-1062

E-mail: cepunifesp@unifesp.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SÃO PAULO - UNIFESP/
HOSPITAL SÃO PAULO



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo de expressão gênica de células de doadores vítimas de queimadura. Este estudo visará possibilitar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que sucedem a injúria por queimadura na pele com o intuito de conduzir este tipo de paciente a uma intervenção clínica racional e com embasamento translacional, visando obter a diminuição das taxas de morbimortalidade neste grupo.

Sendo assim, avaliar a expressão de genes relacionados à imunidade inata e adaptativa assim como à cicatrização em diferentes tipos celulares que compõem a epiderme de pacientes queimados torna-se um ponto chave para melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à resposta produzida por células-tronco da epiderme.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos obrigatórios apresentados (folha de rosto, projeto de pesquisa e TCLE para o grupo estudo e grupo controle)

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

ndn

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado pelo colegiado .

SAO PAULO, 05 de Abril de 2013

Assinador por:
José Osmar Medina Pestana
(Coordenador)

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

APÊNDICE II – Figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da cicatrização

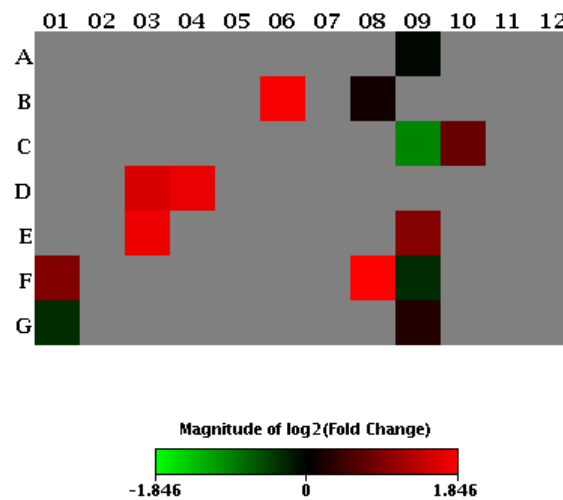


Figura V – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

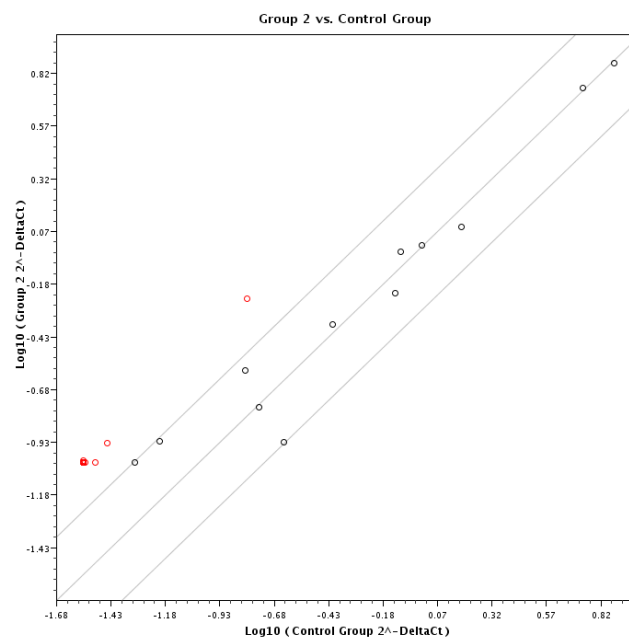


Figura VI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

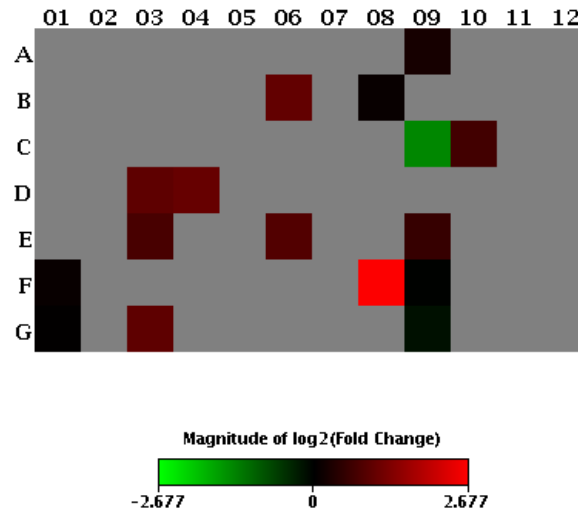


Figura VII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GC+, de CT de queratinócitos (n=10).

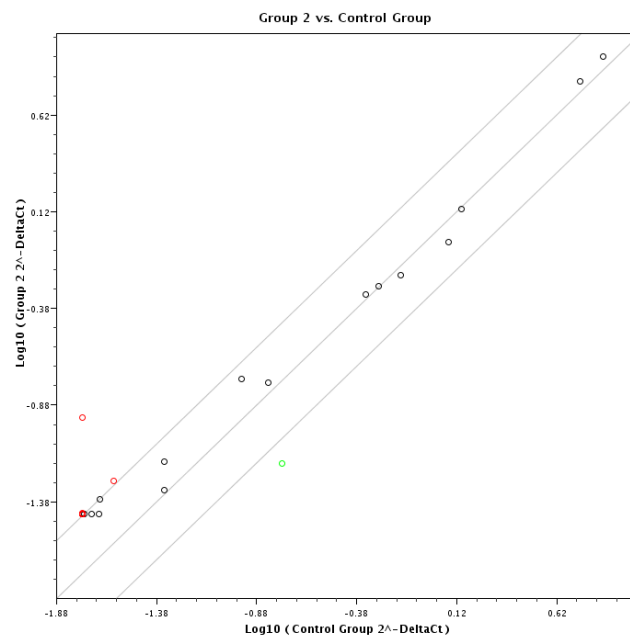


Figura VIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GC+, de CT de queratinócitos (n=10).

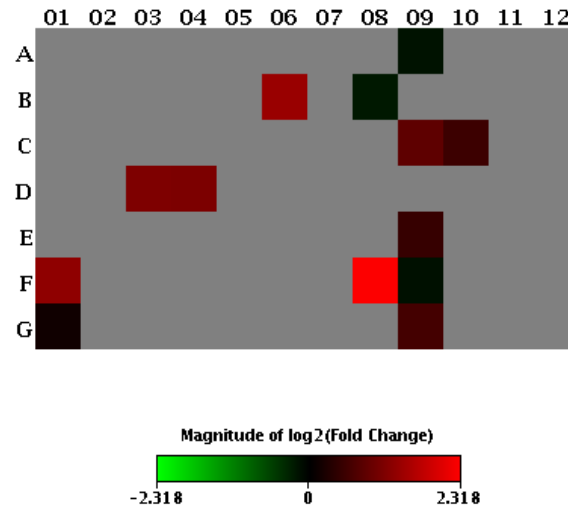


Figura IX – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

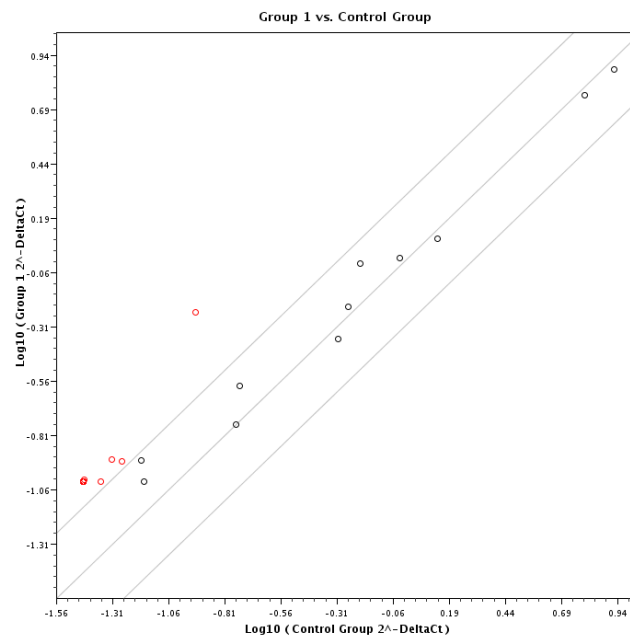


Figura X – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

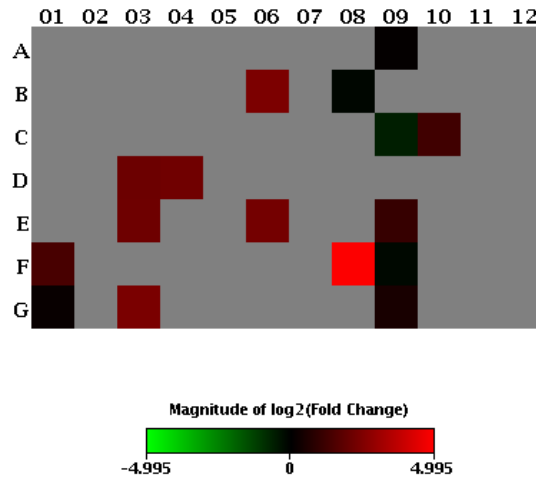


Figura XI – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

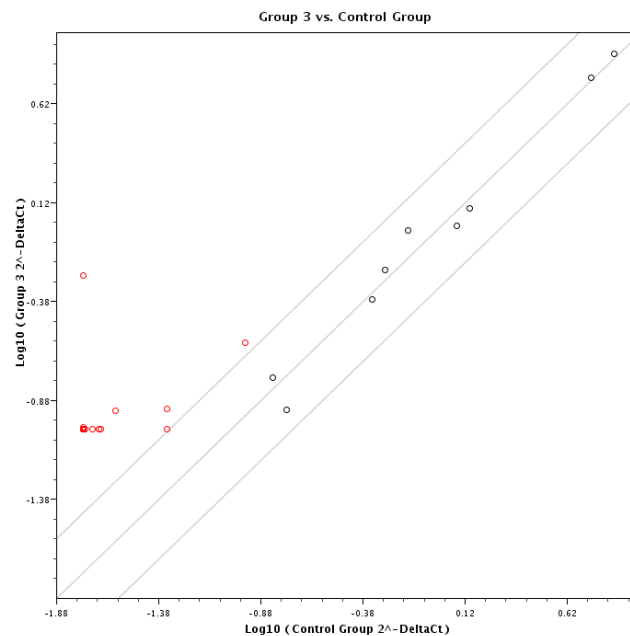


Figura XII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

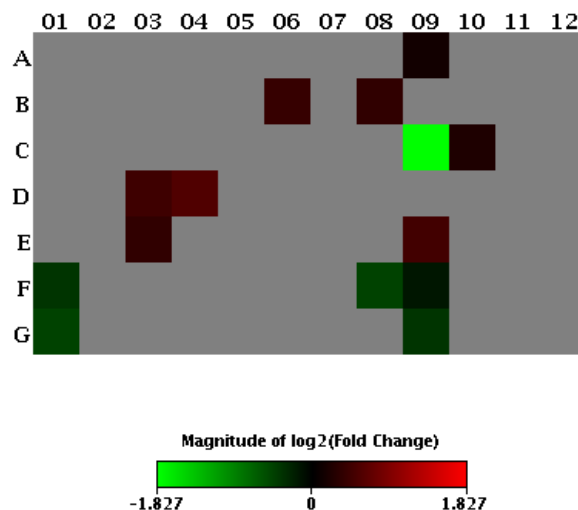


Figura XIII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

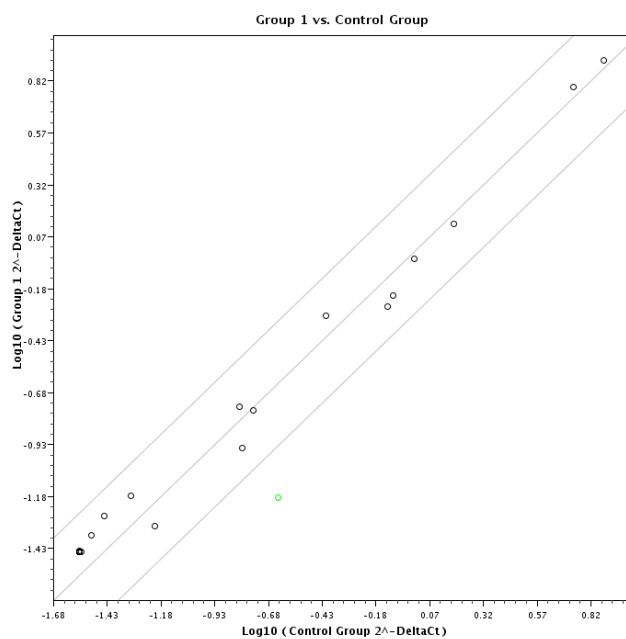


Figura XIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

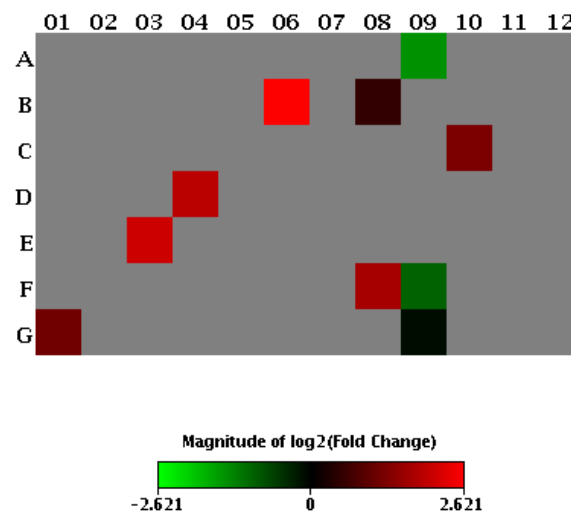


Figura XV – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).

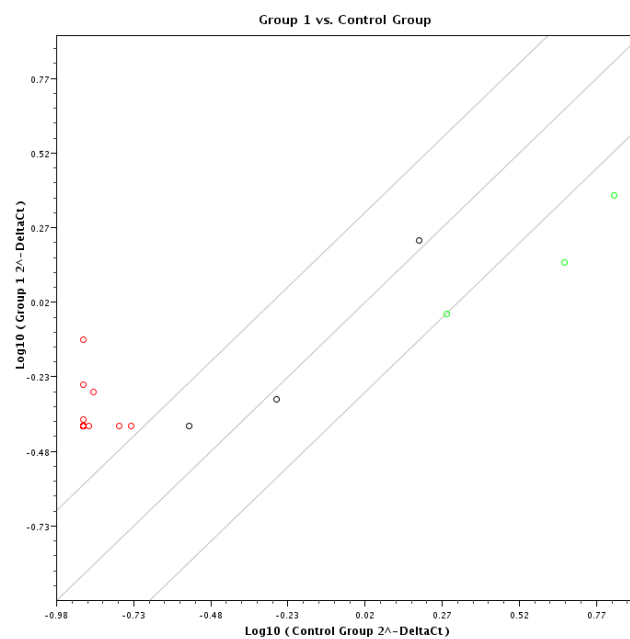


Figura XVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).

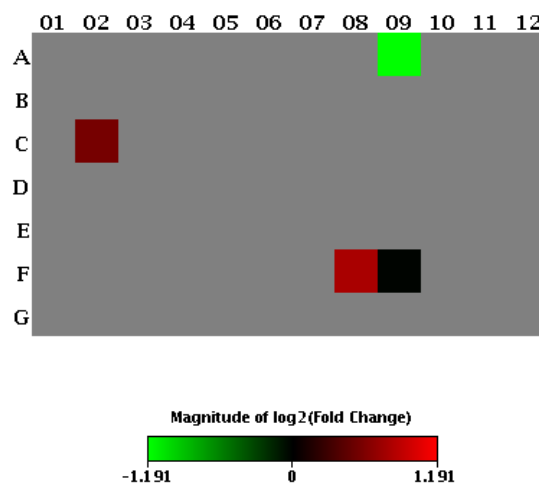


Figura XVII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).

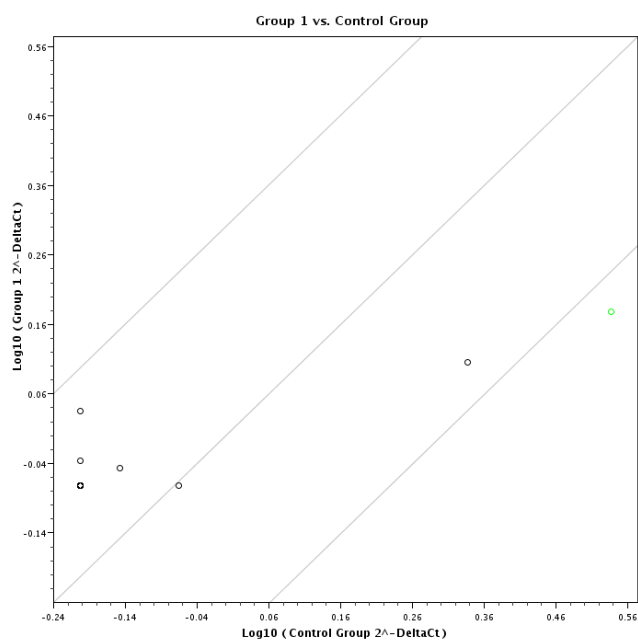


Figura XVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).

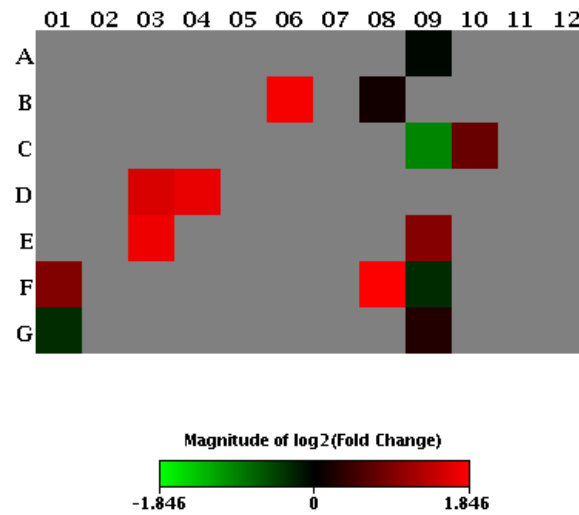


Figura XIX – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).

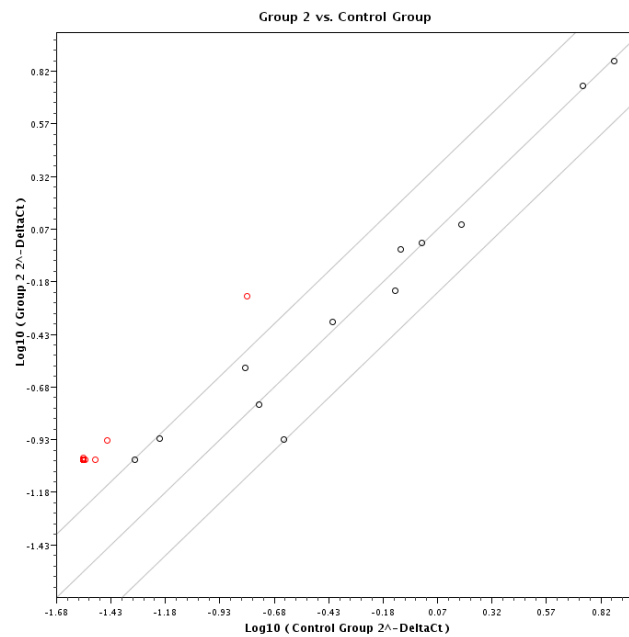


Figura X – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).

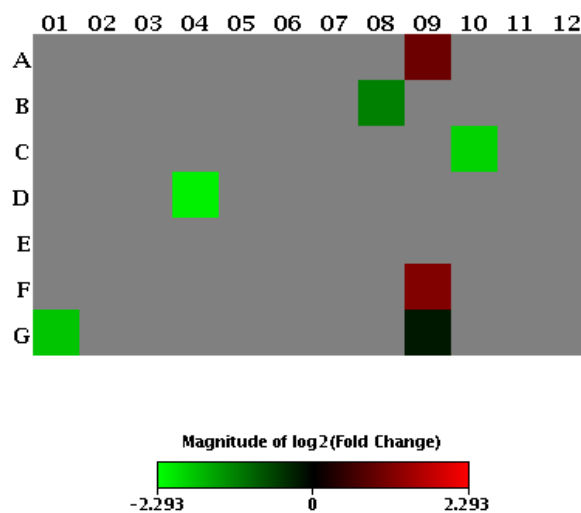


Figura XXI – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).

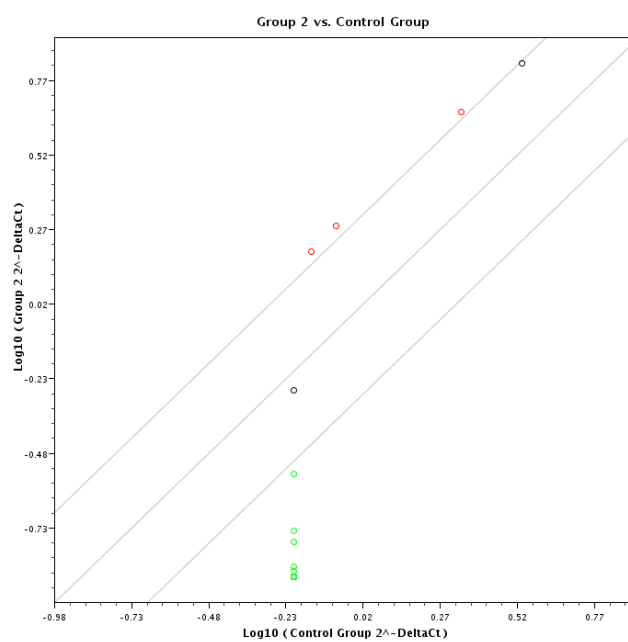


Figura XXII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC- *versus* GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).

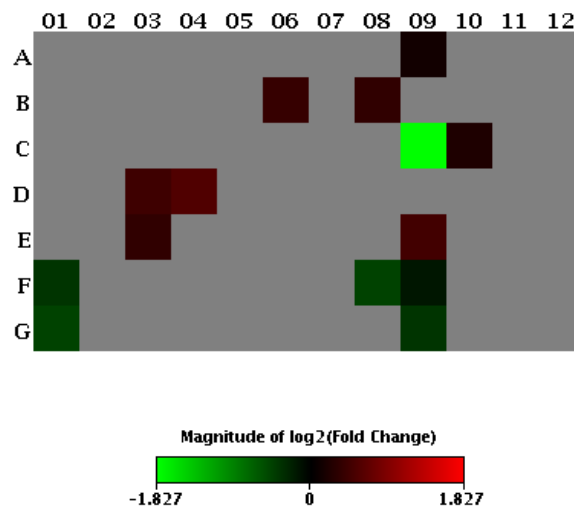


Figura XXIII – Mapa de calor da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).

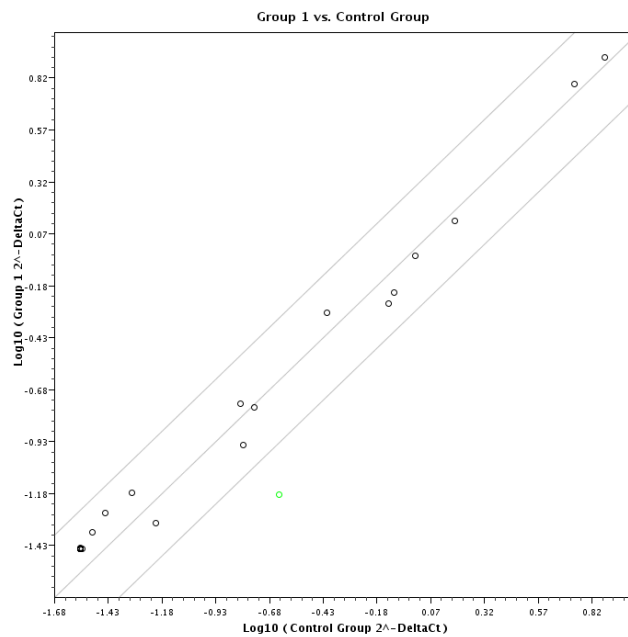


Figura XXIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da cicatrização do GC+ *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).

APÊNDICE III – Figuras dos mapas de calor e dos gráficos de dispersão de cada uma das expressões gênicas relativas da resposta imune

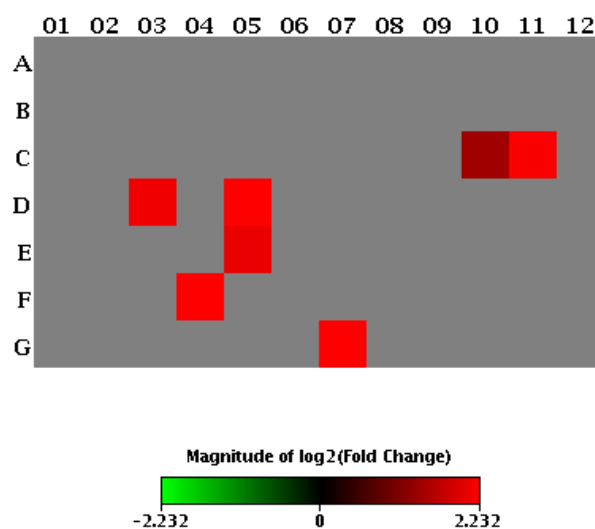


Figura XXV – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

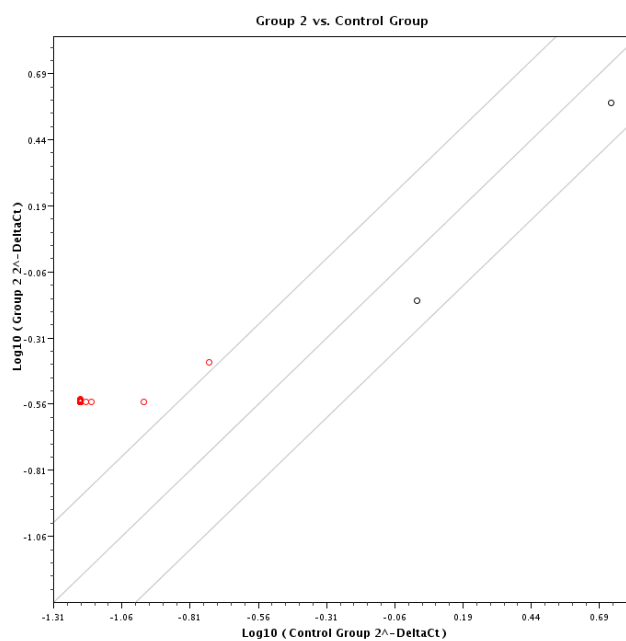


Figura XXVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GQ- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

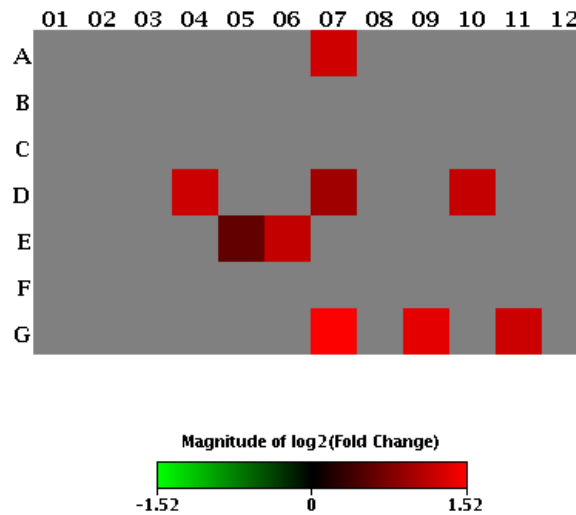


Figura XXVII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GC+, de CT de queratinócitos (n=10).

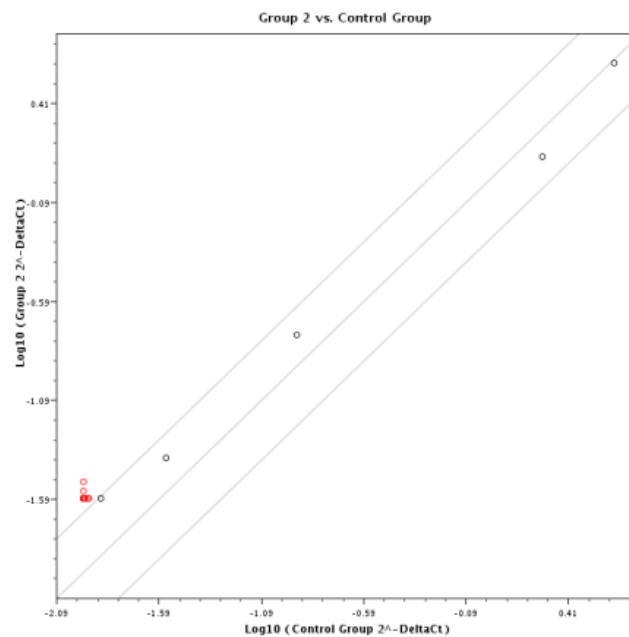


Figura XXVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GC+, de CT de queratinócitos (n=10).

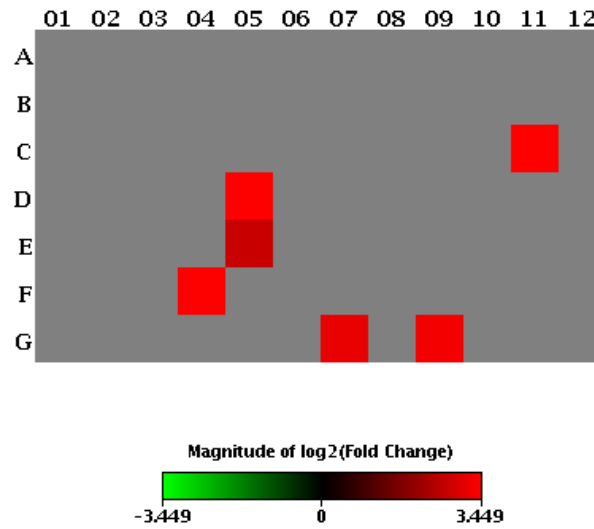


Figura XXIX – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

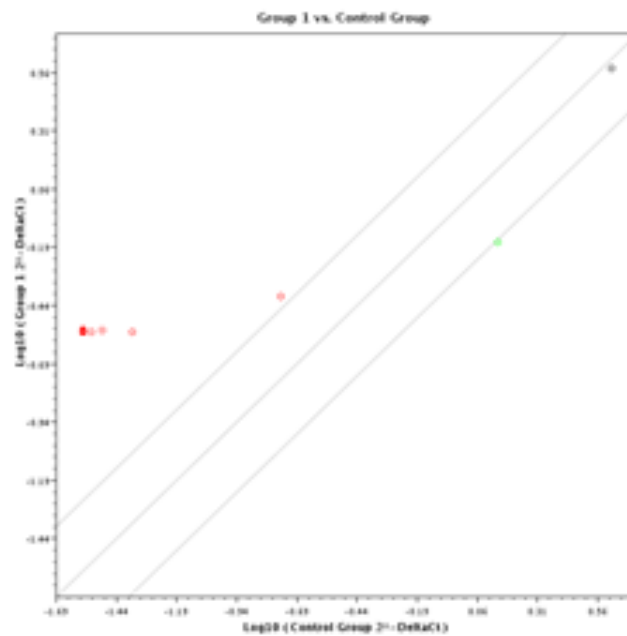


Figura XXX – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

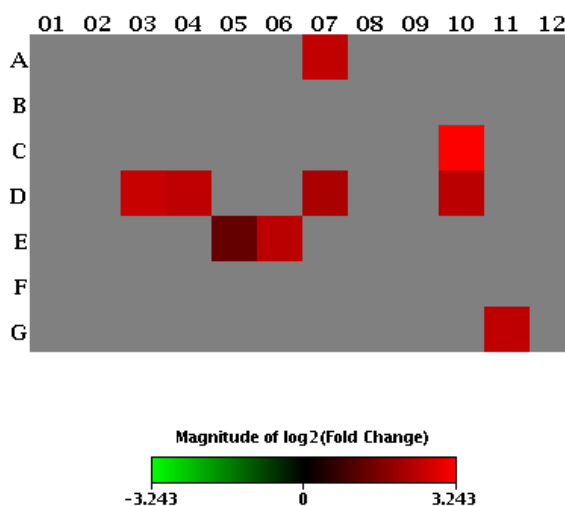


Figura XXXI – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

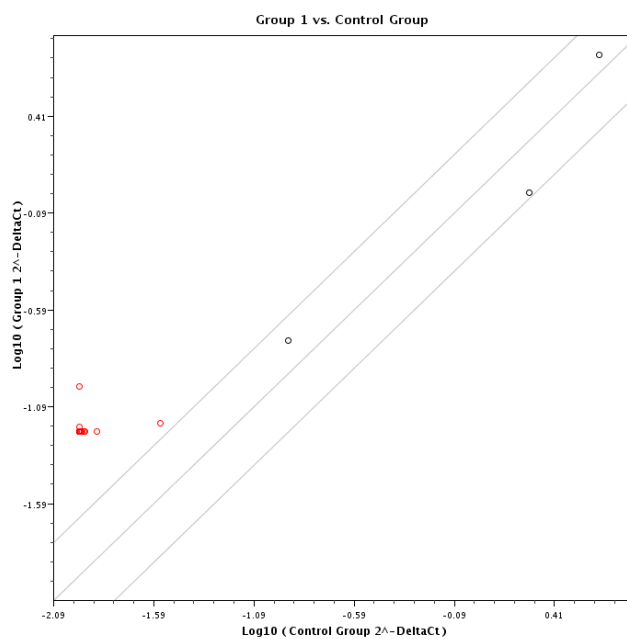


Figura XXXII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

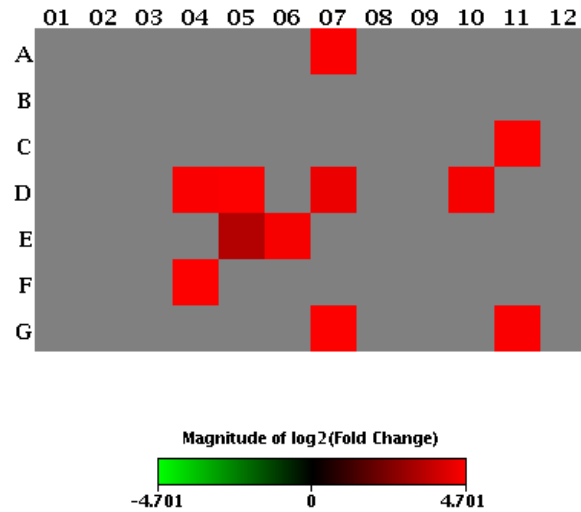


Figura XXXIII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

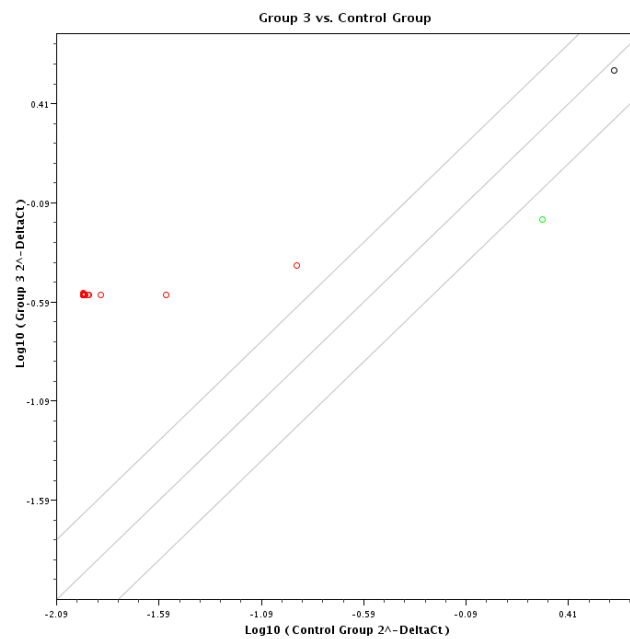


Figura XXXIV – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GQ+, de CT de queratinócitos (n=10).

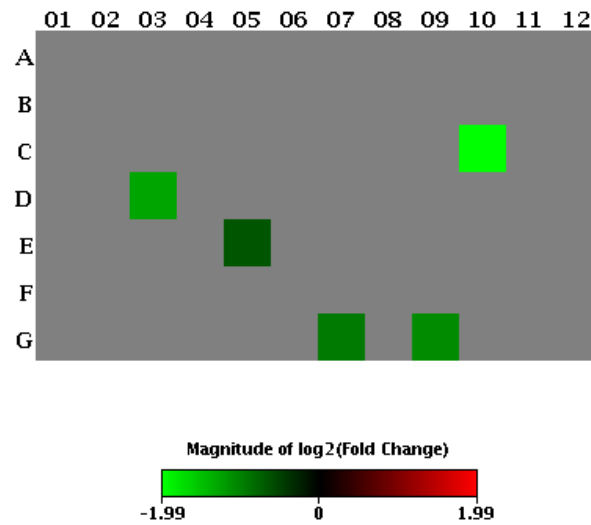


Figura XXXV – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

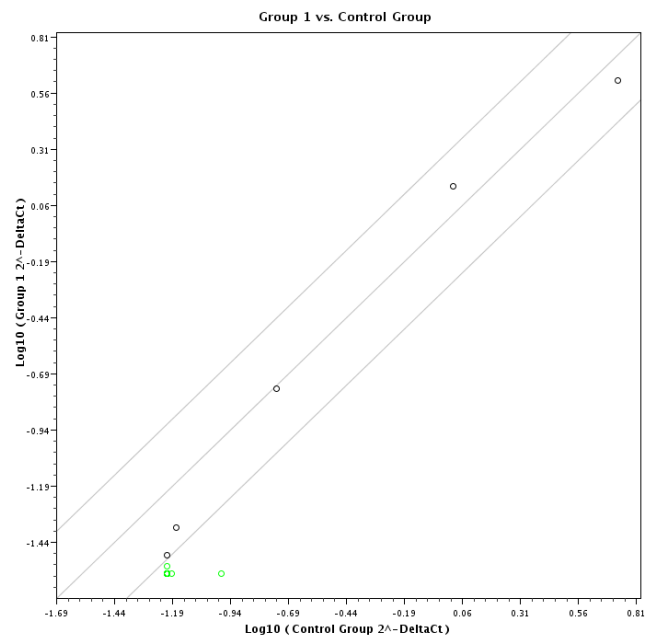


Figura XXXVI – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ-, de CT de queratinócitos (n=10).

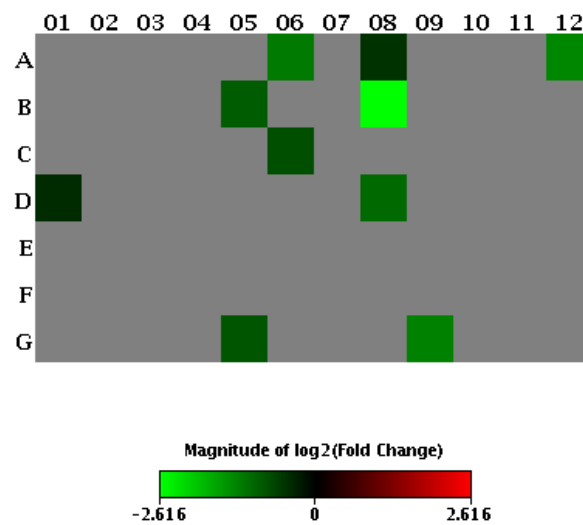


Figura XXXVII – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=10).

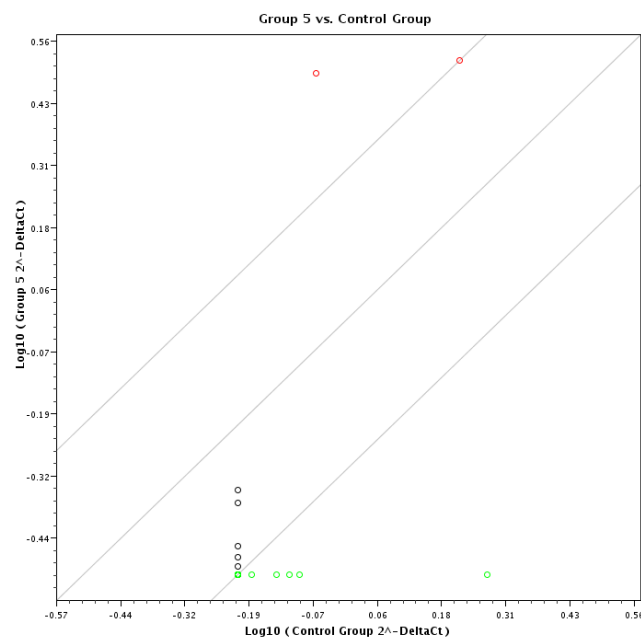


Figura XXXVIII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GQ- *versus* GQ+, de CNT de queratinócitos (n=1-0).

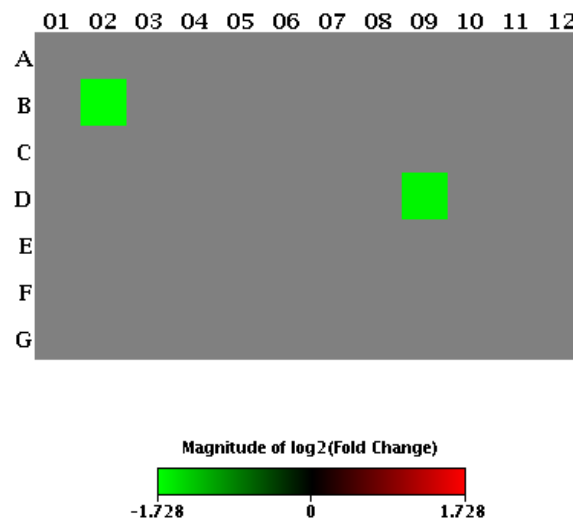


Figura XXXIX – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).

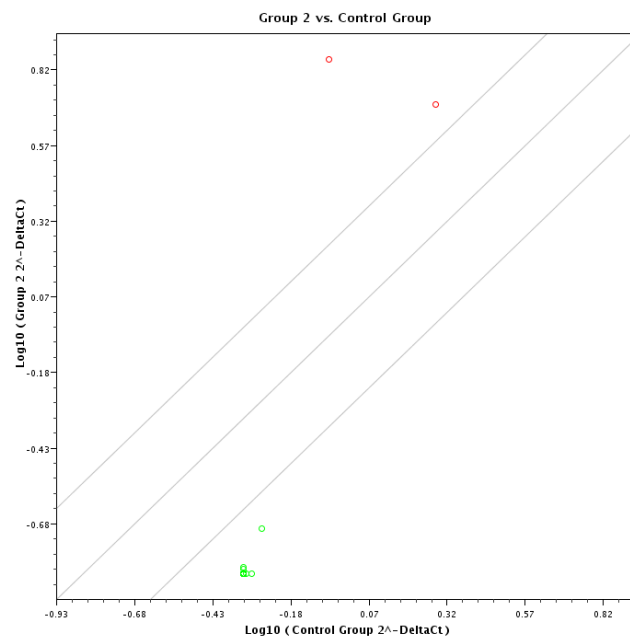


Figura XL – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC- *versus* GC+, de CNT de queratinócitos (n=10).

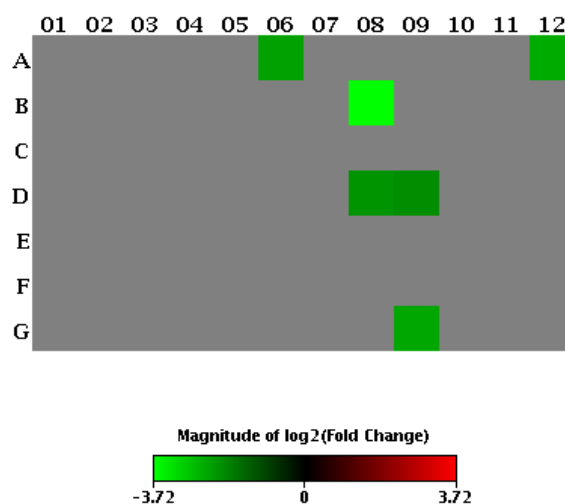


Figura XLI – Mapa de calor da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).

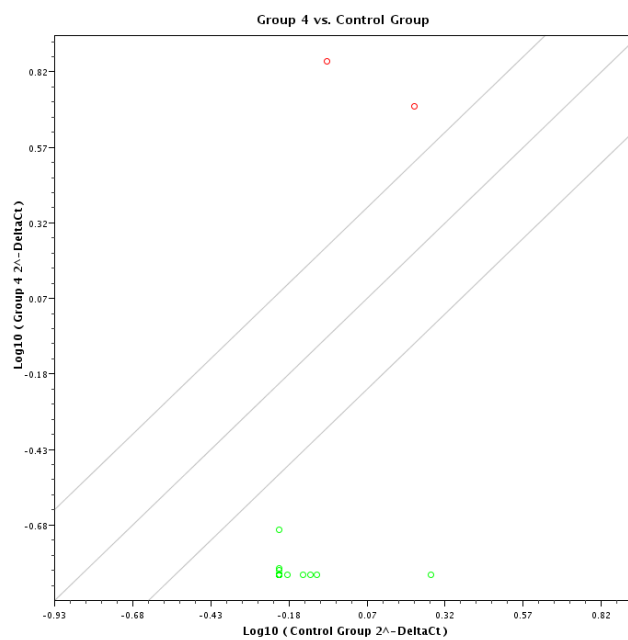


Figura XLII – Gráfico de dispersão da expressão gênica da resposta imune do GC+ *versus* GQ-, de CNT de queratinócitos (n=10).