

SARITA MAC CORNICK

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIA
DE SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES *TOLL-
LIKE* EM QUERATINÓCITOS CULTIVADOS DE
PACIENTES COM QUEIMADURA EXTENSA**

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

SÃO PAULO

2015

SARITA MAC CORNICK

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIA
DE SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES *TOLL-
LIKE* EM QUERATINÓCITOS CULTIVADOS DE
PACIENTES COM QUEIMADURA EXTENSA**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. ALFREDO GRAGNANI FILHO

COORIENTADORES: Prof^ª. SILVANA APARECIDA ALVES CORRÊA

Prof. SAMUEL MARCOS RIBEIRO DE NORONHA

SÃO PAULO

2015

Mac Cornick, Sarita

Expressão de genes relacionados à via de sinalização dos receptores Toll-Like em queratinócitos cultivados de pacientes com queimadura extensa. /

Sarita Mac Cornick -- São Paulo, 2015.

xiii, 94f.

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

Título em inglês: Toll-Like receptors gene expression of human keratinocytes cultured of large burn injury.

1. Expressão Gênica **2.** Receptor *Toll-Like* **3.** Queratinócitos
4. Queimadura **5.** Transdução de Sinal.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL

COORDENADOR: PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Primeiramente a DEUS.

Ao Prof. Dr. Alfredo Gragnani pela oportunidade,

Ao Dr. Rogério pelo incentivo.

E, especialmente aos amigos Jane Dias, Sandra da Silva, Dione Batista V.N. da Silva, Ivan H. Cordeiro e Silvana A. A. Correa, pela força nos momentos difíceis, pelo grande auxílio e atenção.

E a TODAS as pessoas que passaram por minha vida e que de uma forma ou de outra contribuíram para o nascimento desta tese de doutorado.

AGRADECIMENTOS

À PROFESSORA DOUTORA LYDIA MASAKO FERREIRA,
Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM), pela oportunidade e confiança, pelo exemplo de ética e profissionalismo.

Ao PROFESSOR DOUTOR MIGUEL SABINO NETO,
Professor Adjunto Livre-Docente da Disciplina de Cirurgia Plástica, Coordenador do Programa de Pós-Graduação de Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela sua atenção, estímulo constante e orientação em todos os estudos realizados neste Programa.

Ao PROFESSOR DOUTOR ALFREDO GRAGNANI FILHO,
Professor Adjunto da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), orientador deste estudo, por ser um exemplo de professor e pesquisador, pelo seu talento, coerência, competência, pelas suas inúmeras sugestões e pela dedicação.

À PROFESSORA SILVANA APARECIDA ALVES CORRÊA,
Pesquisadora do Programa de Cirurgia Translacional da UNIFESP–Escola Paulista de Medicina, coorientadora da presente tese, pela competência, disponibilidade, dedicação e colaboração imprescindível na finalização

deste trabalho.

Ao **PROFESSOR SAMUEL MARCOS RIBEIRO DE NORONHA**, Pesquisador do Programa de Cirurgia Translacional da UNIFESP–Escola Paulista de Medicina, coorientação da presente tese, pelos ensinamentos ministrados.

À Dra. **DIONE BATISTA VILA-NOVA DA SILVA**, pela amizade, pelas dicas, críticas, comentários e sugestões.

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

AOS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, em especial, Juan Carlos Montano, pelas dicas e orientações.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, Marta Rejane dos Reis Silva, Sandra da Silva e Silvana Aparecida Costa pela atenção, consideração e profissionalismo.

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

*“Todo o conhecimento humano
começou com intuições,
passou daí aos conceitos e
terminou com idéias.”*

(Immanuel Kant)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	x
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	8
3. LITERATURA.....	10
4. MÉTODOS.....	32
5. RESULTADOS.....	46
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÃO.....	64
8. REFERÊNCIAS.....	66
NORMAS ADOTADAS.....	80
ABSTRACT.....	82
ANEXOS.....	84
FONTES CONSULTADAS.....	93

LISTA DE FIGURAS E TABELA

- Figura 01** Demonstração das quatro etapas do PCR Array: 1) Conversão de RNA total em cDNA; 2) Adicionar cDNA ao RT^2 qPCR Master Mix & Aliquot Mixture por toda placa de PCR Array; 3) Correr a placa em aparelho de PCR em tempo real; 4) Análise dos dados de expressão gênica (exemplo retirado do website com amostra de tumor de mama versus mama normal). **43**
- Figura 02** Exemplo de plotagem de dados obtidos de células provenientes de uma mama normal e de um tumor mamário. No gráfico visualizam-se os genes hiperregulados (vermelho) e hiporegulados (verde). **44**
- Figura 03** Plots de Amplificação obtidos após curvas de expressão gênica para pacientes controle e queimados. **48**
- Figura 04** Mapa de calor para vias de sinalização de receptores Toll-Like para queratinócitos de pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho genes, hiperregulados; em verde, genes hiporregulados; e em preto, os genes não regulados. **50**
- Figura 05** Gráfico de dispersão para as vias de sinalização TLR em cultura de queratinócitos de pacientes queimados. Em vermelho genes, hiperregulados; em verde, genes hiporregulados; e em preto, os genes não regulados. **51**
- Figura 06** Genes hipoexpressos para as vias de sinalização TLR em cultivo de queratinócitos de pacientes queimados. **52**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AP-1, proteína 1

AP-1, proteína ativadora 1

ARs, adrenérgicos locais

BM-MSCs, células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea humana

cDNA, Ácido Desoxidenuclêico complementar; do inglês: complementar desoxid ribonucleic acid

CLR, receptores *Toll-like* (RTLs) da família do gene Caterpillar

DA, dermatite atópica

DD, dermatofitoses disseminada

ELISA, ensaio de imunossorvente ligado a enzima

EPI, epinefrina

ES, esclerose sistêmica

FACS, separação celular ativada por fluorescência; do inglês: Fluorescence-activated cell sorting

ICAM -1, molécula de adesão intercelular-1

IL, interleucina

IL-1beta, interleucina 1beta

IL-6, interleucina 6

JO, junções oclusivas

KGF, Fator de Crescimento de Queratinócitos

KC, queratinócitos

LD, dermatofitoses localizada

LPS, Lipopolissacarídeo

LPS, lipopolissarídeo

MALP2, macrófagos lipopéptido-2

MIP-1 alfa, proteínas inflamatórias de macrófagos alfa

MIP-1 beta, proteínas inflamatórias de macrófagos beta

MPC, 2-metacrilóiloxietil fosforilcolina

ncRNA, RNA não-codificante

NF-kB, fator nuclear Kappa

NHKs, queratinócitos neonatais

PAMPs, Vias moleculares associadas ao patógeno; do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*

PCR, Reação em cadeia da Polimerase; do inglês: Polymerase chain reaction

RNA_m/t, Ácido Ribonucléico mensageiro/total, do inglês: *ribonucleic acid*

RPM, rotações por minuto

RTL/RTLs, Receptor/Receptores do tipo *Toll-Like*

RT-PCR, Reação em cadeia da Polimerase em tempo real; do inglês: Real Time Polymerase chain reaction

SCQ, superfície corporal queimada

shRNA, pequeno RNA em grampo; do inglês: small hairpin RNA or short hairpin RNA

siRNA, pequeno RNA de interferência; do inglês: small interfering RNA

STM, trombomodulina solúvel liberada

Th17, macrófago T helper tipo 17

TM, trombomodulina

TNF-alfa, fator de necrose tumoral alfa

TSLP, linfopoiética estromal tímica

UV, ultra-violeta

UVB, radiação ultravioleta B

RAS, receptores adrenérgicos locais

TNF, fator de necrose tumoral

RESUMO

INTRODUÇÃO: A queimadura extensa pode evoluir com infecção grave e sepse com aumento da morbidade e mortalidade. Ocorre um estado contínuo de inflamação e o nível sérico de citocinas é elevado. Os receptores do tipo *Toll-Like* são importantes receptores de células do sistema imune inato que reconhecem antígenos. Portanto, existe a necessidade da obtenção de perfil da expressão gênica da pele em queimaduras extensas para análise inicial. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil de expressão de genes relacionados às vias de receptores *Toll-Like* em amostras de cultura primária de queratinócitos humanos epidérmicos de pacientes com queimadura grave. **MÉTODOS:** Após a obtenção de fragmentos de pele viáveis com e sem queimadura, a cultura de queratinócitos foi iniciada pelo método enzimático utilizando dispase (Sigma-Aldrich) e Tripsina (Sigma-Aldrich). Após o estabelecimento da linhagem celular, estas células foram tratadas com QIAzol Reagent® (Qiagen) para a extração de RNA total. Este foi quantificado e analisado quanto à pureza para se obter cDNA para a análise da expressão de 84 genes específico de vias TLR de placas de *PCR Arrays* (SA Biosciences). **RESULTADOS:** Após a análise da expressão dos genes verificou-se que 21% destes genes estavam expressos diferencialmente, dos quais 100% foram reprimidos ou hiporregulados. Dentre estes, os seguintes genes (vezes de diminuição): HSPA1A (-58), HRAS (-36), MAP2K3 (-23), TOLLIP (-23), RELA (-18), FOS (-16), e TLR1 (-6,0). **CONCLUSÃO:** O perfil da expressão gênica da pele de pacientes com grande queimadura mostrou 21% de genes alterados, destes 100% apresentaram-se hiporregulados.

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

O número de publicações com relação à queimadura é crescente. Nos últimos cinco anos mais de 3.300 artigos relacionados à queimadura de pele tem sido publicados, segundo dados obtidos após pesquisa na base de dados PubMed ao ser utilizados os descritores *skin burn* ou *skin burned*. De acordo com esta mesma base de dados, somente em 2013, aproximadamente 600 novos artigos foram publicados.

Em 2010, 1446 novos artigos foram identificados em revistas científicas. Esse número reflete o contínuo avanço nas pesquisas e no conhecimento sobre os processos que envolvem as vítimas de queimadura (WOLF *et al.*, 2011). Esta área de conhecimento tem uma importância notória, por serem lesões traumáticas de alto custo para o sistema de saúde, além de serem lesões que levam à longa hospitalização e reabilitação, assim como o alto custo do tratamento de feridas e cicatrizes (BRUSSELAERS *et al.*, 2010). O agente causador da queimadura pode ser térmico, elétrico, químico, por radiação e, em especial, os agentes inflamáveis. A morbidade e a mortalidade da queimadura estão relacionadas à extensão da superfície corporal atingida e à profundidade das queimaduras na pele (HERNDON *et al.*, 1989).

As lesões por queimadura são classificadas de acordo com a profundidade, em espessura superficial, espessura parcial superficial e profunda e espessura total (RANGEL & PEREIRA, 2007; TIWARI, 2012). Em relação à extensão das lesões, a superfície corporal queimada (SCQ) é classificada como pequena, quando atinge até 10% de SCQ; média, entre 10 e 25% de SCQ; e grande, quando acomete 25% ou mais de SCQ (NGUYEN *et al.*, 1996; VALE, 2005; EVERS, BHAVSAR, MAILANDER, 2010; DEGIM, *et al.*, 2011).

Em grandes queimados ocorrem várias alterações, entre essas, o choque da queimadura devido ao acometimento da função cardiovascular. A perfusão é insuficiente para manter a oxigenação e nutrição dos tecidos e o catabolismo é acentuado. Queimaduras extensas resultam em choque hipovolêmico e trauma tecidual substancial, que causam a formação e a liberação de muitos mediadores locais e sistêmicos. Tais disfunções cardiovasculares podem exacerbar a resposta inflamatória (KECK *et al.*, 2009).

A perda da função normal da barreira da pele faz com que as condições patológicas mais comuns associadas à queimadura sejam infecção, perda de calor corporal, aumento da perda de água por evaporação e mudanças nas principais funções interativas, como toque e aparência (KECK *et al.*, 2009; REZAEI *et al.*, 2011).

A infecção bacteriana é uma complicação comum em pacientes queimados, pela falta da barreira primária e também pela imunodepressão, além da presença de vários focos infecciosos durante a evolução do tratamento podendo até evoluir para óbito. A bacteremia e a sepsé consecutivas se desenvolvem, e a mortalidade aumenta, sendo que cerca de 75% dos pacientes com queimadura extensa morrem em consequência de uma infecção grave por falência de múltiplos órgãos. Forma invasiva de infecção do tecido subcutâneo desempenha um papel importante, como infecção relacionada à cirurgia e infecção de ferida superficial (SPANHOLTZ *et al.*, 2009).

Em relação a, o calor causa desnaturação de proteínas e perda da integridade da membrana plasmática. Ocorre necrose no centro da lesão, que se torna menos grave na periferia. Alterações tais como edema, perfusão diminuída e infecção promovem a progressão da lesão para a morte celular. Além disso, os danos nas membranas celulares resultam numa cascata dinâmica de mediadores inflamatórios que exacerbam a já anormal permeabilidade celular, agravando a regulação de fluidos e a resposta inflamatória sistêmica (KECK *et al.*, 2009).

A inflamação é um fator importante para promover a reepitelização e a cicatrização da ferida causada pela queimadura. Os efeitos benéficos da inflamação local incluem a retirada de restos celulares, a proteção contra agentes microbianos, além do crescimento e da proliferação celular. Porém, o prolongamento do processo inflamatório agudo dificulta a cicatrização na medida em que o nível elevado de citocinas promove a degradação de colágeno, a apoptose de queratinócitos, o comprometimento vascular e a produção de radicais livres de oxigênio (SHUPP *et al.*, 2010).

Durante a reação inflamatória, observa-se uma alteração hipermetabólica sistêmica com o aumento do catabolismo e com a extensa destruição de proteínas. A estrutura e a função de órgãos essenciais como coração, sistema imunológico, sistema renal e fígado são comprometidos, contribuindo para a falência de múltiplos órgãos aumentando os índices de mortalidade (GAUGLITZ *et al.*, 2008).

Em queimadura extensa, o nível sérico de citocinas aumenta. As citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos que atuam como mediadores primários da resposta inflamatória à injúria térmica promovendo a comunicação entre diversos tipos de células via sinalização autócrina, parácrina e endócrina (GAUGLITZ *et al.*, 2008).

Os *receptores do tipo Toll* (RTLs) são importantes receptores de células do sistema imune inato que reconhecem antígenos. Células do

sistema imune inato do hospedeiro são capazes de reconhecer moléculas padrões associadas ao patógeno (ou *PAMPs*, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*). O primeiro RTL em mamíferos foi descrito em 1997, atualmente existem 13 tipos descritos (NICOTRA *et al.*, 2012), porém 10 RTLs são identificados em humanos até o momento (SCHWACHA *et al.*, 2012). A ativação destes receptores induz a produção de citocinas e de quimiocinas antiinflamatórias (WEST, KOBLANSKY, GHOSH, 2006; DRAGE *et al.*, 2009).

O RTL4 reconhece predominantemente o lipopolissarídeo (LPS) chamado endotoxina, componente das bactérias gram-negativas (TSAN & GAO, 2004). Já o RTL2 reconhece o ligante exógeno lipopeptídico de bactérias Gram positivas (KAWAI & AKIRA, 2007). Após a ligação entre o ligante exógeno e o RTL2, ocorre dimerização do receptor e alterações conformacionais. As vias de sinalização ativadas por estes receptores incluem o gene da resposta primária de diferenciação mielóide (88) (MYD88), o MyD88-dependente e o TIR-domínio adaptador de indução interferon- β (TRIF-dependente). A via MyD88 é utilizada por todos os RTLs, exceto para o RTL3, cuja ativação resulta na ativação dos fatores de transcrição como o fator nuclear *kappaB* (*NF-kappaB*), e a proteína ativadora 1 (*AP-1*). Após a ativação destes fatores, numerosas citocinas pró-inflamatórias são produzidas pelas células, como as interleucinas 6 e

1beta (IL-6, IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (NICOTRA *et al.*, 2012).

A epiderme contém uma camada basal de queratinócitos em constante proliferação. Essas células permanecem aderidas à membrana basal subjacente. Periodicamente, os queratinócitos param seu ciclo celular, se destacam da membrana basal e iniciam um processo de diferenciação terminal enquanto se movem para a superfície da pele. Esse processo gradativo culmina com a formação de três camadas distintas, a espinhosa, a granulosa e a córnea (PINCELLI & MARCONI, 2010).

Pela falta de dados na literatura acerca de um perfil de expressão gênica de RTLs e da interação funcional das vias de sinalização relacionadas a estes receptores em queratinócitos de pacientes queimados, faz-se necessária a aquisição de um perfil da expressão gênica em queimadura extensa para análise inicial e em posteriores projetos relacionados a protocolo de tratamento.

2 OBJETIVO

2. Objetivo

Avaliar a expressão de 84 genes relacionados à via de sinalização dos receptores *Toll-like* em cultura de queratinócitos cultivados de pacientes com extensa queimadura.

3 LITERATURA

3 Literatura

3.1. Receptores *Toll-Like*

MOORE *et al.* (2007) investigaram o padrão temporal de expressão de três importantes famílias de genes de detecção de patógenos e sinalização incluindo os receptores *Toll-like* (RTLs), fator nuclear Kappa (NF-kB), e da família do gene Caterpillar (CLR) em amostras de células mononucleares de sangue periférico de pacientes queimados. Os pacientes com queimaduras menores de 30% de superfície corpórea queimada (SCQ) não apresentavam cultura de sangue infectado ou bacteremia. Isto contrasta com os pacientes queimados em mais de 30% de SCQ, que tiveram infecções nosocomiais, tais como *Acinetobacter*, *Aspergillus* e *Cândida*. Além desses, as culturas de sangue infectadas foram apenas observadas no grupo de pacientes com queimadura grave. Ao estudar a expressão gênica das amostras, verificaram que pacientes com mais de 30% da SCQ apresentavam a redução da expressão dos genes de sinalização NF-kB. Os autores não encontraram correlação entre a expressão dos RTLs e SCQ.

DUAN *et al.* (2009) demonstraram que o polimorfismo 11367 de gene RTL4 mostrou-se fortemente associado com menor capacidade de leucócitos periféricos para a produção de TNF- α e Interleucina-6 em resposta à estimulação *ex vivo* com lipopolissacarídeo em pacientes com trauma no momento da internação. Os resultados do estudo de associação indicaram que pacientes com trauma que carregam o alelo 11367C do gene RTL4 eram menos propensos a ter sepse e disfunção de múltiplos órgãos, podendo ser um bom indicador da probabilidade de desenvolver complicações, como sepse ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos.

CHEN *et al.* (2011) investigaram a relevância clínica de diferentes polimorfismos do gene RTL2 em pacientes com trauma grave. Três polimorfismos foram encontrados na população (n=410), sendo que dois deles, rs1898830 e rs3804099, foram associados com a produção de citocinas por leucócitos de sangue periférico em resposta à estimulação de lipoproteína bacteriana. Já o polimorfismo do gene rs3804099 foi associado com maior taxa de morbidade e sepse em pacientes com trauma grave. Os autores concluíram, portanto, que Polimorfismo do Gene rs3804099 pode ser usado como preditor de risco para o desenvolvimento de sepse e para

maior taxa de mortalidade em pacientes com trauma grave.

WANG *et al.* (2011) demonstraram que lipopolissacarídeo (LPS) estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias em fibroblastos dérmicos. A transfecção das células com siRNA MyD88 elimina a expressão das citocinas. Ao se comparar a expressão gênica de fibroblastos dérmicos cultivados de pacientes com cicatriz hipertrófica, descobriu-se que nos últimos ocorre um aumento da expressão de RTLs e suas moléculas sinalizadoras, bem como de citocinas pró-inflamatórias. Também se descobriu que LPSs induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias em fibroblastos. Com isso, os autores concluem que controlar a inflamação e manipular os RTLs e a sinalização nas células da pele pode resultar em novas estratégias de tratamento para desordens inflamatórias da pele.

SCHWACHA *et al.* (2012) avaliaram o impacto dos RTLs na inflamação induzida por leucócitos circulantes após queimadura. As amostras de cultura de sangue foram responsivas à ativação mediada dos RTL2 e RTL4 resultando na produção de Interleucinas como IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , quimiocina derivada de queratinócitos (KC), proteínas inflamatórias de macrófagos alfa (MIP-1 α) e beta (MIP-1 β). A produção de RTL2 induzida por KC e MIP-1 β foi maior no grupo de 3 a 7 dias após a queimadura, enquanto que a IL-6, IL-10, KC e MIP-1 β .

foram maiores para RTL4 induzida por ativação no grupo de pós-queimadura. Os RTLs são hipermodulados no período de 3 a 7 dias após a queimadura.

BORKOWSKI *et al.* (2015) analisaram danos UV sobre a pele que leva à liberação de RNA não-codificante (ncRNA) a partir de queratinócitos necróticos que ativa o receptor *Toll-like 3* (RTL3). Esta versão do ncRNA desencadeia a inflamação na pele após dano por radiação ultravioleta (UV). Recentemente, a ativação de RTL3 também foi mostrada por ajudar a cicatrização de feridas e aumentar a expressão de genes associados com a reparação da barreira de permeabilidade. Então, procurou-se testar se a reparação da barreira da pele após danos UVB é dependente da ativação de RTL3. Foi observado que múltiplos ncRNAs determinam expressão induzida de genes de reparação da barreira da pele, que o RTL3 ligando (I:C) também induziu a expressão e função das junções, e que o ncRNA U1 atua de um modo dependente-RTL3 para induzir a expressão dos genes de reparo da barreira cutânea. Estas observações foram mostradas por ter relevância funcional como RTL3 *-/-* ratos exibido um atraso na reparação da barreira seguida ao dano UVB. Combinados, estes dados validam ainda mais a conclusão de que o reconhecimento de RNA endógeno, através de RTL3 é um passo importante no programa de reparação da barreira da pele.

3.2. Queratinócitos e Expressão Gênica

KUPPER *et al.* (1987) identificaram que queratinócitos expostos à radiação ultravioleta B (UVB) com comprimento de onda parecido com a radiação solar tiveram um aumento nos níveis de RNAm de IL-1 α e IL-1 β com relação ao grupo controle. Os níveis de RNAm de actina, uma proteína estrutural que pode ser usada como controle, não se modificaram. Assim sendo, a radiação aumentou especificamente a expressão gênica de IL-1.

KOPP *et al.* (2004) demonstraram que feridas de queimadura de 2º grau superficial criadas em porcos apresentaram processo de restauração acelerado a partir de enxertos de pele contendo queratinócitos que hiperexpressavam Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF). Com isso foi demonstrado o poder de reepitelização desse fator de crescimento com sua expressão gênica aumentada em queratinócitos.

BASHIR, SHARMA, WERTH (2009) relataram que queratinócitos primários humanos expostos à radiação UVB e a IL-1 α aumentaram a secreção e os níveis de RNAm de TNF- α . Esses resultados, parecidos

com o de estudos anteriores realizados com fibroblastos por esses mesmos autores, foram atingidos através da extração de RNAm dos queratinócitos, com posterior análise em RT-PCR e *Northern blot*. Os níveis da proteína TNF- α foram quantificados por ELISA.

ZHANG *et al.* (2011) estudaram a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM -1), cuja expressão tem sido detectada em melanócitos em torno de lesões pigmentadas de vitiligo ativas. Deste estudo demonstraram, por meio de FACS e de RT-PCR, que o RNA produzido por queratinócitos ligados a estes melanócitos induziram hiper-regulação de RNAm e da respectiva proteína ICAM-1. Utilizando um lentivírus expressando shRNA, demonstrou-se que em melanócitos humanos, o RTL3 parece ser necessário para a hiper-expressão de ICAM-1. Além disto, utilizando *microarrays*, os autores demonstraram um aumento dramático na produção de transcritos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL10, CXCL11, TNFSF10, CCL5, CCL4, CCL2, IFNB1, CCL20, IL -8, e CCL11). Estas observações sugerem que o RNA liberado de queratinócitos pode atuar como um ligante endógeno para o RTL3 e desta maneira estimular a expressão de ICAM-1 e de outros genes pró-inflamatórios em melanócitos humanos, os quais podem estar envolvidos na patogênese do vitiligo e do trauma físico na pele.

CHEN *et al.* (2013) através de análise por *microarray* e

PCR observaram que a expressão de RTL4 aumentou em feridas de pele de murinos nas fases iniciais. Além disto, o fechamento das feridas excisionais foi significativamente retardado em animais deficientes em RTL4 comparados ao selvagem. E a produção de IL-1beta, de IL-6 e de EGF foi significativamente menor nestes animais. Em estudos *in vitro* estes dados também foram confirmados através da quantificação da expressão do mRNA em queratinócitos epidérmicos humanos normais. Os autores sugerem que a produção de citocinas inflamatórias por queratinócitos cultivados lesionados é estimulada através das vias de sinalização RTL4-JNK e p38-MAPK. Assim, os resultados evidenciam um papel de RTL4 nos locais de lesão tecidual, e sugerem que RTL4 é um importante regulador da inflamação na ferida.

3.3. Expressão Gênica de *Toll-Like* em Queratinócitos

KUBO *et al.* (2014a) mostraram que $\Delta Np63$, um homólogo de p53, predominantemente expresso em queratinócitos e regulados pelo complexo receptor de thymic stromal lymphopoietin (TSLP), que determina a susceptibilidade a auto-derivados de TSLP. A expressão de receptores de TSLP em tecidos da pele e queratinócitos foi avaliada por imuno-histoquímica e RT-PCR quantitativo, e estudos *in vitro* também

foram realizados para examinar a relevância funcional $\Delta Np63$ na expressão de receptores de TSLP constituindo a via autócrina e/ou parácrina de TSLP sob a condição de estímulos aos receptores inatos sensíveis a danos celular. Os resultados mostraram que em queratinócitos normais a epiderme superior preferencialmente expressa receptores de TSLP e inversamente faltava $\Delta Np63$, o qual tem um efeito inibitório sobre a expressão de receptores de TSLP. Curiosamente, foi encontrada na epiderme de lesões de dermatite atópica (DA) muitos queratinócitos com níveis baixos ou indetectáveis de $\Delta Np63$ ($\Delta Np63$ [lo/-]). Além disso, na ausência de $\Delta Np63$, queratinócitos prontamente apresentam TSLP e outras citocinas por estímulos através de receptores *Toll-like 3* (RTL3). Em conjunto com a evidência de que a própria TSLP extrínseca aumenta a produção de TSLP sem $\Delta Np63$ pelos queratinócitos, os resultados indicam que queratinócitos $\Delta Np63$ (lo/-) geram TSLP através de uma via autócrina e/ou parácrina após estimulação de RTL3 em lesões da DA, uma vez que porções de células danificadas e patógenos estimulam produção de RTL3.

KUBO *et al.* (2014b) analisou a epiderme, na qual as junções oclusivas (JO) são especificamente localizadas no estrato granuloso, em que a expressão de $\Delta Np63$, um fator de transcrição da família p53, é atenuado.

Uma vez que a relação entre $\Delta Np63$ e a função de barreira não

foi completamente descoberta, avaliaram-se perfis de expressão de proteínas dessas junções em tecidos da pele e em cultura de queratinócitos. Os resultados mostraram que a expressão de Δ Np63 e que de *claudin-4* foram inversamente correlacionada na epiderme de humanos saudáveis. Em estudos *in vitro* utilizando queratinócitos da linhagem *HaCaT* (*spontaneously transformed aneuploid immortal keratinocyte cell line from adult human skin*) mostrou relevância funcional de Δ Np63 e de *claudin-4*. O ligante do receptor *Toll-like 3* (RTL-3), que é conhecido por ser liberado a partir de células danificadas, suprimiu a expressão Δ Np63 e concomitantemente regulou a expressão de *claudin-4* em queratinócitos primários. Um amplo padrão de expressão de *claudin-4* foi encontrado na epiderme de dermatite atópica (DA), que é uma doença que causa defeito na barreira, que contém queratinócitos Δ Np63-falta como relatado anteriormente. Portanto, a suprarregulação da expressão de *claudin-4* regulada por Δ Np63 pode estar associado a respostas complementares ou pela reparação de queratinócitos danificados com DA.

SHIRLEY *et al.* (2014) examinaram a capacidade de calprotectina, um heterodímero de S100A8 e S100A9, de estimular a proliferação e a migração de melanócitos humanos normais e células de melanoma *in vitro*. Os autores mostraram primeiro, por imunofluorescência

e RT-PCR quantitativa, que as células melanocíticas expressam um receptor de calprotectina, o receptor *toll-like* 4 (RTL-4). Em seguida, demonstraram que calprotectina melhora significativamente a proliferação, a migração e a invasão em matrigel tanto dos melanócitos humanos quanto de células de melanoma normal. Assim, calprotectina é um dos inúmeros fatores parácrinos liberados pela radiação ultravioleta em queratinócitos expostos que podem promover melanomagenese e é um alvo potencial para a prevenção ou tratamento de melanoma.

JEONG *et al.* (2014) investigaram os efeitos de calcitriol sobre a expressão de RTL2, RTL4, peptídeo antimicrobiano LL-37, citocinas pró-inflamatórias e em queratinócitos humanos cultivados. Os níveis de expressão de RNAm para RTL2, RTL4, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1beta e LL-37 cultivados em queratinócitos humanos foram analisados por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) e por transcrição reversa (RT). Além disso, foram medidos os níveis de TNF- α no sobrenadante por um ensaio de imunossorvente ligado a enzima (ELISA) para confirmar o efeito do calcitriol em RTL2 e RTL4. Tal como medido por RT-PCR e PCR em tempo real, encontrou-se que o calcitriol suprimiu a indução mediada por radiação ultravioleta B e lipossacarídeo de expressão de RTL, LL-37 e

das citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β em queratinócitos normais humano. Os níveis de TNF- α no sobrenadante medida por meio de ELISA foram também suprimidos após tratamento com calcitriol. O calcitriol pode regular negativamente a inflamação indicado pela super-expressão de citocinas pró-inflamatórias e LL-37.

NIKITOROWICZ-BUNIAK *et al.* (2014) avaliaram o envolvimento da pele com a fibrose dérmica em esclerose sistêmica (ES), e os queratinócitos como importantes reguladores da função dos fibroblastos através da secreção de agentes de quimio-atração, bem como por meio de fatores de crescimento e citocinas que influenciam o fenótipo e a taxa de proliferação de fibroblastos. Interações epiteliais dos fibroblastos têm um papel importante na formação da fibrose. Os autores caracterizaram a epiderme da ES e avaliaram se as células epidérmicas ES-lesionadas liberam fatores capazes de promover fibrose. Os resultados mostraram que a epiderme da ES é hipertrófica, e alterou a expressão de marcadores de diferenciação terminal involucrina, loricrina, e filagrina. O perfilamento multiplex revelou que o explante de pele da ES liberou níveis aumentados de CCN2 e S100A9. Indução CCN2 foi identificado por estar espalhado na derme papilar, enquanto que S100A9 induziu a proliferação de fibroblastos e reforçou a expressão de CCN2 via RTL4. Estes dados sugerem

que a epiderme da ES forneceu uma importante fonte de CCN2 pró-fibrótica e S100A9 pró-inflamatória na pele da ES, e, por conseguinte, contribui para a inflamação e fibrose observada na doença.

BORKOWSKI & GALLO (2014) investigaram a radiação UV que representa um risco significativo para a saúde humana. Os mecanismos que ajudam as células danificadas por radiação UV de serem reparadas foram recentemente definidos com a observação de que o RTL3 pode ser liberado de queratinócitos necróticos. A ativação de RTL3 na pele induz inflamação e aumenta a expressão de genes envolvidos na reparação da barreira da pele. A ativação de RTL2 na pele pelos produtos microbianos comensais impede a inflamação excessiva, bloqueando a sinalização a jusante de RTL3. Os resultados apontam que o dano induzido por UV e a inflamação na pele é propagada por produtos de acolhimento e regulamentada pelos microorganismos desse meio ambiente.

SETTA-KAFFETZI (2014) avaliou o adaptador de complexo de proteína 1 (AP-1) que é um heterotetrâmero conservado evolutivamente que promove tráfico vesicular entre a rede trans-Golgi e os endossomas. O nocaute da maioria das subunidades complexas AP-1 de murino é embrionariamente letal, por isso a identificação de alelos associados à doença em humanos tem o potencial único para entregar insights sobre a função do gene. O autor relatou duas mutações fundadoras

(c.11T> G [p.Phe4Cys] e c.97C> T [p.Arg33Trp]) em AP1S3, o gene que codifica o complexo AP-1 subunidade $\sigma 1C$, em 15 indivíduos não aparentados com uma severa doença de pele auto inflamatória conhecida como psoríase pustulosa. Uma vez que as variantes estão previstas para desestabilizar a estrutura 3D do complexo AP-1, foram geradas linhagens celulares AP1S3-knockdown para estudar as consequências da deficiência de AP-1 em queratinócitos de pele. Relatado que o silenciamento de AP1S3 interrompeu a translocação endossomal do receptor de reconhecimento de padrão inato de RTL3 e resultou numa inibição acentuada de sinalização à jusante. Estes resultados identificam a psoríase pustular como um fenótipo auto inflamatório causados por defeitos em tráfico vesicular e demonstram uma exigência de AP-1 para a homeostase do receptor do tipo Toll.

DASU *et al.* (2014) apresentaram estudos anteriores que demonstraram que as feridas de pele que geram epinefrina (EPI) podem ativar receptores adrenérgicos locais (RAs), prejudicando a cicatrização. Ativadores em bactérias derivadas de RTLS dentro da ferida iniciam respostas inflamatórias e também pode prejudicar a cicatrização. Os estudos analisaram estas duas vias de diafonia, utilizando EPI e a ativação de macrófagos lipopéptido-2 (MALP2) para ativar os RA e RTL2, respectivamente, em células estaminais (pluripotentes) mesenquimais

derivadas da medula óssea humana (BM-MSCs) e queratinócitos neonatais (NHKs). BM-MSCs expostos a EPI de forma significativa ($p < 0,05$) aumentaram a sinalização de RTL2 (sete vezes, em BM-MSCs), proteína RTL2 (duas vezes), e fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) (quatro vezes). Por outro lado, a ativação de RTL2 por MALP2 nestas células aumentou a sinalização de $\beta 2$ -AR (duas vezes, em BM-MSCs, 2,7 vezes na NHKs), proteína $\beta 2$ -AR (2,5 vezes), a fosforilação da quinase β -AR-activado (p- BARK, duplo), e liberação induzida de EPI de ambos os tipos de células (duas vezes). O tratamento de células com IPE e MALP2 em conjunto, como seria encontrado em uma ferida, aumentou $\beta 2$ -AR e a expressão da proteína p-BARK (seis vezes), a migração celular diminuída (BM-MSCs-21% menor e NHKs-60% menor, $p < 0,002$), e resultou em um aumento de 10 vezes de BM-MSCs e 51 vezes de NHKs, aumentou a liberação da resposta de IL-6 ($p < 0,001$) que foram notavelmente reduzidas pelo pré tratamento com antagonistas de $\beta 2$ -AR. *In vivo*, os animais IMR-estressados exibiram inibição da cicatrização, com níveis elevados de RTL2, MyD88, e IL-6 nas feridas ($p < 0,05$) em relação aos controles não estressados. Portanto, os resultados descreveram um protocolo para diminuir a migração celular exarcebada e a inflamação via *crossstalk* entre as vias de sinalização adrenérgica e as vias de RTL no BM-MSCs e NHKs.

YUMOTO *et al.* (2015) avaliaram a periodontite, uma doença

inflamatória crônica iniciada por um biofilme microbiano formado na bolsa periodontal. O epitélio gengival desempenha papel importante como a primeira barreira física para a invasão bacteriana e em orquestrar a resposta imune inata via RTLs, que reconhecem vários produtos bacterianos, e por manter a sua função. Recentemente foram desenvolvidos produtos de higiene bucal para inibir a aderência bacteriana, reação inflamatória subsequente e proteger o epitélio gengival. Os autores relataram que o polímero de revestimento 2-metacrilóxi-etil fosforilcolina (MPC) diminuiu a adesão bacteriana a queratinócitos humanos por via oral, a RT-7, e com o polímero MPC de gargarejo inibiu o aumento de bactérias orais. Neste estudo, a respeito da possibilidade de aplicação MPC-polímero para evitar a aderência de micróbios patogênicos periodontal, reação inflamatória subsequente e proteção do epitélio gengival, foram examinados os efeitos do polímero MPC sobre a adesão de *Porphyromonas gingivalis*. Este é um importante agente patogênico relacionadas com periodontite, RTL2 e ligante de RT-7 e subsequente produção de interleucina (IL)-8. O polímero MPC de tratamento reduziu significativamente a adesão de *P. gingivalis* em 44% e da produção de IL-8 mediada por RTL2, bloqueando a ligação do seu ligante específico, de uma forma dependente da concentração. Além disso, o pré tratamento com o polímero MPC protegido RT-7 a partir de lesões por agentes químicos irritantes, como o cloreto de cetilpiridínio. Os resultados sugerem que

polímero MPC é potencialmente útil para higiene bucal para prevenir a infecção oral e para manter a função do epitélio oral.

MEISGEN *et al.* (2014) avaliaram queratinócitos que representam a primeira linha de defesa contra patógenos na pele e têm um papel importante na iniciação e regulação da inflamação durante a infecção e autoimunidade. Os autores investigaram o papel de miR-146a na regulação da resposta imune inata de queratinócitos. A estimulação do RTL2 em queratinócitos primários humanos resultou em uma suprarregulação de NF- κ B- e de uma proteína quinase dependente de mitógeno da expressão de miR-146a, que foi duradouro, contrastando com a indução rápida e transitória de mediadores inflamatórios. A supra expressão de miR-146a suprimiu significativamente a produção de IL-8, CCL20, e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que funcionalmente suprimiu a atração quimiotáctica de neutrófilos pelos queratinócitos. A inibição da produção endógena de miR-146a induziu a produção de mediadores inflamatórias em queratinócitos ainda não estimulados, e potenciou o efeito de estimulação de RTL2. O perfilamento transcriptômico revelou que o miR-146a suprime a expressão de um grande número de genes relacionados à imunidade em queratinócitos. MiR-146a suprarregulou a interleucina-1 associada a receptor quinase e um fator associado ao receptor do TNF 6, duas moléculas adaptadoras chave a jusante de sinalização de RTL, e suprimiu a

atividade de NF- κ B de ligação do promotor, como mostrado por experiências de promotor de luciferase. Juntos, estes dados identificam miR-146a como um elemento regulador na imunidade inata de queratinócitos, o que impede a produção de mediadores inflamatórios em condições homeostáticas e serve como um potente regulador de *feedback* negativo após estimulação RTL2.

KIM & KRUEGER (2015) analisaram a psoríase vulgar, que é uma doença inflamatória crônica da pele que resulta da interação complexa entre os queratinócitos, células dendríticas e células T. Os queratinócitos desencadeiam respostas imune inata e adaptativa. As células dendríticas mielóides dérmicas regulam a ativação das células T e a produção de citocinas e quimiocinas que amplificam a inflamação. A maioria das células T de psoríase produzem interferon-gama, interleucina (IL) -17, e IL-22. A fase de iniciação da psoríase envolve receptores do tipo Toll, LL37 peptídeo antimicrobiano e células dendríticas plasmocitóides. Os queratinócitos são o principal tipo de células que expressam receptores de interleucina cutânea e, portanto, o circuito imunitário é amplificado por queratinócitos que suprarregulam RNAm para uma série de produtos inflamatórios.

YU *et al.* (2015) analisaram a interleucina -1beta que emerge como uma citocina mediada pela T helper tipo 17 (Th17) crítica na

patogênese de doenças de pele, incluindo a psoríase. Os queratinócitos psoriáticos são uma importante fonte de IL-1beta. No entanto, os mecanismos que desencadeiam o processamento de IL-1beta permanecem desconhecidos. Recentemente, um de fase aguda no soro proteína amilóide A (SAA) foi identificado como sendo um sinal de perigo que desencadeia a ativação de inflamatosomo e secreção de IL-1beta. Neste estudo, verificou-se aumento de RNAm de SAA e a expressão da proteína em epiderme psoriática. Na cultura de queratinócitos, SAA suprarregula a expressão de pró-IL-1beta e a secreção de IL-1 β madura. Ao nível transcricional, bloqueando o RTL2, RTL4 ou o fator nuclear kappa B (NF- κ B) atenua-se a expressão de RNAm de IL-1 β induzida por SAA. Esta proteína suprarregulou a expressão de caspase-1 e NACHT, LRR e PYD contendo domínio proteína 3 (NLRP3) em queratinócitos. Ao inibir a atividade da caspase-1 e silenciando NLRP3 diminuída pela secreção de IL-1 β , confirma-se o NLRP3 como o inflamatosomo responsivo a SAA em nível de pós-transcricional. O mecanismo de ativação de SAA desencadeando NLRP3 e subsequente secreção de IL-1 β foi encontrado envolver a geração de espécies reativas de oxigênio. Finalmente, a expressão de SAA por queratinócitos foi regulada para cima por IL-17A. Tomados em conjunto, os autores, de acordo com estes resultados indicaram que o derivado de queratinócito SAA desencadeia um mediador inflamatório chave, IL-1 β , através da ativação do inflamatosomo NLRP3,

fornecendo novos alvos potenciais para o tratamento da doença crônica de pele.

OLIVEIRA *et al.* (2015) mostraram que existem poucos estudos sobre o papel da resposta imune inata em dermatofitose. Os autores realizaram estudo para definir a participação de RTL2 e 4, nas dermatofitoses localizada (DL) e disseminada (DD) devido a *T. rubrum*. Foram utilizados neste estudo quinze pacientes recém-diagnosticados, oito pacientes com DL e sete com DD, definidos por envolvimento de pelo menos três segmentos corporais. O grupo controle foi composto por vinte amostras de pele de indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia plástica. RTL2 e RTL4 foram quantificados em lesões cutâneas por imunohistoquímica. A expressão reduzida de RTL4 na epiderme superior e inferior de ambos os pacientes com DL e DD foi encontrado em comparação aos controles. A expressão de RTL2 foi preservada na epiderme superior e inferior de todos os três grupos. A sinalização de RTL4 induz a produção de citocinas inflamatórias e o recrutamento de neutrófilos, a sua expressão reduzida provavelmente contribuiu para a falta de resolução da infecção e a consequente natureza crônica da dermatofitose. Como a expressão de RTL2 atua para limitar o processo inflamatório e preservar a estrutura epidérmica, a sua expressão preservada pode também contribuir para a persistência da infecção e inflamação

limitada que é característico de infecções dermatófitas.

CHENG *et al.* (2015) analisaram queratinócitos expressando trombosmodulina (TM), sendo que a TM solúvel liberada (STM) promove a cicatrização de feridas. No entanto, os efeitos de alto teor de glicose na expressão da TM em queratinócitos e o papel de TM em úlceras diabéticas permanecem obscuros. Estes autores demonstraram que a expressão da TM e do RTL4 estavam diminuídas em alta concentração de glicose de cultura de queratinócitos humanos e em queratinócitos de pacientes diabéticos. Além disso, a ferida causa regulação aumentada de TM sendo que a produção de TMs foi abolida em ambos os de alta glicose em queratinócitos humanos cultivados de pele do rato diabético induzido por estreptozotocina. Além disso, a suplementação de TMs recombinante poderia aumentar a expressão de RTL4 e promover a cicatrização de feridas cutâneas em ambos queratinócitos humanos cultivados e em camundongos diabéticos. No entanto, em camundongos com deleção de RTL4, que exibiram atraso na cicatrização de feridas, o benefício terapêutico dos TMs recombinante foi anulado. Além disso, seus resultados mostraram que a expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) foi regulada de forma dose-dependente pela glicose, e o tratamento com TNF- α regulou negativamente a expressão de TM e de RTL4. Tomados em conjunto, o ambiente de alto teor de glicose reduz a expressão de TM e

RTL4 em queratinócitos, possivelmente através da ação de TNF- α , e das TMs recombinantes, o que pode aumentar a expressão do RTL4 e promover a cicatrização de feridas sob condição diabética.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

O presente estudo possui um delineamento de pesquisa observacional, prospectiva, analítica, experimental, *in vitro*. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e aprovado sob número 72752 de 13/08/2012, da Universidade Federal de São Paulo (**Anexo 1**).

Foram incluídos neste estudo seis (06) pacientes, divididos em dois (2) grupos: três (03) pacientes no grupo grande queimado e três (03) pacientes no grupo controle.

O número de pacientes foi considerado adequado por se tratar de linhagem celular primária estabelecidas no laboratório com a criação de um Banco de Células dessa população, não existindo outras variáveis envolvidas no experimento, além da carga genética celular individual, e por ser realizado o experimento após a segunda passagem, próximo do momento do trauma da queimadura após a obtenção do fragmento de pele. O experimento de PCR é padronizado por ser realizado em *pool* dos pacientes, sendo apresentado valores da média de todos pacientes, comparados ao grupo controle, também realizado em *pool*, sendo realizado em triplicata.

Foi aplicado o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexos 2 e 3**) a todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, dos grupos queimado e controle, respectivamente.

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

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

GRUPO GRANDE QUEIMADO

Critérios de Inclusão

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

Critérios de Não-Inclusão

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

Critérios de Exclusão

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

material extraído.

GRUPO CONTROLE

Idade acima de 18 anos, ambos os sexos, concordaram em participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento, apresentavam necessidade de procedimento operatório – cirurgia estética – abdominoplastia ou mamoplastia, com retirada de pele que foi descartada, não apresentavam doenças prévias, e não eram fumantes.

Instrumentos de Pesquisa

Procedimento operatório

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

Durante essa limpeza operatória, a pele normal adjacente à pele necrosada acaba sendo retirada parcialmente por conta do próprio

procedimento operatório. Como os limites da lesão são irregulares e o instrumento utilizado para a excisão, a faca de *Blair*, não é precisa, parte do tecido vivo é descartado também.

Para os fins desse estudo, a pele íntegra que seria descartada foi aproveitada para a execução do experimento. O material foi enviado ao laboratório para o isolamento das células, cultivo e experimentos.

Cultura de Queratinócitos

O isolamento de células para a cultura de queratinócitos primários humanos foi realizado a partir de fragmentos de pele normais que seriam descartados nos procedimentos operatórios realizados na UTQ-DCP-UNIFESP-HU-HSP.

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

Em uma placa de cultura de 60 mm o fragmento foi colocado e seccionado em pequenos pedaços com tamanho aproximado de 0,5 cm³. Esses fragmentos foram colocados em tubo estéril de 50 ml, com 30 ml de dispase (4,7 U/mL) (Roche REF 04942078001) em DMEM sendo

mantidos refrigerados a 4°C por 15 horas para ação da dispase II humana recombinante.

Após esse período, cada fragmento teve a epiderme destacada delicadamente da derme com o auxílio de pinças e a epiderme foi destinada ao cultivo de queratinócitos pelo protocolo padrão do laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (GRAGNANI, MORGAN, FERREIRA, 2002).

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

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

Extração do RNA total em Queratinócitos

Em cada uma das amostras celulares foi adicionado 750 µl de *QIAzol Lysis Reagent* (Qiagen), agitado vigorosamente e incubado a temperatura ambiente por quinze minutos. Foi adicionado 200µL de clorofórmio com posterior agitação por quinze segundos. Após a incubação de quinze minutos a temperatura ambiente, foi centrifugado o material por quinze minutos a 12.000rpm 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de Eppendorf de 1,5mL, adicionado 500µl de álcool isopropílico, agitado gentilmente e incubado por dez minutos a 12000 rpm a 4°C, sendo o sobrenadante descartado. Etanol 70% foi adicionado e centrifugado novamente por cinco (5) minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi removido e o excesso de álcool foi retirado com a pipeta. Depois de seco, o RNA foi ressuspensão em 50µL de água ultra pura livre de nucleasse e armazenado no freezer -80°C até sua utilização.

Purificação do RNA total

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

Quantificação do RNA total

A quantificação e pureza do RNA foram avaliadas através de espectrofotometria no aparelho *NanoDrop ND-2000* (*Nanodrop Technologies Inc., Rockland, DE*). A absorbância das amostras foi medida nos comprimentos de onda 260nm e 280nm, sendo que $DO_{260}=1$ corresponde a 40ng/ μ l de concentração. Foi considerado RNA de boa qualidade quando a razão DO_{260}/DO_{280} , foi superior a 1,8 (SAMBROOK, FRITSCHI, MANIATIS, 1989).

RT-PCR Array quantitativo

O volume final de RNA de cada paciente de 750ng foi usado para síntese de cDNA. Amostras foram tratadas com o tampão oriundo do *Kit*, e reações de transcrição reversa foram realizadas usando o *RT² First Strand kit da Superarray Bioscience*, de acordo com o protocolo do fabricante.

qRT-PCR foram realizadas usando-se o *RT² Profiler ® PCR array da Superarray Bioscience* (<http://www.sabiosciences.com/howpcarrayworks.php>).

Para cada paciente, 84 genes relevantes envolvidos na transdução da sinalização através de receptores *Toll-like* (código Kit Qiagen- PAHS-018Z) foram analisados. A amplificação, aquisição dos dados, análise de curvas foram realizadas em um ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Em cada curva, cada gene foi checado quanto a eficiência, limiar máximo e mínimo na curva padrão. Para garantir comparações entre curvas, o mesmo limiar foi estabelecido para os cinco (5) genes e corridas: ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 e RPLPO. Foram usados como controle interno e a média do valor Ct foi usado para padronizar a expressão gênica (2^{-Ct}) e determinou a diferença entre os grupos. A expressão gênica foi considerada regulada para cima ou regulada para baixo quando a diferença fosse maior que dois.

A **Figura 1** mostra as quatro etapas do PCR Array para obtenção dos dados de expressão gênica e a **Figura 2** apresenta exemplo de plotagem dos dados de expressão gênica no gráfico de dispersão.

Ambas as figuras a seguir foram retiradas do website:

(http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-011A.html).

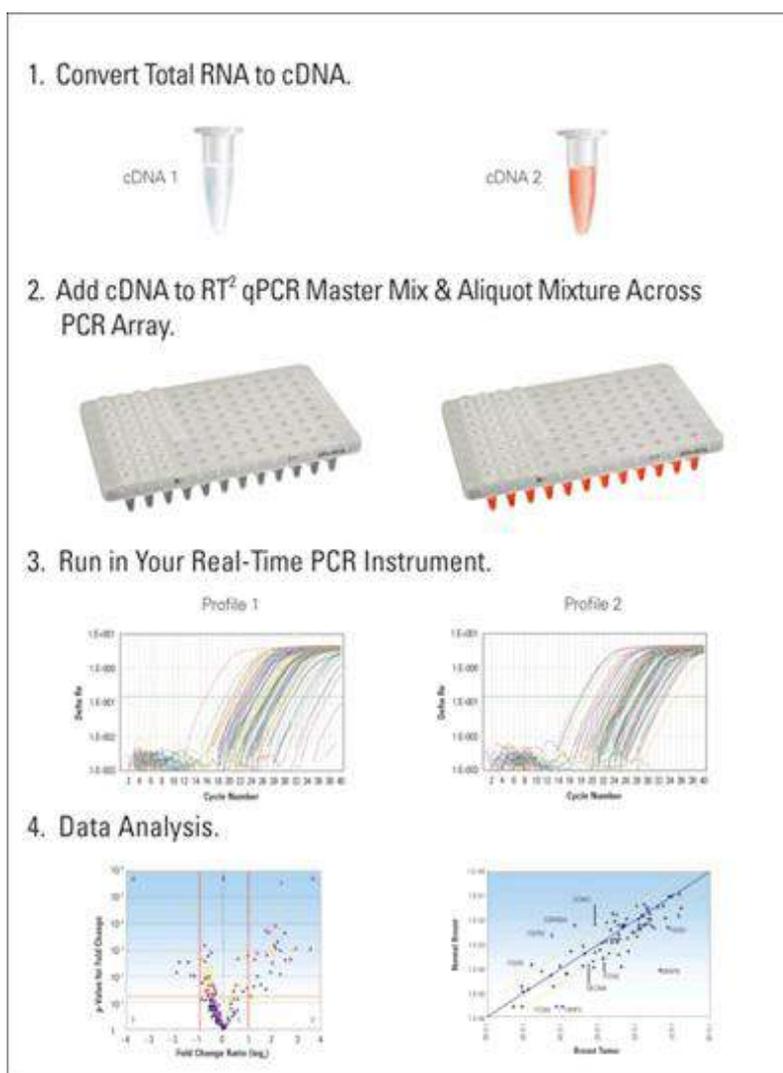


Figura 1 – Demonstração das quatro etapas do PCR Array: 1) Conversão de RNA total em cDNA; 2) Adição de cDNA *ao RT² qPCR Master Mix & Aliquot Mixture* por toda placa de PCR Array; 3) Correr a placa em aparelho de PCR em tempo real; 4) Análise dos dados de expressão gênica (exemplo retirado do *website* com amostra de tumor de mama versus mama normal).

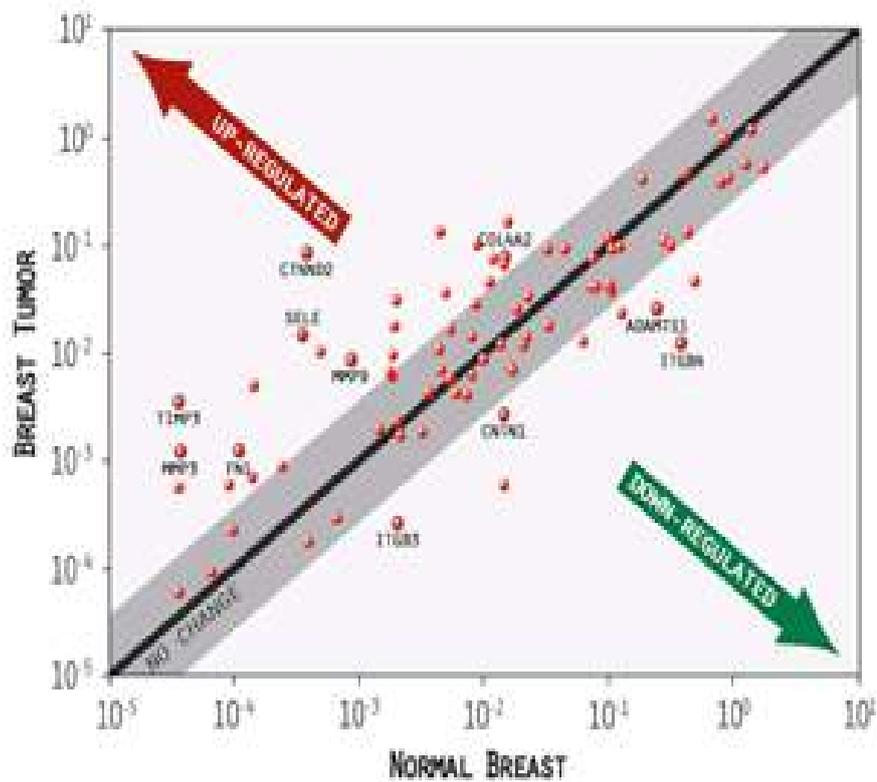


Figura 2 – Exemplo de plotagem de dados obtidos de células provenientes de uma mama normal e de um tumor mamário. No gráfico visualizam-se os genes hiperregulados (vermelho) e hiporregulados (verde).

Análise Estatística

Foi utilizado o teste não paramétrico de *Wilcoxon* para análises pareadas e o de *Friedman* para análises múltiplas. O nível de significância estatística foi fixado em 0,05 e assinalado com asterisco quando os valores apresentaram diferença estatística.

5 RESULTADOS

5. Resultados

Após corrida da placa de PCR *Array* e obtenção dos dados por meio de curvas de amplificação (**Figura 3**) em aparelho Real Time PCR, foram obtidos os dados brutos para a análise dos 84 genes estudados para a via de expressão de receptores *Toll-Like*. Após a obtenção dos dados de *Fold Regulation* e os valores de p , utilizando o programa específico no site da *SA Biosciences*, somente foram selecionados os genes que possuíam valores de p menor que 0,05 e também que apresentaram *Fold Regulation* maior que 2,0 ou menor que -2,0. Assim, observou-se que 21% destes genes foram diferencialmente expressos (**Tabela 1**), dentre estes 100% foram regulados negativamente (**Figuras 4 e 5**).

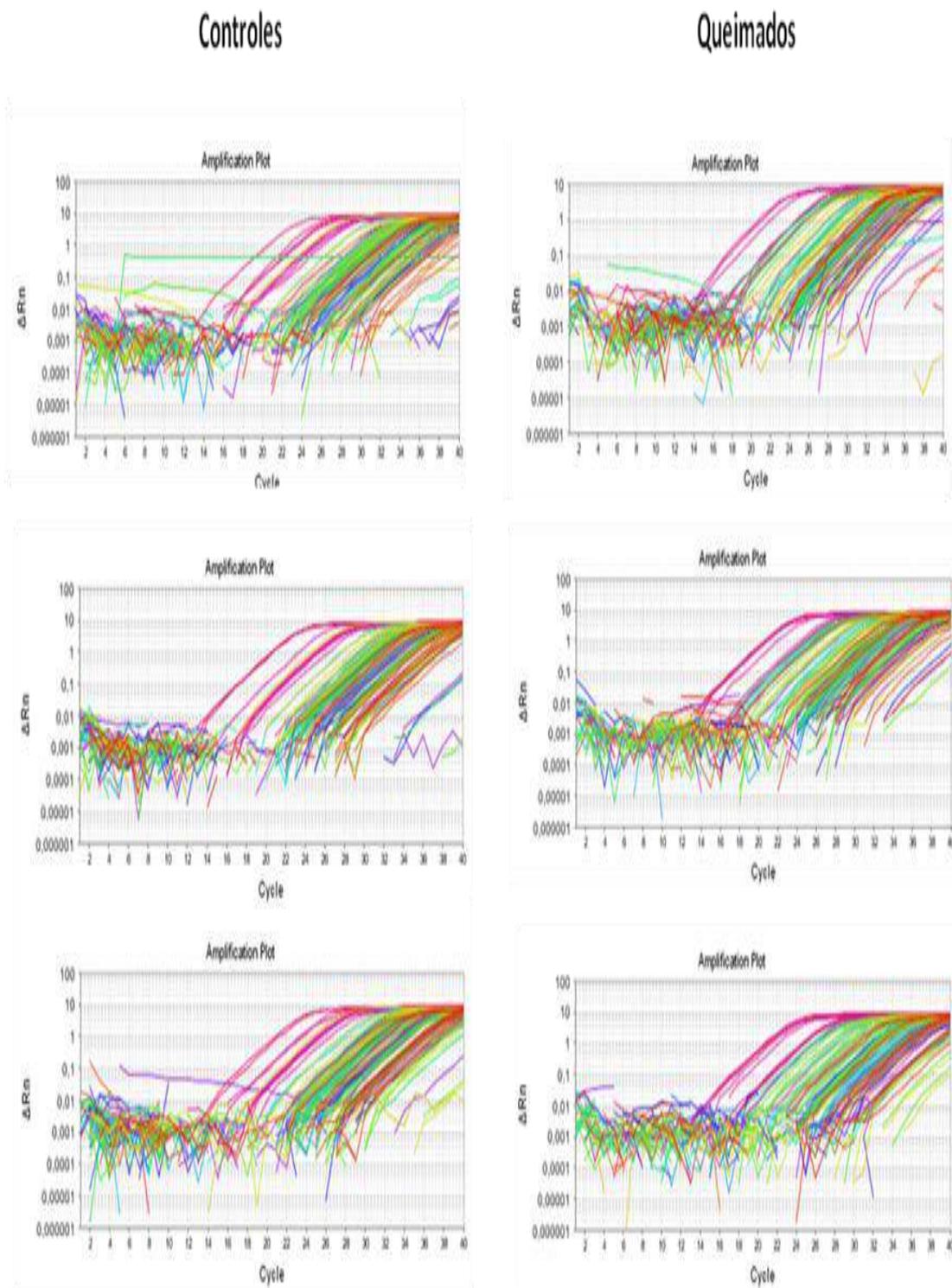


Figura 3 - Plots de Amplificação obtidos após curvas de expressão gênica para pacientes controle e queimados.

Tabela 1 - Os 18 genes diferencialmente expressos (hipoexpressos) após análise da expressão gênica para as vias de sinalização para os receptores Toll-Like, todos com p significativo (em vermelho).

GENES	DESCRIÇÃO	FOLD REGULATION	VALOR DE p
CD86	CD86 molecule	-26,1039	0,001075
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	-16,0914	0,001006
HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	-35,5553	0,005025
HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	-58,205	0,00003
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	-8,9138	0,01725
IRF1	Interferon regulatory factor 1	-13,2128	0,026903
JUN	Jun proto-oncogene	-9,1403	0,016826
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-23,468	0,001859
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	-8,9057	0,012927
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	-8,7216	0,041253
NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	-7,9519	0,034324
PPARA	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-11,0821	0,036433
RELA	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	-17,6243	0,000071
TAB1	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1	-11,3652	0,044825
TLR1	Toll-like receptor 1	-5,9581	0,046205
TNF	Tumor necrosis factor	-28,7301	0,002698
TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	-14,106	0,0045
TOLLIP	Toll interacting protein	-21,9264	0,005648

Teste t de Student.

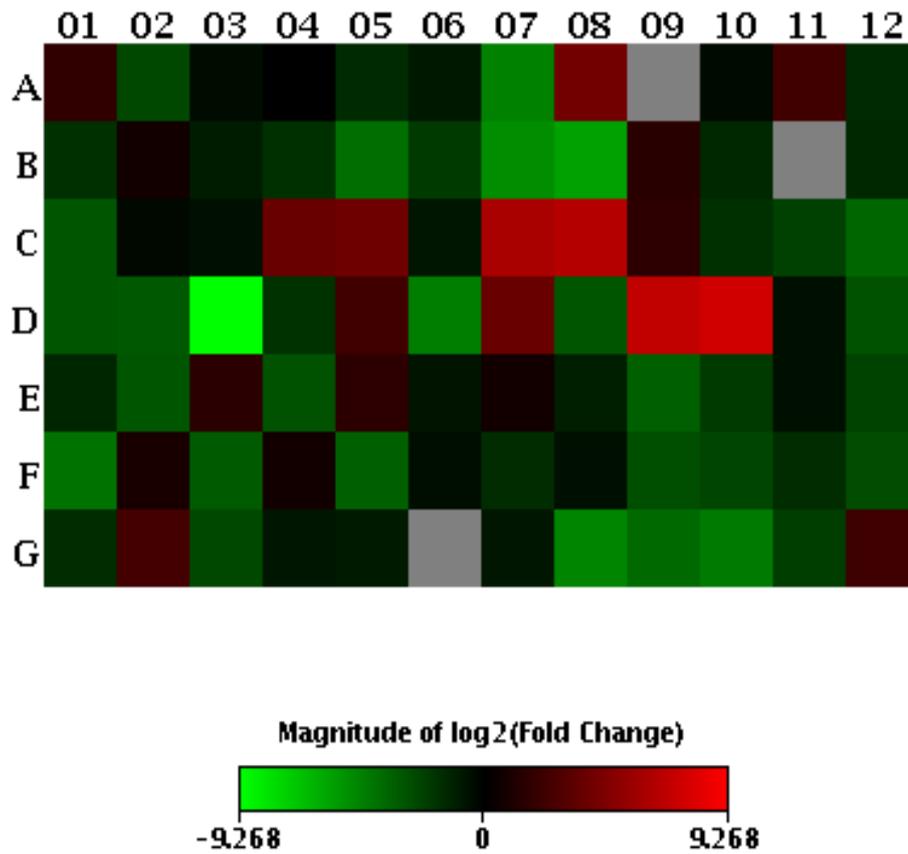


Figura 4 - Mapa de calor para vias de sinalização de receptores Toll-Like para queratinócitos de pacientes queimados em cultivo primário. Em vermelho genes, hiperregulados; em verde, genes hiporregulados; e em preto, os genes não regulados.

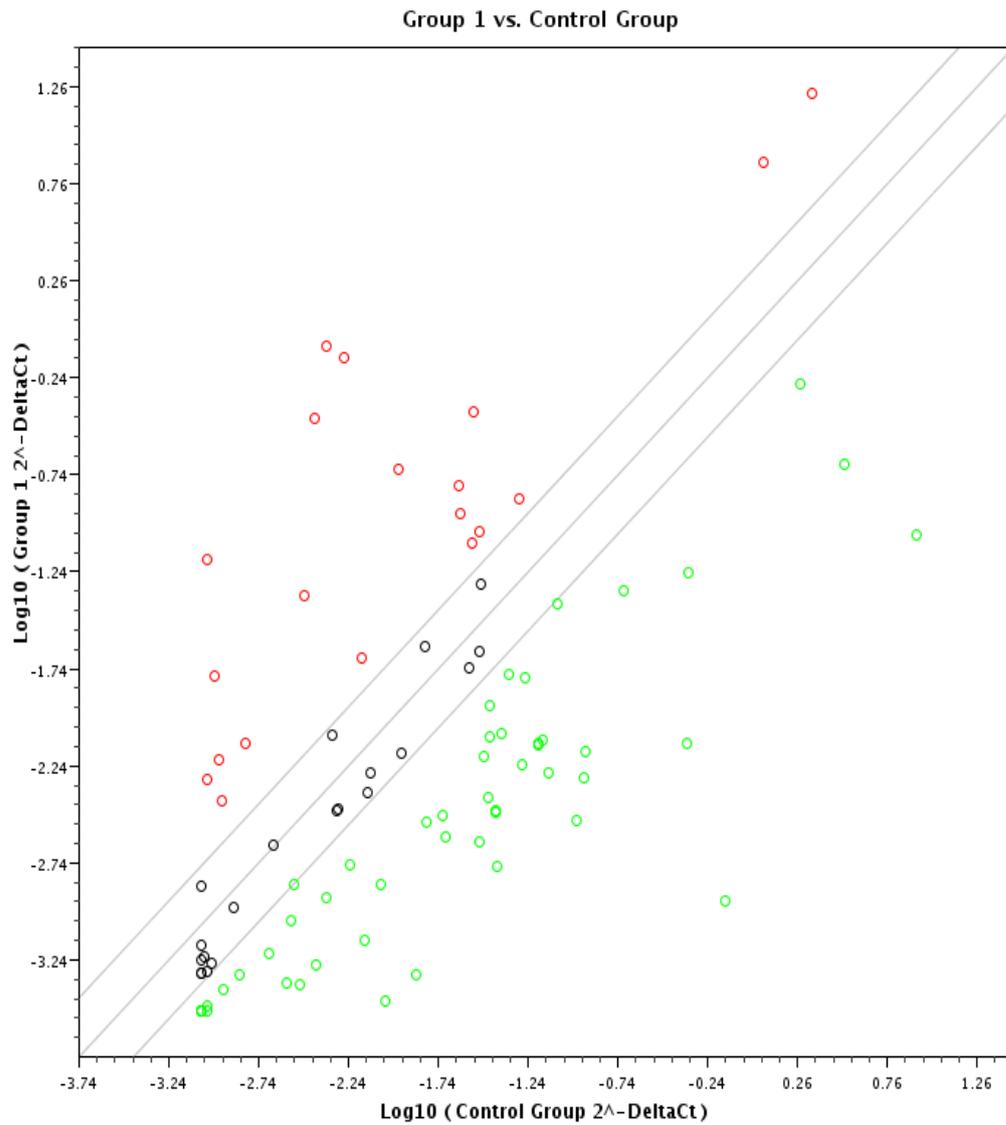


Figura 5 - Gráfico de dispersão para as vias de sinalização RTL em cultura de queratinócitos de pacientes queimados. Em vermelho genes, hiperregulados; em verde, genes hiporregulados; e em preto, os genes não regulados.

Entre genes diferencialmente expressos, destacamos os sete genes mais hipoeexpressos, que foram: HSPA1A (-58 vezes), HRAS (-36 vezes), MAP2K3 (-23 vezes), TOLLIP (-23 vezes), RELA (-18 vezes), FOS (-16 vezes), e TLR1 (-6,0 vezes) (Figura 6).

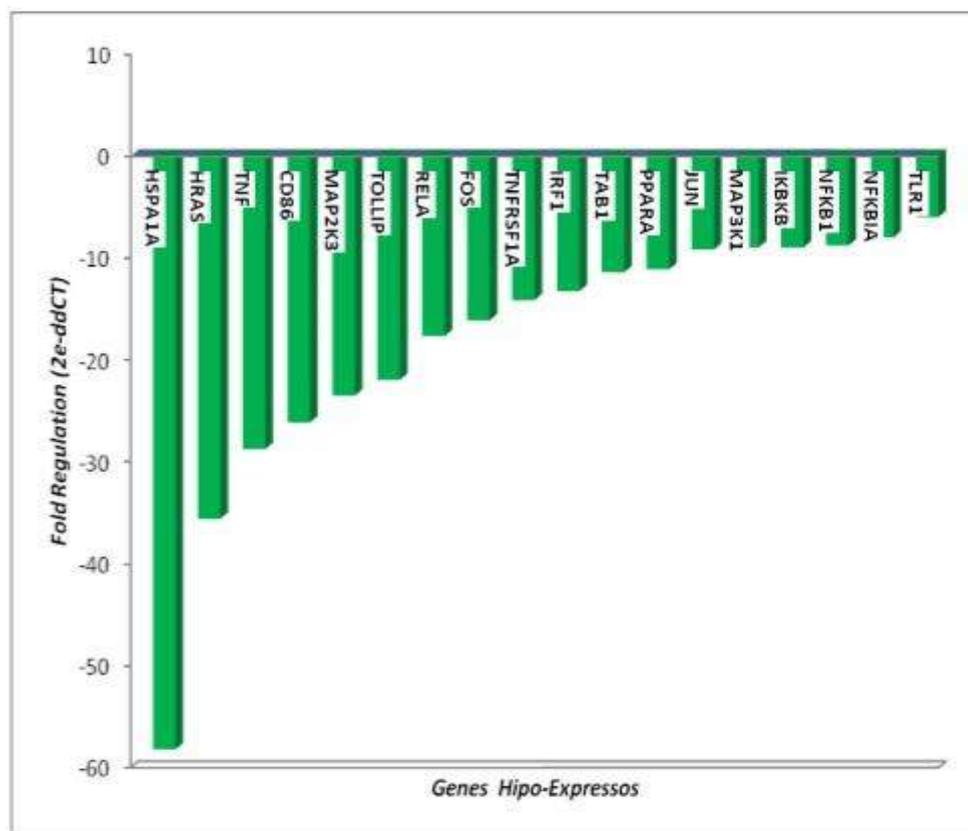


Figura 6 - Genes hipoeexpressos para as vias de sinalização RTL em cultivo de queratinócitos de pacientes queimados.

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

Para atualização da literatura sobre a expressão gênica de *receptores toll-like* (RTL) na pele de pacientes queimados, realizou-se extensa pesquisa, no entanto, até o momento, não foi encontrado nenhum resultado para este tema. A maioria dos artigos que tratam separadamente dos genes envolvidos neste sistema; além disto, são realizados em modelos animais, e algumas vezes foram realizadas análises de proteínas e não de genes, como realizamos no presente trabalho. A seguir foram discutidos alguns genes importantes que apresentaram expressão diminuída em pacientes com queimaduras graves em relação aos controles.

O gene da proteína de choque térmico de 70kDa 1A (HSPA1A) codifica uma proteína de choque térmico que é um membro da família de proteínas de choque térmico 70. Em conjunto com outras proteínas de choque térmico, esta proteína estabiliza proteínas existentes contra a agregação e medeia a dobradura das proteínas recentemente traduzidas no citosol e nas organelas. Para entender melhor as respostas celulares e moleculares para a superexposição a ondas milimétricas, foram investigados alterações no perfil de expressão gênica e histológica da pele após a exposição à radiação de radiofrequência de 35 GHz.

A suprarregulação de HSPA1A em 24 h por 35 GHz por exposição de ondas milimétricas foi confirmada, porém por meio de RT-PCR. Os resultados indicaram que a exposição prolongada a 35 GHz em ondas milimétricas causa estresse e lesão térmica relacionada em pele, enquanto desencadeando processos de reparação que envolve inflamação e matriz extracelular (MILLENBAUGH *et al.*, 2008).

No presente estudo o gene HSPA1A apresentou-se como o gene mais hiporegulado, -58 vezes, sugerindo que no trauma da queimadura, a intensidade de alteração na sua expressão pode levar a alteração do processo de reparação, podendo aprofundar as lesões e estas ficando sem capacidade de restauração ou processo cicatricial normal local.

Oncogene homólogo viral do sarcoma de Harvey em rato (HRAS) pertence à família do oncogene Ras, cujos membros estão relacionados com os genes de transformação de sarcoma por retrovírus em mamíferos. Os produtos codificados por estes genes funcionam em vias de transdução de sinal. Essas proteínas podem se ligar a GTP, GDP, e eles tem uma atividade intrínseca de GTPase. Mutações neste gene estão associadas com melanoma causados pela exposição do sol, e à vários outros tipos de câncer (JIVESKOG *et al.*, 1998).

No presente estudo o gene HRAS apresentou-se como gene hiporegulado, -36 vezes, podendo sugerir a capacidade de alteração relacionada ao controle e gasto energético intracelular dependente de GTP e GTPase.

O gene da proteína ativada por mitógeno quinase 3 (MAP2K3) possui uma proteína quinase de dupla especificidade que pertence à família da MAP quinase. Esta quinase é ativada pelo estresse ambiental, e participa na cascata de sinalização mediada pela MAP quinase. Esta fosforila e ativa a MAPK14 / p38- MAPK. Esta quinase pode ser ativada pela insulina, e é necessária para a expressão do transportador de glicose. A expressão de RAS pode resultar do acúmulo da forma ativa desta quinase, que, assim, leva à ativação constitutiva de MAPK14, e confere a transformação ontogênica de células primárias. Ele está envolvido na resposta protetora para a lesão celular por hipoxia em epitélio pulmonar (POWELL *et al.*, 2004).

No presente estudo o gene MAP2K3 apresentou-se como gene hiporegulado, -23 vezes, podendo sugerir a capacidade de alteração relacionada ao controle da glicemia que no grande queimado é alterada, aparecendo em associação à infecção grave e septicemia. JESCHKE *et al.*

(2014) analisaram retrospectivamente um painel de marcadores biomédicos comuns para seguir a trajetória de pacientes queimados pediátricos em relação à sobrevivência.

Os não sobreviventes apresentaram níveis maiores significante no sangue de IL-6, IL-8, fator estimulante de colônia de granulócitos, proteína quimioatrativa de monócitos -1, proteína-C reativa, glicose, insulina, uréia, creatinina e bilirrubina, sendo que um marcador de não sobrevivente é o aparecimento precoce de resistência à insulina no grande queimado.

O gene da proteína integradora a Toll (TOLLIP) codifica uma proteína de ligação da ubiquitina que interage com vários receptores de tipo *Toll-like* (RTL) de componentes da cascata de sinalização. A proteína codificada regula a sinalização inflamatória e está envolvida com o receptor de tráfico da interleucina-1 e com o volume de quinase associada a IL1R. Os polimorfismos neste gene estão associados com dermatite atópica (SCHIMMING *et al.*, 2007).

No presente estudo o gene TOLLIP apresentou-se como gene hiporegulado, -23 vezes, sugerindo alteração importante na sinalização do processo inflamatório envolvida com a via da interleucina-1 e seu receptor.

Em estudos anteriores do coordenador do grupo de pesquisa, inicialmente foi estudado genes específicos (KGF, TNF- α e IL-1 β) na pele de pacientes com grande e pequena queimadura, sendo que a IL-1 β apresentou hiperexpressa (15 vezes) no grupo grande queimadura, enquanto estava hipoexpresso (28 vezes) no pequeno queimado (GRAGNANI *et al.*, 2013).

Em estudo posterior, onde foram avaliados 84 genes relacionados a marcadores do processo inflamatório por q-PCR na pele de pacientes grande e pequeno queimados, encontrou-se a IL-1beta hiperexpressa no pequeno queimado em valor maior que no grande queimado, respectivamente, 29 versus 2,3 vezes. Como nos dois estudos anteriores, a IL-1beta apresentava-se hiperexpressa no grande queimado, que foi a mesma extensão de queimadura analisada no estudo atual, no qual o gene TOLLIP apresentou hipoexpressão importante, sugerindo que esse gene pode participar na via de sinalização da IL-1 de forma inversamente proporcional, por estar hipoexpresso possibilita o aumento da expressão de IL-1beta no grande queimado (GRAGNANI *et al.*, 2014).

NF-kappa-B é um fator de transcrição onipresente envolvido em vários processos biológicos. Encontra-se no citoplasma em um estado inativo por inibidores específicos. Após a degradação do inibidor, o NF-kappa-B move-se para o núcleo e ativa a transcrição de genes específicos. NF-kappa-B é composto por NFKB1 ou NFKB2 relacionado a REL, RELA, ou RELB.

A forma mais abundante de NF-kappa-B é NFKB1 complexado com o produto deste gene, RELA, gene de codificação da proteína homólogo A do oncogene da reticuloendoteliose aviária viral. RELA tem uma ação na proliferação epidérmica e na regulação da homeostase, um papel profibrogênico na pele, e é identificada uma ligação entre a expressão epidérmica RELA e a esclerose sistêmica. A modulação das ações destas subunidades podem ser benéficas para o tratamento de doenças hiperproliferativas ou fibrogênicas da pele (FULLARD *et al.*, 2013).

No presente estudo o gene RELA apresentou-se como gene hiporegulado, -18 vezes, sugerindo possível alteração na proliferação epidérmica e na regulação da homeostase da pele.

No estudo anterior, onde foram analisados 84 genes marcadores do processo inflamatório em pele de pacientes queimados, observou-se um valor intenso de hipoexpressão (-3873,) de CXCL11, que é um ligante para o receptor da quimiocina CXCR3, e essa interação esta presente em doenças inflamatórias e é regulada por elementos como o fator NF-kappaB que atua no núcleo como um fator transcricional e na resposta imune, conexão com o atual resultado, que também se apresentou hipoexpresso em grande queimado (GRAGNANI *et al.*, 2014).

O oncogene de osteossarcoma FBJ (FOS) responde a estímulos extracelulares e sofre robusta e transiente ativação da transcrição. O gene c-FOS pode ser considerado como alvo para identificar injúria elétrica (GHANDOUR *et al.*, 2014). Um modelo animal de úlceras cutâneas induzidas por radiação em ratos irradiados com 35-55 Gy foi estabelecida pelos autores, e os resultados sugerem que as alterações em c-FOS pode estar relacionada com a má cicatrização da pele da úlcera induzida por radiação (GHANDOUR *et al.*, 2014). No presente estudo, o gene FOS apresentou-se hipoexpresso (-16 vezes), podendo estar envolvido no processo de restauração das lesões, seja em reepitelização alterada em lesões mais superficiais ou na cicatrização alterada em lesões profundas.

O gene *Toll-like receptor 1* (TLR1) é membro da família de receptores de tipo *Toll* (RTL), que desempenha um papel fundamental no reconhecimento do patógeno e ativação da imunidade inata. RTLs foram estudadas a partir de *Drosophila* e o conhecimento foi transposto para os seres humanos por partilharem semelhanças estruturais e funcionais. Eles reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) que são expressos em agentes infecciosos, e medeia a produção de citocinas necessárias para o desenvolvimento de uma imunidade eficaz. Os polimorfismos de RTL1 estão associados com o aumento da susceptibilidade a infecções da pele e alteração da estrutura da pele. O mecanismo para mediar esse efeito em RTL1 determinando a produção diminuída de citocinas pró-inflamatórias seja devido ao polimorfismo (GU *et al.*, 1999).

O gene RTL1 foi observado nas camadas superiores da epiderme psoriática não lesionais e lesionais, mas não na pele normal. Estes resultados sugerem que RTLs expressas pelos queratinócitos epidérmicos constituem parte do sistema imune inato da pele. A relevância da expressão alterada de RTL continua a ser determinada, em queratinócitos, na psoríase (STAPPERS *et al.*, 2014).

No presente estudo, o gene RTL1 apresentou-se hipoexpresso (-6 vezes), sendo compatível com a evolução clínica habitual dos pacientes grande queimados, em que a infecção é um dos fatores quase sempre presente e determinante da evolução clínica dos pacientes, por existir alteração importante na imunidade inata, ou seja, na resposta adequada nas vias de *Toll-Like* concordante à essa hipoexpressão de RTL1.

Portanto, pode-se observar que os genes acima mencionados, estão implicados na restauração de lesão ou ferida da pele, e em especial na imunidade inata ou primeira defesa do organismo aos agentes de infecção tão presentes no paciente grande queimado. E a expressão reprimida destes genes, que vimos nos resultados do presente estudo, significa uma piora na função da pele como um órgão imune protetor.

Como perspectiva do presente estudo temos a necessidade da continuação desse projeto, expandindo inicialmente para os pacientes que apresentam na sua evolução o quadro de septicemia para podermos comparar a presença de um diagnóstico de infecção apresenta diferenças com o estudo atual que foi realizado em pacientes com o quadro de Síndrome da Resposta Inflamatória sistêmica (SIRS) em que se encontram pacientes grande queimados nos primeiros dias de internação.

Ainda existe a necessidade da realização do estudo relativo à evolução temporal desses pacientes, coletando amostras de pele nos diferentes momentos de excisão da necrose, normalmente são múltiplos atos operatórios e também na fase de enxertia, para ser analisado como se comporta a imunidade inata relacionada a via de sinalização *Toll-Like*.

Este estudo contribuiu para a compreensão de mecanismos moleculares relacionados com as vias de RTL e subjacente à infecção da ferida causada pela queimadura e no paciente queimado relacionada ao desenvolvimento de infecção grave e mortalidade. Além disso, pode fornecer novas estratégias para restaurar a normal expressão destes genes e assim, mudar o processo de cura e melhorar o protocolo de tratamento e a evolução clínica.

Entretanto, estudos futuros sobre estes genes e drogas que possam alterar sua expressão perante o trauma pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias que possam restaurar pacientes com queimaduras na pele de forma mais rápida e eficaz.

7 CONCLUSÃO

7 Conclusão

O perfil da expressão gênica da cultura de queratinócitos epidérmicos de pacientes com grande queimadura mostrou 21% de genes alterados, destes 100% apresentaram-se hiporregulados.

8 REFERÊNCIAS

8. Referências

Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol.* 2009;129(4):994-1001.

Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S. Severe burn injury in Europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care.* 2010;14(5):R188.

Borkowski AW, Kuo IH, Bernard JJ, Yoshida T, Williams MR, Hung NJ, Yu BD, Beck LA, Gallo RL. Toll-like receptor 3 activation is required for normal skin barrier repair following UV damage. *J Invest Dermatol.* 2015;135(2):569-78.

Borkowski AW, Gallo RL. UVB radiation illuminates the role of RTL3 in the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2014;134(9):2315-20.

Chen KH, Gu W, Zeng L, Jiang DP, Zhang LY, Zhou J, et al. Identification of haplotype tag SNPs within the entire RTL2 gene and their clinical relevance in patients with major trauma. *Shock.* 2011; 35(1):35-41.

Chen L, Guo S, Ranzer MJ, DiPietro LA. Toll-like receptor 4 has an essential role in early skin wound healing. *J Invest Dermatol.* 2013;133(1):258-67.

Cheng TL, Lai CH, Chen PK, Cho CF, Hsu YY, Wang KC, Lin WL, Chang BI, Liu SK, Wu YT, Hsu CK, Shi GY, Wu HL.

Thrombomodulin Promotes Diabetic Wound Healing by Regulating Toll-Like Receptor 4 Expression. *J Invest Dermatol.* 2015;135(6):1668-75.

Dasu MR, Ramirez SR, La TD, Gorouhi F, Nguyen C, Lin BR, Mashburn C, Stewart H, Peavy TR, Nolta JA, Isseroff RR. Crosstalk between adrenergic and toll-like receptors in human mesenchymal stem cells and keratinocytes: a recipe for impaired wound healing. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(6):745-59

Degim Z, Celebi N, Alemdaroglu C, Deveci M, Ozturk S, Ozogul C. Evaluation of chitosan gel containing liposome-loaded epidermal growth factor on burn wound healing. *Int Wound J* 2011; 8:343–54.

Drage MG, Pecora ND, Hise AG, Febbraio M, Silverstein RL, Golenbock DT, Boom WH, Harding CV. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol.* 2009;258:29–37.

Duan ZX, Gu W, Zhang LY, Du DY, Hu P, Huang J, et al. Clinical relevance of the TLR4 11367 polymorphism in patients with major trauma. *Arch Surg.*2009;144(12):1144-8.

Evers LH, Bhavsar D, Mailander P. The biology of burn injury. *Experimental Dermatology* 2010;19:777–83.

Fullard N, Moles A, O'Reilly S, van Laar JM, Faini D, Diboll J, Reynolds NJ, Mann DA, Reichelt J, Oakley F. The c-Rel subunit of NF- κ B regulates epidermal homeostasis and promotes skin fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2013;182(6):2109-20.

Gauglitz GG, Song J, Herndon DN, Finnerty CC, Boehning D, Barral J M, Jeschke MG. Characterization of the inflammatory response during acute and post-acute phases after severe burn. *Shock.* 2008;30(5):503-7.

Ghandour NM, Refaiy AE, Omran GA. Cardiac histopathological and immunohistochemical changes due to electric injury in rats. *J Forensic Leg Med.* 2014;23:44-8.

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

Gagnani 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.

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

Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76 (11):5665-8.

Gu Q, Gao Y, Li Y, Yang Z, Zhou J, Wang X, Wang D, Zhao P. Overexpression of c-fos and Rb proteins in radiation-induced skin ulcers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1999;18(4):309-12.

Herndon DN, Barrow RE, Rutan RL, Rutan TC, Desai MH, Abston S. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. *Ann Surg*. 1989; 209:547-52.

Jeong MS, Kim JY, Lee HI, Seo SJ. Calcitriol May Down-Regulate mRNA Over-Expression of Toll-Like Receptor-2 and -4, LL-37 and Proinflammatory Cytokines in Cultured Human Keratinocytes. *Ann Dermatol*. 2014 ;26(3):296-302.

Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol*. 1998;111(5):757-61.

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

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in immunology.* 2007;19:24-32.

Keck M, Herndon DN, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr.* 2009;159(13-14):327-36.

Kim J, Krueger JG. The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatol Clin.* 2015;33(1):13-23.

Kopp J, Wang GY, Kulmburg P, Schultze-Mosgau S, Huan JN, Ying K, Seyhan H, Jeschke MD, Kneser U, Bach AD, Ge SD, Dooley S, Horch RE. Accelerated wound healing by in vivo application of keratinocytes overexpressing KGF. *Mol Ther.* 2004 ;10(1):86-96.

Kubo T, Kamekura R, Kumagai A, Kawata K, Yamashita K, Mitsuhashi Y, Kojima T, Sugimoto K, Yoneta A, Sumikawa Y, Yamashita T, Sato N, Himi T, Ichimiya S. Δ Np63 controls a TLR3-mediated mechanism that abundantly provides thymic stromal lymphopoietin in atopic dermatitis. *PLoS One*. 2014^a; 9(8):e105498.

Kubo T, Sugimoto K, Kojima T, Sawada N, Sato N, Ichimiya S. Tight junction protein claudin-4 is modulated via Δ Np63 in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014^b;455(3-4):205-11.

Kupper TS, Chua AO, Flood P, McGuire J, Gubler U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest*. 1987;80(2):430-6.

Meisgen F, Xu Landén N, Wang A, Réthi B, Bouez C, Zuccolo M, Gueniche A, Stähle M, Sonkoly E, Breton L, Pivarcsi A. MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014;134(7):1931-40.

Millenbaugh NJ, Roth C, Sypniewska R, Chan V, Eggers JS, Kiel JL, Blystone RV, Mason PA. Gene expression changes in the skin of rats induced by prolonged 35 GHz millimeter-wave exposure. *Radiat Res.* 2008;169(3):288-300.

Moore CB, Medina MA, van Deventer HW, O Connor BP, Cameron S, Taxman DJ, Et al. Downregulation of immune signaling in patients with large surface burn injury. *J Burn Care & Res.* 2007;28(6):879-87. Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR. Toll Like receptors in chronic pain. *Experimental neurology.* 2012; 234(2):316-29.

Nguyen TT, Gilpin DA, Meyer NA, Herndon DN. Current treatment of severely burned patients. *Ann Surg.* 1996;223:14-25.

Nikitorowicz-Buniak J, Shiwen X, Denton CP, Abraham D, Stratton R. Abnormally differentiating keratinocytes in the epidermis of systemic sclerosis patients show enhanced secretion of CCN2 and S100A9. *J Invest Dermatol.* 2014;134(11):2693-702.

Oliveira CB, Vasconcellos C, Y Sakai-Valente N, Sotto MN, Luiz FG, Belda Júnior W, Sousa Mda G, Benard G, Criado PR. Toll-like receptors (tlr) 2 and 4 expression of keratinocytes from patients with localized and disseminated dermatophytosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(1):57-61.

Pincelli C, Marconi A. Keratinocyte stem cells: friends and foes. *J Cell Physiol*. 2010;225(2):310-5.

Powell CS, Wright MM, Jackson RM. p38mapk and MEK1/2 inhibition contribute to cellular oxidant injury after hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(4):L826-33.

Rangel MF, Pereira APJT. Atendimento inicial e definitivo do grande queimado. *J Bras Med*. 2007;92(2):20-2.

Rezaei E, Safari H, Naderinasab M, Aliakbarian H. Common pathogens in burn wound and changes in their drug sensitivity. *Burns*. 2011;37(5):805-7.

Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Schimming TT, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Nothnagel M, Epplen JT, Hoffjan S. BMC Association of toll interacting protein gene polymorphisms with atopic dermatitis. *Dermatol*. 2007;7:3.

Schwacha MG, Zhang Q, Rani M, Craig T, Oppeltz RF. Burn enhances Toll like receptor induce responses by circulating leukocytes. *Inter J Clin Exper Med*. 2012;5(2):136-44.

Setta-Kaffetzi N, Simpson MA, Navarini AA, Patel VM, Lu HC, Allen MH, Duckworth M, Bachelez H, Burden AD, Choon SE, Griffiths CE, Kirby B, Kolios A, Seyger MM, Prins C, Smahi A, Trembath RC, Fraternali F, Smith CH, Barker JN, Capon F. AP1S3 mutations are associated with pustular psoriasis and impaired Toll-like receptor 3 trafficking. *Am J Hum Genet*. 2014;94(5):790-7.

Shirley SH, von Maltzan K, Robbins PO, Kusewitt DF. Melanocyte and melanoma cell activation by calprotectin. *J Skin Cancer*. 2014;2014:846249.

Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care & Res*. 2010;31(6):849-73.

Sobral CS, Gragnani A, Morgan J, Ferreira LM. Inhibition of proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* by KGF in an experimental burn model using human cultured keratinocytes. *Burns*. 2007;33(5):613-620.

Spanholtz TA, Theodorou P, Amini P, Spilker G. Severe burn injuries: acute and long-term treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(38):607-13.

Stappers MH, Thys Y, Oosting M, Plantinga TS, Ioana M, Reimnitz P, Mouton JW, Netea MG, Joosten LA, Gyssens IC. TLR1, TLR2, and TLR6 Gene Polymorphisms Are Associated With Increased Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections. *J Infect Dis.* 2014 Jul 15;210(2):311-8.

Tiwari VK. Burn wound: How it differs from other wounds? *Indian J Plast Surg.* 2012; 45(2):364–73.

Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004;76:514–9.

Vale ECS. Inicial management of burns: approach by dermatologists. *An Bras Dermatol.* 2005;80(1):9-19.

Wang J, Hori K, Ding J, Huang Y, Kwan P, Ladak A, et al. *Toll-like* receptors expressed by dermal fibroblast contribute to hypertrophic scarring. *J Cell Physiol.* 2011;226(5):1265-73.

West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:409–36.

Wolf SE, Sterling JP, Hunt JL, Arnoldo BD. The year in burns 2010. *Burns.* 2011;37(8):1275-87.

Yu N, Liu S, Yi X, Zhang S, Ding Y. Serum amyloid A induces interleukin-1 β secretion from keratinocytes via the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome. *Clin Exp Immunol.* 2015;179(2):344-53.

Yumoto H, Hirota K, Hirao K, Miyazaki T, Yamamoto N, Miyamoto K, Murakami K, Fujiwara N, Matsuo T, Miyake Y. Anti-inflammatory and protective effects of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on oral epithelial cells. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(2):555-63.

Zhang S, Liu S, Yu N, Xiang L. RNA released from necrotic keratinocytes upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in melanocytes. *Arch Dermatol Res.* 2011;303(10):771-6.

NORMAS ADOTADAS

Normas Adotadas

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

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

ABSTRACT

Abstract

INTRODUCTION: Large burn injury can progress to severe infection and sepsis with increased morbidity and mortality. There is a continuous state of inflammation and serum levels of cytokines are high. The Toll-like receptors are important receptors of the innate immune system that recognize antigens. Therefore, a need exists for obtaining the gene expression profile of the skin of extensive burns for initial analysis.

PURPOSE: To evaluate the expression profile of genes related to Toll Like Receptors (TLR) pathways of human primary epidermal keratinocytes (hKEp) of patients with severe burns. **METHODS:** After obtaining viable fragments of skin with and without burn injury, culture hKEp was initiated by the enzymatic method using Dispase (Sigma-Aldrich) and Trypsin (Sigma-Aldrich). These cells were treated with Trizol® (Life Technologies) for extraction of total RNA. This was quantified and analyzed for purity for obtaining cDNA for the analysis of gene expression using specific TLR pathways PCR Arrays plates (SA Biosciences).

RESULTS: After the analysis of gene expression we found that 21% of these genes were differentially expressed, of which 100% were repressed or hyporegulated. Among these, the following genes (fold decrease): HSPA1A (-58), HRAS (-36), MAP2K3 (-23), TOLLIP (-23), RELA (-18), FOS (-16), and TLR1 (-6.0). **CONCLUSION:** The gene expression profile of skin of patients with large burn injury showed 21% altered genes, and 100% of them were downregulated.

ANEXOS

ANEXOS 1

Parecer Consubstanciado do CEP nº 72752 de 13/08/2012

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/ Hospital São Paulo

PROJETO DE PESQUISA

Título: EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS E QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS CULTIVADOS DE PACIENTES COM QUEIMADURA.

Área Temática:

Pesquisador: ALFREDO GRAGNANI FILHO

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

CAAE: 05076812.7.0000.5505

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 72752

Data da Relatoria: 13/08/2012

Apresentação do Projeto:

De acordo com o parecer substanciado do CEP 56688 de 16/07/2012

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o parecer substanciado do CEP 56688 de 16/07/2012

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer substanciado do CEP 56688 de 16/07/2012

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o parecer substanciado do CEP 56688 de 16/07/2012

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com o parecer substanciado do CEP 56688 de 16/07/2012

Recomendações:

Nada consta

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

1) a mudança em relação ao projeto original, não tendo mais essas duas instituições como co-participantes do estudo (Hospital Municipal do Tatuapé e Hospital do Servidor Público Estadual), e a inclusão dos pacientes pediátricos será feita somente através da admissão dos pacientes atendidos no nosso Pronto Socorro do HSP-UNIFESP/EPM.

2) Apresentado adequadamente o Termo de Assentimento conforme solicitado pelo CEP-Unifesp

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acatou o parecer do relator - projeto aprovado

SAO PAULO, 13 de Agosto de 2012

Assinado por:
José Osmar Medina Pestana

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este é um convite à participação em estudo de pesquisa experimental (grupo “pesquisa”).

1 – Título do projeto: “**EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* EM CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS PRIMÁRIOS DE PACIENTES ADULTOS COM QUEIMADURA.**”

2 – Desenho do estudo e objetivo(s): “Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o que acontece após o acidente da queimadura, pesquisando a quantidade de receptores *Toll-Like*, ou seja, proteínas produzidas pelas células na área da queimadura que podem causar inflamação e que podem piorar ou melhorar a cicatrização da queimadura. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele normal, sem queimadura, que fica ao redor da lesão da queimadura e que durante o procedimento operatório de limpeza do tecido morto (necrosado) da queimadura sai junto da mesma, e que será enviada ao laboratório para cultivo.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “**EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* EM CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS PRIMÁRIOS DE PACIENTES ADULTOS COM QUEIMADURA.**”.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

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

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

Prof. Alfredo Gragnani Filho

Data ____/____/____

ANEXO 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este é um convite à participação em estudo de pesquisa experimental (grupo “controle”).

1 – Título do projeto: **“EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* EM CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS PRIMÁRIOS DE PACIENTES ADULTOS COM QUEIMADURA.”**

2 – Desenho do estudo e objetivo(s): “Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar o que acontece após o acidente da queimadura, pesquisando a quantidade de receptores *Toll-Like*, ou seja, proteínas produzidas pelas células na área da queimadura que podem causar inflamação e que podem piorar ou melhorar a cicatrização da queimadura. Essa avaliação será realizada nas células da sua pele normal, sem queimadura, que fica ao redor da lesão da queimadura e que durante o procedimento operatório de limpeza do tecido morto (necrosado) da queimadura sai junto da mesma, e que será enviada ao laboratório para cultivo

3 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: na Cirurgia Plástica são retirados fragmentos de pele quando existe flacidez ou excesso importante, como na Mamoplastia redutora, abdominoplastia, dermolipectomia crural, ritidoplastia, entre outras, e esses fragmentos são descartados, sem nenhum uso, e os mesmos serão enviados ao laboratório de cultura de células da UNIFESP/EPM para que as células sejam isoladas e possam ser usadas em experimentos.

4 – Relação dos procedimentos rotineiros e como serão realizados: nada da rotina de sua cirurgia será mudado, somente que após sua permissão, o fragmento de pele que seria desprezado, será encaminhado ao laboratório para isolamento das células.

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

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

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

- 8 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Alfredo Gagnani Filho, que pode ser encontrado no endereço Rua Napoleão de Barros, 715 – 4º andar – Telefone(s): 5576.4118. E-mail: alfredogf@ig.com.br Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: cepunifesp@unifesp.br
- 9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- 11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 14 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “**EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES *TOLL-LIKE* EM CULTIVO DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS PRIMÁRIOS DE PACIENTES ADULTOS COM QUEIMADURA.**”.

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

Assinatura do paciente/representante legal

Data ___/___/___

Assinatura da testemunha

Data ___/___/___

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

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

Prof. Alfredo Gragnani Filho

Data ____/____/____

FONTES CONSULTADAS

Fontes Consultadas

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