

Norma Gondim Cléto Nascimento

Terapia celular no tratamento de feridas crônicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Cléto, Norma Gondim.

Terapia celular no tratamento de feridas crônicas / Norma Gondim Cléto. –
Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2011

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 31301002

1. Ferimentos e lesões. 2. Hanseníase. 3. Fibroblasto. 4. Células-tronco.

Palavras-chave: Células tronco; Feridas crônicas; Hanseníase; Plaquetas.

Agradeço a Deus por ter me protegido!

“Amai-vos uns aos outros como eu vos amei.”

**“Ame a Dermatologia ,
faça dela uma das razões de sua vida ,
e terá sempre uma razão de viver.”**

Dr. Sampaio.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Gercy (in memorian) e Arteniza

Pelo cuidado com meu aprendizado.

Ao meu marido

Dejair

Pelo CARINHO e incansável incentivo
ao meu trabalho.

Aos meus irmãos

Almir e Wandecyra

Pelo apoio que me deram ao longo da vida!

A meus tios:

Gerson (in memoriam)

Que tantas vezes, e de diversas formas, mostrou-me o próximo desafio,
na caminhada da vida ... acreditar e nunca desistir

Aparecida (in memoriam),

Pelo seu carinho e cuidado para comigo!

Enoch e Luiza,

Que sempre acreditaram em mim.

Aos Pacientes

Que me trouxeram os desafios...

Que confiam em mim

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Elenice Deffune

Pela orientação e estímulo nesta caminhada.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru

Uma casa rica de aprendizado científico e humano.

Ao Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla (in memorian) e

Dr. Raul Negrão Fleury

Por ensinar, com muita dedicação, a Dermatologia e Hansenologia,
valorizando o lado humano deste trabalho

Aos amigos:

Maria Teresa e Sadamitsu

Pelo apoio constante na grande caminhada da vida e também na
Dermatologia.

Maria Luiza Boso

Pelo incentivo.

Wladimir, Antonio Carlos, Somei e Jaison

Pelo grande suporte Dermatológico.

Aos colegas de trabalho do Serviço de Residência de Dermatologia

Prof. Dr. Diltor Vladimir Araujo Opromolla - ILSL– Bauru – SP

Aos médicos Residentes

Meus sinceros agradecimentos pela colaboração!

Ao Serviço de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima

Dr. Cleverson e Dr. Adaulo,

Pela constante colaboração.

Ao Serviço de Reabilitação do ILSL

Pela orientação técnica

**Às Enfermeiras e as auxiliares de enfermagem do ambulatório,
enfermaria e centro cirúrgico do ILSL**

Pelos primorosos CUIDADOS DIÁRIOS com os pacientes

Ao Funcionário Ricardo da Documentação Fotográfica.

Pela sua atenção e competência.

Ao Enderson

Pela atenção e suporte da Fisioterapia.

Às Assistentes Sociais

Pela dedicação.

Ao Hemocentro - UNESP - Botucatu

“Força tarefa no implante de células”

Dra . Rosana e Dra. Flávia , Mariela, Alessandro, Woner

Pela dedicação e colaboração sem medir esforços, para que este trabalho fosse possível.

Ao Professor Dr. Padovani,

Com suas orientações estatísticas prestimosas .

À Secretária

Janisse,

Pela sua constante atenção.

A todos que de alguma forma contribuíram neste trabalho.

RESUMO

O hemocomponente gerador da cola de fibrina *home made* é a fração do plasma fresco congelado. Neste os fatores I (fibrinogênio), VIII, XIII, von Willebrand e fibronectina estão presentes em elevada concentração. O fibrinogênio, fator I da coagulação sangüínea, sofre ativação nos processos de injúria tecidual onde são desencadeados os fenômenos hemostáticos que culminam com a formação de uma rede resistente de fibrina na qual existem leucócitos, hemácias e plaquetas. O gel de plaquetas é um hemocomponente obtido a partir de concentrado de plaquetas ou de plaquetaféres com adição de gluconato de cálcio e trombina e tem sido alvo de muitos estudos na última década sua participação no processo de cicatrização, especialmente porque libera fatores de crescimento no leito de feridas promovendo a reparação fisiológica tecidual. Neste estudo avaliou a ação de curativos bioativos *home made*: células tronco mesenquimais incorporadas ao gel de plaquetas laminares com laserterapia, no processo de cicatrização de feridas crônicas. Foram avaliados feridas crônicas em membros inferiores, de 5 pacientes, sendo predominantemente feridas decorrentes de seqüelas de hanseníase. O gel laminar de plaquetas mostrou-se ser um promissor meio de microencapsulação de células tronco mesenquimais, fibroblastos e queratinócitos. Nas feridas tratadas com células tronco mesenquimais, incorporadas ao gel laminar de plaquetas, foi observada melhora clínica considerável, tanto na cicatrização, quanto na redução das manifestações inflamatórias e dolorosas, nos 5 pacientes.

Descritores: Plaquetas; Feridas crônicas; Hanseníase; Células tronco

ABSTRACT

The blood components of fibrin glue generator home made is the fraction of fresh frozen plasma. In the factors I (fibrinogen), VIII, XIII, von Willebrand and fibronectin are present in high concentration. Fibrinogen, blood coagulation factor I, undergoes activation in the processes of tissue injury where the phenomena are triggered hemostatic culminating in the formation of a strong fibrin network in which there are leukocytes, red blood cells and platelets. The platelet gel is a blood components obtained from platelet concentrate with the addition of calcium gluconate and thrombin and has been the subject of many studies over the last decade due to their involvement in the healing process, especially because it releases factors growth in the wound bed to promote the physiological tissue repair. This study evaluated the action of bioactive dressings home made: mesenchymal stem cells embedded in the laminar platelet gel with laser therapy in the healing of chronic wounds. Chronic wounds were evaluated in the lower limbs of five patients, predominantly due to wounds sequelae of leprosy. The laminar platelet gel showed to be a promising means of microencapsulation of mesenchymal stem cells, fibroblasts and keratinocytes. In wounds treated with mesenchymal stem cells embedded in the laminar platelet gel, significant clinical improvement was observed both in healing and in reducing inflammatory and painful manifestations in 5 patients.

Keywords: Platelets; Chronic wounds; Leprosy; Stem Cells

SUMÁRIO

1.0. Introdução.	2
2.0. Objetivos.	8
2.1. Objetivos Gerais	8
2.2. Objetivos específicos.	8
3. 0. Métodos e casuística	11
3.1. Fases do trabalho	11
3.1.1. Fase I	
• Padronização da técnica de dissociação celular com tecido humano	11
• Determinação do padrão de dano DNA pela técnica de cometa.	13
• Coleta de tecido dos pacientes-estudo	14
• Seleção dos pacientes.	15
• Coleta do tecido adiposo.	15
• Preparo do tecido adiposo para cultura	18
• Preparo da cultura de fibroblastos dermóides, queratinócitos e melanócitos	19
• Coleta do sangue periférico	20
3.1.2. Fase II – CLÍNICA (Terapêutica)	20
• Mensuração da ferida	21
• Laserterapia com laser de baixa potência.	21
• Aplicação do curativo com de células tronco mesenquimais, incorporadas ao gel de plaqueta.	23
• Caracterização dos pacientes participantes da fase clínica.	26
• Indicadores de avaliação	32
• Análise estatística.	32
• Aspectos éticos	32
4. Resultados	34
4.1. Fase pré-clínica (fase I)	34
• Validação da cultura de pele humana (fase I) pela técnica de separação celular por dissociação mecânica	34
• Desempenho das técnicas de dissociação mecânica <i>versus</i> enzimática	

de células tronco mesenquimais de tecido adiposo..	35
• Desempenho da cultura de CT ao longo do tempo.	36
• Teste do Cometa da fase pré-clínica.	36
4.2. Fase clínica (fase II)	38
• Teste cometa para amostras pré- e pós-cultura	38
• Análise dos marcadores de superfície por citometria de fluxo dos 5 pacientes casos	40
• Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais incorporada ao gel de plaquetas, no processo de cicatrização de feridas.	46
5. Discussão	58
6. Considerações finais.	65
7. Referências Bibliográficas.	66
Anexos	71
• Anexo I.	72
• Anexo II.	74
• Anexo III.	76
• Anexo IV.	77
• Anexo V.	78

INTRODUÇÃO

1.0 - INTRODUÇÃO

As tentativas de interferir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de um procedimento, remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia à importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente. Os registros mais antigos sobre curativos são manuscritos egípcios que datam de 3000 – 2500 a.C. Hipócrates recomendava que as feridas fossem mantidas limpas e secas e preconizava que elas fossem lavadas com água morna, vinho e vinagre. A partir do século XIX, durante a Guerra da Criméia, foram criados vários tipos de curativos a base de fibras de linhos, mas eram pouco absorventes. Entre o final de 1840 e a Segunda Guerra Mundial, o foco do tratamento de feridas foi a utilização de anti-sépticos e agentes tópicos de ação antimicrobiana e a proteção com coberturas secas, como consequência às descobertas de Pasteur sobre a “Teorias dos Germes”. Somente muito depois em 1962 os pesquisadores Winter e Roove demonstraram que a taxa de epitelização era 50% maior em um ambiente úmido e que a formação de crostas era minimizada e, desde então, houve a revolução no conceito de curativos.¹

Desde então, um grande número de produtos tem aparecido no mercado, criando um trincado quebra-cabeça na escolha do melhor curativo. Para se guiar na análise da multiplicidade de produtos disponíveis, faz-se necessário definir curativo.

Um curativo é um dispositivo de proteção destinado a recobrir uma ferida, uma lesão ou uma cicatriz recente. Os curativos podem ser fixados por curativos secundários ou adesivos. Os principais objetivos de um curativo são: 1) proteger a ferida (contra infecções ou irritações); 2) permitir uma melhor cicatrização preservando a lesão; 3) interromper uma hemorragia através da compressão de pequenos vasos e 4) aproximar bordas favorecendo a cicatrização e seu fechamento. Além disso, utiliza-se curativo para proteger ou substituir a epiderme temporariamente.²

Uma das formas mais antigas e comuns de curativos tem a apresentação de cremes e pomadas que são aplicados diretamente sobre a ferida. Recentemente apareceram curativos sob a forma de películas adesivas transparentes e semipermeáveis que permitem a passagem de ar e vapor d'água, denominado por seus idealizadores

como curativos que permitem a “respiração”. A tecnologia de curativos evolui rápido em função do grande mercado disponível, tendo então, aparecido os curativos a base de gel, hidrocolóide, alginatos, hidrogel, etc, todos com a proposta de permitir a hidratação da área ferida, favorecendo o processo de cicatrização. A escolha de um curativo depende de critérios como: quantidade de exsudato, presença ou ausência de odor, presença de contaminação ou infecção e até ordem econômica.²

Pereira³ realizou uma revisão sistemática da literatura sobre os curativos utilizados na atualidade e destacou 24 princípios ativos, dentre eles estão:

- Os ácidos graxos essenciais (AGE) são derivados do ácido linoléico e tem como função manter o meio úmido e promover a quimiotaxia e a angiogênese;
- Os alginatos são derivados do ácido algínico, que por sua vez é obtido principalmente, de algas marinhas da espécie *Laminaria* e sua ação se dá pela troca de íons sódio do exsudato com os íons cálcio da alginato. Os alginatos mantem o leito da ferida úmido e favorecem o desbridamento autolítico além de induzir a hemostasia;
- As biomembranas são compostas por fina membrana de silicone com um tecido de nylon parcialmente embutido na membrana e colágeno de porco tipo I. Elas controlam a perda de fluidos e eletrólitos, auxiliam no controle da dor e da hipotermia, além das membranas de celulose bacteriana que se apresentam no mercado como boa cobertura.
- O carvão ativado é composto por uma camada interna carvão ativado, podendo vir impregnado com prata, coberto por uma camada de não-tecido, selado em toda a sua extensão. O carvão absorve o exsudato e filtra o odor, quando associado à prata, que exerce ação bactericida;
- Os curativos com fator de crescimento derivado de plaquetas são compostos por dois polipeptídeos idênticos mais ingredientes bioativos, conservantes e estabilizantes, em sua base de carboximetilcelulose. Eles agem na membrana celular ativando a

tirosinoquinase que entra em contato com o DNA, estimulando a divisão e a proliferação celular;

- Os desbridadores removem o tecido morto e podem agir de diferentes formas como, por exemplo, degradando o colágeno ativo na ferida ou a fibrina;
- Os hidrocolóides são curativos não-adesivos, cujo principal componente é a carboximetilcelulose e são utilizados para a manutenção da unidade no leito da ferida;
- A sulfadiazina de prata favorece a precipitação de proteínas e age diretamente na parede celular e membrana citoplasmática da célula microbiana.

Os curativos podem ser classificados como passivos ou convencionais; interativos e bioativos. Os convencionais têm como princípio recobrir a lesão após a limpeza mecânica diária (ex. Adaptic®). Os curativos interativos são geralmente permeáveis a vapor d'água e oxigênio e impermeáveis a bactérias, absorvendo o exsudado da ferida (ex. Omiderm®). Os curativos bioativos liberam substâncias ativas na cicatrização da ferida (ex. Algoderm®).⁴

Desde 2003, o Hemocentro de Botucatu (HB) tem auxiliado na busca para o tratamento de feridas crônicas utilizando princípios ativos contidos em hemocomponentes como plasma fresco congelado (PFC), crioprecipitado e concentrado de plaquetas (CP).

Esta iniciativa levou em consideração dois importantes elementos: 1) hemocomponentes excedentes no HB, com prazo de validade para uso venoso limitado por lei⁵, porém com princípios ativos de grande valia nos processos cicatriciais; 2) os processos de cicatrização e suas fases; coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação, fases estas que podem ser beneficiados com os princípios ativos existentes nos hemocomponentes citados.

Os primeiros estudos com biocurativos ou curativos bioativos realizados no HB com cola de fibrina customizada produziu bons na cicatrização de úlceras de

pressão. Atualmente outros estudos estão sendo realizados nesta linha de pesquisa com pacientes que sofreram queimaduras.⁶

O hemocomponente gerador da cola de fibrina *home made* inicialmente descrito.⁵ é o crioprecipitado, uma fração do plasma fresco congelado. Os fatores I (fibrinogênio), VIII, XIII, von Willebrand e fibronectina estão presentes em elevada concentração. O fibrinogênio, fator I da coagulação sanguínea, sofre ativação nos processos de injúria tecidual onde são desencadeados os fenômenos hemostáticos que culminam com a formação de uma rede resistente de fibrina na qual existem leucócitos, hemácias e plaquetas.⁷

As primeiras tentativas de encontrar um adesivo biológico com propriedade de colar tecidos ocorreu com Bergel (1909), citado por Lourenço (1983) realizou tamponamento de pequenos vasos, empregando fibrina em pó. A partir daí Grey e Harvey (1915) citado por Lourenço et al (1983) passaram a utilizar fibrina em camadas no tratamento de lacerações de órgãos parenquimatosos. A “cola alógena de fibrina” mimetiza os últimos passos na “cascata” de coagulação com a conversão de fibrinogênio em fibrina, cuja função primária é a obtenção de hemostasia e a “adesão” dos retalhos. Sua eficiência no selamento de capilares controla facilmente os sangramentos, reduzindo a formação de edemas e hematomas em cirurgias plásticas.⁸

O gel de plaquetas é um hemocomponente obtido a partir de concentrado de plaquetas ou de plaquetaféres com adição de gluconato de cálcio e trombina. Este hemocomponente tem sido alvo de muitos estudos na última década devido a seu auxílio no processo de cicatrização, especialmente porque libera fatores de crescimento no leito de feridas promovendo a reparação fisiológica tecidual.⁹ Ele é rico em fatores de crescimento, principalmente Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) e Vascular Endotelial Growth Factor(VEGF).¹⁰ O gel de plaquetas tem sido muito eficiente em odontologia, visando acelerar o reparo da ferida cirúrgica e a regeneração óssea e úlceras crônicas.^{8 e 9}

Os protocolos de obtenção do gel de plaquetas no HB estão padronizados desde 2003 no LEC. Em todos os protocolos utiliza-se trombina humana extraída de plasma fresco congelado (PFC) dentro do prazo de validade.

Levando em consideração os protocolos de obtenção da cola de fibrina *home made* e do gel de plaquetas laminar, bem como os resultados preliminares obtidos em 50 pacientes, o objetivo deste trabalho é aperfeiçoar a cultura e auto-enxerto de modelo de pele cultivada *ex vivo* para pacientes com lesões extensas, cujo protocolo anterior conseguiu preparar a lesão com tecido de granulação, mas em função da extensão da mesma não houve fechamento em acompanhamento por 120 dias. Estes pacientes são regularmente atendidos no ambulatório de Biocurativo do Hemocentro de Botucatu, em funcionamento há 2 anos, recebendo pacientes refratários aos tratamentos já instituídos pelos serviços de Dermatologia, Cirurgia Vascular e pelo ambulatório do grupo de Pró-vitalidade da pele.

Diante dos vastos recursos usados para tratamento de feridas sem que ainda as limitações sejam muitas, a solução pode estar por vir, surge a engenharia de tecido e a medicina regenerativa dispensam grandes esforços para gerar novas terapias, para pacientes com doenças crônicas, que o organismo não consegue mais restaurar a função tecidual. Ambas são multidisciplinares, jovens e emergentes em biotecnologia e medicina, e para muitos pacientes é a grande expectativa de mudar profundamente a terapêutica.¹¹

Diante do exposto foram incluídos neste estudo pacientes com feridas crônicas, decorrentes das seqüelas da hanseníase. A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Este bacilo migra para o interior das fibras mielinizadas e suas células de Schwann, provocando lesão neural de nervos periféricos com manifestações cutâneas como áreas hipocrômicas, anestésicas e hipohidrose mãos em garra, lagofthalmia, pé caído, e perda das sombrancelhas. Estas são altamente antiestéticas e estigmatizantes. Outras lesões diretas são as úlceras em membros inferiores.^{12, 13, 14, 15, 16, 17}

A terapia com PQT (Dapsona, Rifampicina e Clofazimina), preconizada pela OMS é efetiva contra o bacilo, mas o dano neural persiste, as úlceras cronicam-se, induzem mutilações altamente incapacitantes, manifestações dolorosas, que prejudica significativamente a qualidade de vida dos pacientes.¹⁵

Diante do exposto foram inseridos neste protocolo, pacientes portadores de úlceras de membros inferiores decorrentes da hanseníase.

Considerando que os pacientes portadores de úlceras decorrentes de lesões hansenianas convivem há pelo menos uma década com este mal, mesmo tendo recebido todos os tipos de curativos disponíveis. Diferentemente dos curativos convencionais, o gel de plaquetas é rico em fator de crescimento derivado de plaquetas necessário para a cicatrização da ferida.¹⁸ A literatura descreve os que os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e os fatores do crescimento derivados do endotélio (VEGF) interagem com receptores de membrana celular (Pvr) ativa a via das tirosinoquinase que atua no DNA, estimulando a divisão e a proliferação celular e o fechamento da ferida¹⁹

Assim este gel de plaquetas enriquecido com célula tronco mesenquimal vislumbra novas perspectivas para, no mínimo reduzir o sofrimento destes sujeitos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Avaliar o processo de cicatrização de feridas crônicas tratadas com curativos de gel de plaquetas laminares *home made* nas seguintes preparações:

- incorporado com células tronco de sangue periférico ;
- incorporado com célula tronco mesenquimal de tecido adiposo
- incorporado com Fibroblastos, queratinócitos e melanócitos de pele humana;

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o poder mutagênico em fibroblastos dermóides, melanócitos e queratinócitos cultivados, empregando o teste “cometa”.
- Instituir o estudo de fase clínica em pacientes selecionados monitorando a terapêutica adotada.
- Avaliar os possíveis benefícios da laserterapia, com laser de baixa potência, no processo de cicatrização de feridas;

MÉTODOS E CASUÍSTICA

3. MÉTODOS E CASUÍSTICA

3.1. Fases do trabalho:

3.1.1. Fase I:

A metodologia deste trabalho foi realizada em duas fases distintas. Na fase I, foram realizadas as padronizações das técnicas envolvendo tecidos de suíno e humano. O tecido de suíno foi empregado com a finalidade de padronizar um modelo de pele humana sobre uma superfície de colágeno obtida a partir de peritônio suíno, para servir de arcabouço do crescimento de fibroblastos, melanócitos e queratinócitos. O tecido humano, nesta fase, foi utilizado para realização do teste cometa. Este teste foi realizado para quantificar o dano ao DNA celular quando as células são submetidas à dissociação para serem cultivadas. Para tanto foram executadas as seguintes etapas:

- a) Padronização da técnica de dissociação celular;
- b) Obtenção das amostras de pele humana;
- c) Comprovação da ausência de quebra de DNA pelas técnicas de cometa;
- d) Preparo da cultura de fibroblasto dermóide, queratinócitos e melanócitos (tecido humano);
- e) Preparo do tecido (pele e sangue periférico humano) para a cultura;

Padronização da técnica de dissociação celular com tecido humano

A padronização do processo de dissociação celular foi realizada em pele normal doada por 5 voluntários do sexo masculino, com idade entre 21 – 44 anos. Todos eram candidatos a cirurgia plástica para remoção de excesso de pele após cirurgia bariátrica com perda de peso expressiva.

Após os esclarecimentos acerca dos objetivos do trabalho e com a certeza de que se trata de fase I do projeto, onde o fragmento de pele fora exclusivamente para validação da técnica, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE) e subsequente doação do fragmento de pele normal para esta fase da pesquisa.

Para tanto o fragmento de pele normal foi colocado em meio de cultura enriquecido com antibiótico. Em seguida, em cabine de fluxo laminar estéril, foi fixado num suporte e lavado abundantemente com 500 ml de SF 0,9%. Após isto, foram separados tecido adiposo, derme e epiderme. Os folhetos foram transferidos individualmente para uma placa de Petri e dissociado mecanicamente, com de *cell scraper*, enquanto em paralelo outro fragmento era dissociado com enzima colagenase.

Adicionalmente, os fragmentos de pele normal também foram submetidos ao teste do cometa para verificar qual processo de dissociação celular do espécime de pele normal destes voluntários apresentariam menor dano ao DNA, reduzindo com isso, a possibilidade de originar células potencialmente oncogênicas, no futuro, (figuras 1).



Figura 1- Etapas do processo de dissociação celular. A) fixação e lavagem do tecido em um suporte dentro de uma capela de fluxo laminar; B) remoção da derme; C) fragmento de tecido evidenciando a epiderme e D) remoção dos folhetos da pele com *cell Scraper*

Determinação do padrão de dano DNA pela técnica de cometa

Esta etapa foi realizada no laboratório de Biologia Molecular da Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvador, utilizando duas técnicas para assegurar que os tecidos expandidos *ex-vivo*, não sofreram mutações ou quebras de DNA. A técnica utilizada foi cometa. O teste de cometa foi introduzido por Östling e Johanson em (1984)²⁰, e consiste numa técnica, na qual as células são individualizadas, lisadas, embebidas em gel de agarose e exposta à microeletroforese. No gel de agarose sob uma corrente elétrica o DNA migra para o ânodo devido a sua carga negativa. Após a eletroforese, as células são submetidas a coloração com agente fluorescente observadas num microscópio que esta acoplado a um computador equipado com software específico para análise de cometas. Desta forma são identificadas e visualizada uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Assim a maior intensidade da cauda indica maior dano ao DNA (Figura 2).

Neste estudo foi realizado este teste para monitorar eventuais mutações em amostras de tecido antes da dissociação para posterior cultura e antes do implantes.

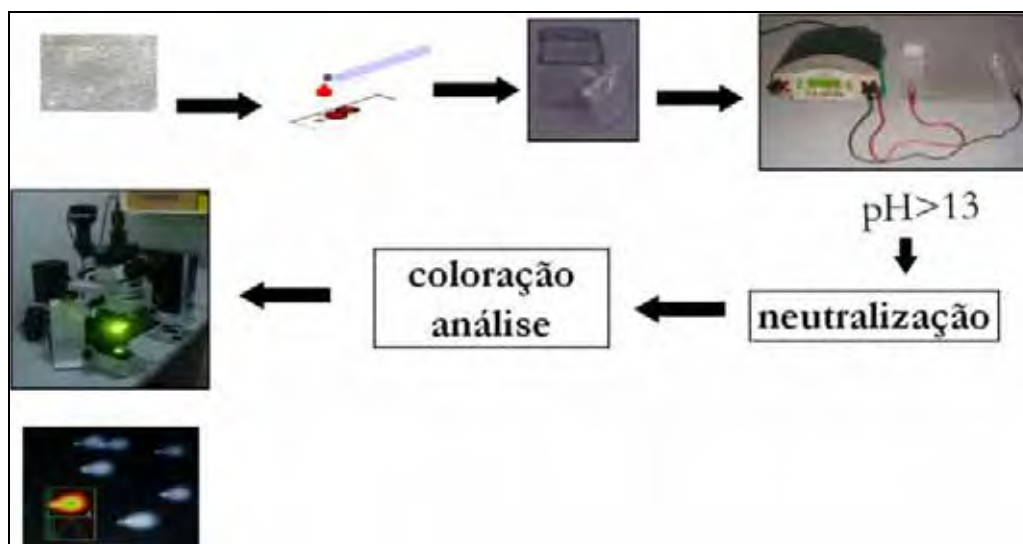


Figura 2- O esquema ilustra as etapas para realização da técnica do teste cometa.

A magnitude do dano do DNA é determinada pela intensidade da cauda do cometa conforme análise da imagem por software de acordo com uma escala visual de classes

de escores, como mostra, (figura 3). A determinação do dano é feita pela leitura sistematizada de 100 nucleossomos, no software COMET analysis System (Loates Associates, inc.) mediante análises dos controles positivos e negativos.

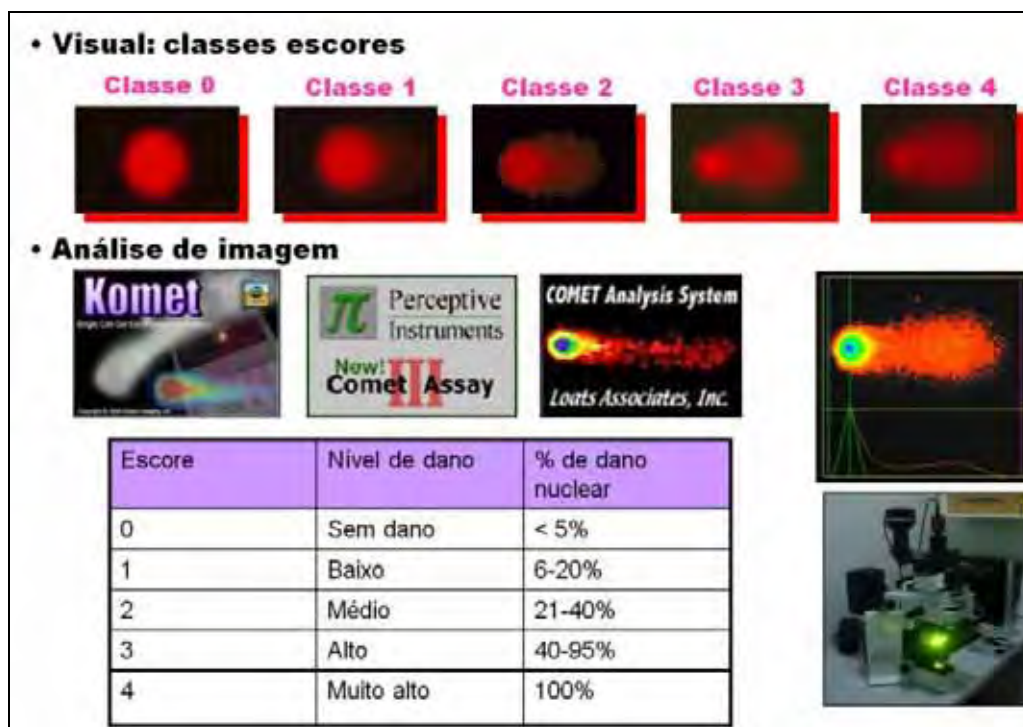


Figura 03 – Ilustração do teste do teste cometa.

Coleta de Tecido dos Pacientes-estudo

Após confirmação laboratorial da padronização do teste cometa para células tronco mesenquimais humanas e a determinação do controle positivo e negativo bem como o processamento das 5 amostras de indivíduos normais apontando para o não aumento da lise de DNA que possam indicar desenvolvimento de célula potencialmente neoplásica, formalizou-se o convite aos voluntários, portadores de feridas crônicas sem fechamento nos últimos 10 anos com diferentes tratamentos especializados.

Após esclarecimento acerca dos objetivos, vantagens e desvantagens do projeto, os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e em seguida foram submetidos ao procedimento cirúrgico para retirada do tecido adiposo. O tecido adiposo destes pacientes também foi manipulados pelo mesmo processo já descrito para o fragmento de pele normal. Desta forma o tecido adiposo do paciente que

recebeu o implante de célula tronco mesenquimal serviu também como um autocontrole.

Diante do exposto a seleção dos voluntários obedeceu aos critérios de inclusão e exclusão, respectivamente:

Seleção dos pacientes

Critérios de inclusão: Aceitar participar da pesquisa; ser portador de úlceras crônicas sem fechamento nos últimos 10 anos e com diferentes tratamentos especializados.

Critérios de exclusão: Não aceitar participar da pesquisa; ser portador de doença auto-imune e apresentar ferida neoplásica.

Coleta do tecido adiposo

Os voluntários selecionados foram submetidos à higienização e limpeza da área a ser coletada, definida como sendo a parede abdominal inferior no tamanho de 2cm x 5cm, de acordo com os protocolos de cirurgia ambulatorial realizado por médico dermatologista, conforme figura 4 e 5.

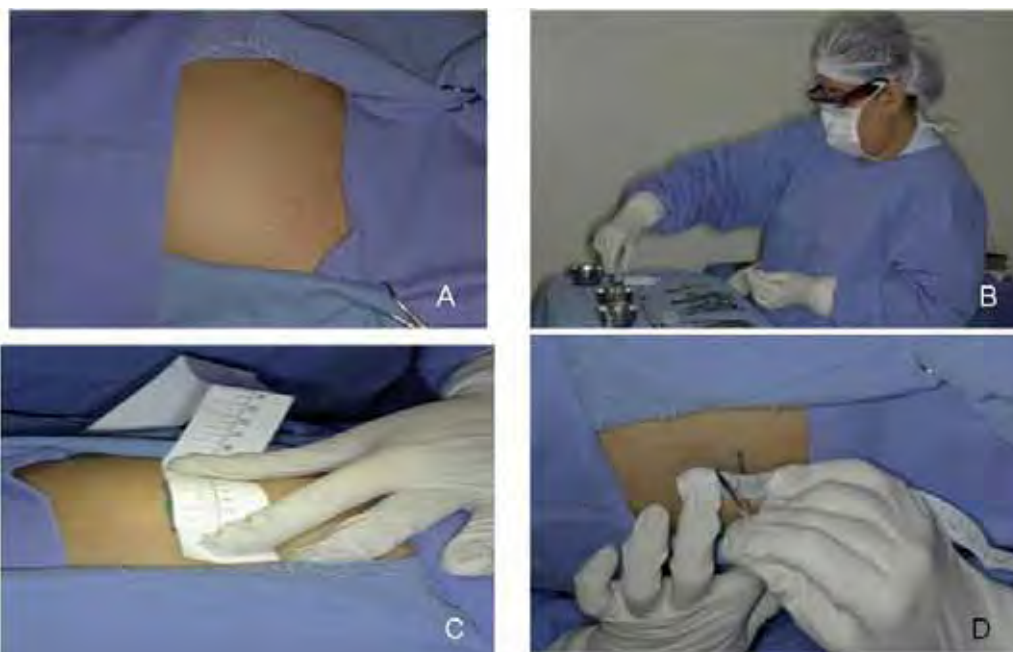


Figura 4. Procedimento cirúrgico – A) delimitação da área a ser retirado o fragmento; B) mesa cirúrgica; C) mensuração com régua estéril e D) demarcação com verde brilhante.

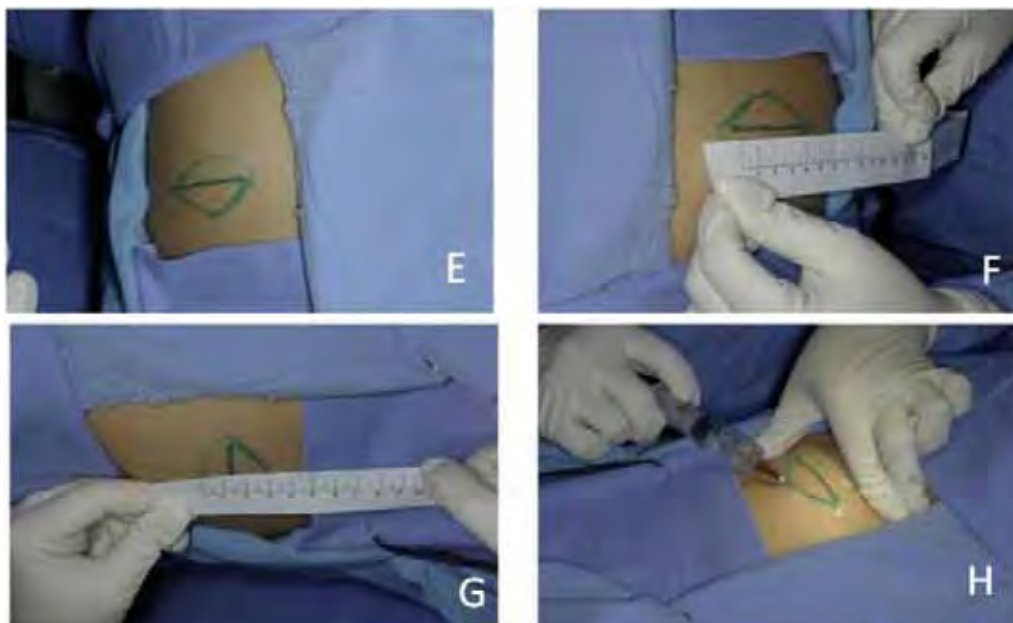


Figura 5 – Procedimento cirúrgico: E) campo delimitado; G) conferência do tamanho a ser retirado e H) anestesia com xilocaína subcutânea.

Após colocação de campos cirúrgicos, anestesia local com Xylocaina 2% sem vasoconstrictor, foi realizada incisão com lâmina de bisturi, remoção da amostra de tecido, sutura das bordas da ferida da área doadora com fio mononylon 4-0, de acordo com a figura 5

A ferida cirúrgica foi tratada com curativo de ácido graxo essencial, gaze e micropore, com trocas diárias até a cicatrização, que ocorreu em aproximadamente 10 dias. A retirada dos pontos foi realizada com 10 dias de pós-operatório, não sendo mais necessários manutenção de curativos, e o paciente foi orientado a manter o uso do ácido graxo essencial por mais 30 dias.

O espécime foi colocado em frasco de cultura de 15mL contendo meio de transporte Hepes e encaminhado ao Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu. (Figura 6)

Um fragmento de pele e subcutâneo foi separado para testes controle de biologia molecular e imunoistoquímica.

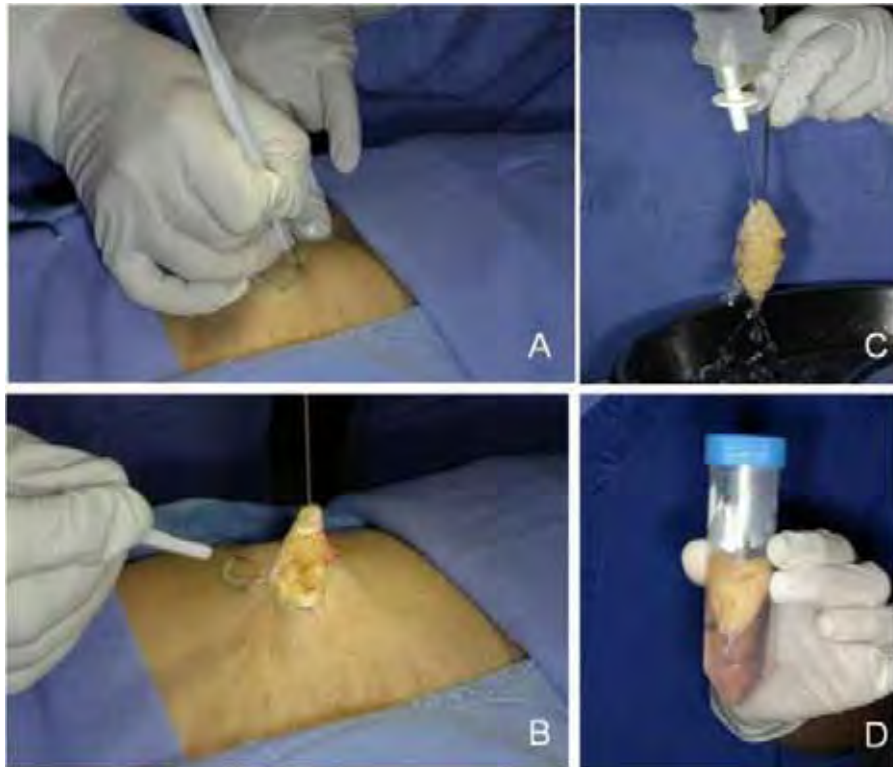


Figura 06- Retirada e acondicionamento do espécime para preparo da cultura –A) incisão;B) remoção do fragmento de pele com abundância de tecido gorduroso; C) lavagem do tecido com soro fisiológico e D) acondicionamento em meio de transporte em frasco estéril.

Preparo do tecido para cultura.

O material coletado contendo pele e tecido subcutâneo em meio de transporte foi colocado em capela de fluxo laminar para microdissecção. Foram separadas as camadas de gordura para digestão separadamente, da derme e epiderme, (Figura 07).



Figura 07 - Padronização das técnicas de cultura celular de pele humana.

Os fragmentos de gordura foram colocados em tripsina 0,25% num período de 12 horas em estufa de CO₂, ambiente úmido controlado. Após este período, o sobrenadante com as células dissociadas pelo método enzimático foi coletado e centrifugado a 900 x g durante 10 min. O sobrenadante foi eliminado e o pellet celular recuperado em 5mL de meio RPMI 1640 Invitrogen®. Após homogeneização, uma alíquota foi processada para contagem celular e avaliação da viabilidade.

Para o fragmento de derme e epiderme, foi utilizada a mesma enzima com tempo de atuação de 4 horas nas mesmas condições. Após este período, as células dissociadas foram recuperadas em seringa e passadas através de filtro 0,40µm para a eliminação de debris e cultivadas isoladamente em placas contendo meio condicionado para melanócitos e queratinócitos.

Preparo da cultura de fibroblastos dermóides, queratinócitos e melanócitos

Após o preparo do tecido, foram obtidas 3 populações de células dos tecidos adiposo, derme e epiderme:

Tecido adiposo: No tecido adiposo prevaleceu células linfomononucleares com a presença de células tronco mesenquimais e fibroblastos dermóides. Para a confirmação desta população de células, uma alíquota foi destinada à metodologia de citometria de fluxo com os marcadores CD34 e CD90. Após esta confirmação, esta população celular foi plaqueada na concentração de 1×10^5 células/cm². O meio de cultura 199 acrescido de 10% de soro fetal bovino, L-glutamina 2mM/mL e solução de antibiótico ajustando o pH a 7,8. As células foram observadas por microscopia invertida utilizando microscópio Axiovert 200-Zeiss® com o registro fotográfico até que a confluência das células atingissem 80% ou mais. O meio de cultura foi trocado a cada 48h.²¹

Derme e epiderme: as células recuperadas desta etapa de digestão foram plaqueadas na mesma concentração anterior e colocadas separadamente em frascos contendo meio de cultura para queratinócitos acrescido de 10% de soro fetal, 2mM de L-glutamina e solução de antibióticos e anti-micóticos. Outra população de célula recebeu o meio condicionado para melanócito MCDB 153, acrescido de hidrocortisona e extrato de pituitária e insulina bovina. A observação e a mudança do meio de cultura foi realizada conforme descrição anterior.²¹

Quando a população celular atingiu quantidade suficiente para o experimento, alíquotas de cada cultura foram isoladas para testes de biologia molecular e imunistoquímica.

Coleta do sangue periférico

Um volume de 20 ml de sangue foi coletado por punção venosa da veia do antebraço, com seringas e agulhas descartáveis. O sangue foi transferido para tubos contendo heparina de baixo peso molecular (livre de sódio) e encaminhado ao laboratório de engenharia celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. A amostra foi processada em gradiente de densidade 1014 (ficoll-Hypaque®) para a separação da camada de linfomonucleares. Após centrifugação sob força de 900g durante 120 minutos, a camada LMN foi retirada, quantificada automaticamente em equipamento Horiba ABX Pentra 60® e plaqueada nas condições específicas para cultura de CTM. A cultura foi avaliada diariamente quanto à condição de confluência. Ao atingir confluência $\geq 80\%$, as células eram submetidas à tripsinização, removidas para ambiente maior, assim sucessivamente até atingirem a quantidade suficiente para a aplicação clínica.

Fase II – CLÍNICA (Terapêutica)

Na segunda fase (II), após análise laboratorial pelo teste de cometa das células do tecido adiposo confirmar que não houve aumento da quebra de DNA, mutações que possam indicar desenvolvimento de célula neoplásica no futuro; os cinco indivíduos voluntários selecionados para o estudo foram submetidos à terapia com implante de células tronco incorporadas ao gel de plaquetas.

Os pacientes foram avaliados por médicos dermatologistas que fizeram o diagnóstico de entrada no protocolo e a delimitação/registro do tamanho e profundidade, bem como estágio da ferida. Nesta etapa incluiu avaliação clínico-laboratorial e retirada do fragmento de pele conforme já descrito. O paciente foi acompanhado clinicamente uma vez por semana avaliando o aspecto e tamanho da lesão antes e após o curativo; características do leito da ferida; avaliação de análise de tecidos subjacentes, bordas, coloração, presença ou não de infecção; aparecimento de tecido de epitelização e remodelamento da ferida.

Os pacientes foram monitorados laboratorialmente no momento do implante com os seguintes dados: hemograma e coagulograma, sendo este realizado mensalmente

para se avaliar possíveis interações com a coagulação sanguínea do paciente. O paciente foi avaliado semanalmente durante os 90 dias de seguimento clínico, fotográfico e 3 controles laboratoriais de coagulograma.

Mensuração da ferida

A Ferida, em geral, apresenta tamanho muito grande, e às vezes atinge todo o contorno da perna. Para tanto, foi colocado um filme plástico aderido ao fundo da ferida e com uma caneta, marcador permanente para, CD/ DVD da marca Pilot, foi traçado o seu perímetro. Em seguida, o filme plástico foi colocado sobre a uma folha de papel branca A4, sobre a qual foi posto uma nova folha, e feito um decalque (figura 08). Este decalque foi fotografado com uma câmera digital, Sony Zeiss, 8.1. Essa foto foi analisada pelo *software Image J*[®], que calculou cinco áreas e cinco perímetros, dando a média e desvio padrão. O cálculo destas variáveis foram realizados antes e após 3 meses de seguimento.²²



Figura 08 – Mapeamento da área em plástico transparente (decalque)

Laserterapia com laser de baixa potência

A laserterapia foi realizada sobre a úlcera de modo a fazer uma varredura sobre toda área que recebeu implante das células tronco mesenquimais, conforme mostra a figura 8. Foi empregado um laser de baixa potência Star Laser 1, da MICRODONT MICRO USINAGEM DE PRECISÃO LTDA, com as seguintes especificações: 110V

de tensão, frequência de 50 a 60 Hz, 4W de potência, fonte luz 40 mW, comprimento de onda (λ) 650nm e varredura 2x2 cm.



Figura 09 – Aplicação do laser de baixa potencia.

Aplicação do curativo com células tronco mesenquimais incorporadas ao gel de plaqueta

A preparação do gel de plaqueta incorporado com as células tronco mesenquimais autólogas foram retiradas da geladeira previamente para atingir temperatura ambiente e não induzir dor nos pacientes.



Figura 10 - Retirada do gel de plaquetas com células tronco mesenquimais autólogas da embalagem.

A ferida foi lavada com soro fisiológico e, após o curativo atingir temperatura ambiente, foi desembalado e retirado o celofane e aplicado suavemente sobre a ferida, conforme figuras 10, 11 e 12.



Figura 11 - Lavagem da ferida com SF (A) e colocação do gel de plaqueta com células tronco mesenquimais na palma da mão com retirada do celofane superior (B).



Figura 12 - Aplicando o curativo com célula tronco mesenquimais de sangue periférico.

Após a aplicação do curativo com células tronco, a ferida foi coberta com um curativo secundário, que recebeu abundante hidratação com soro fisiológico e emfaixada (figura 13). Sendo que o curativo primário com células tronco foi trocado cada 4 dias e o secundário cada 2 dias se necessário (figura 14).



Figura 13 – Hidratação do curativo secundário (A) e enfaixamento da ferida (B).



Figura 14 – Desenfaixamento (A) e lavagem abundante da ferida (B), 4 dias após aplicação das células tronco.

Paciente 01.

Paciente, feminina com 67 anos de idade, branca, procedente do Estado do Pará com diagnóstico de hanseníase aos 20 anos e iniciado tratamento. Foi encaminhada ao ILSL em 1975, quando deu sequência à terapêutica de forma correta. Apresentou seqüelas, com perda de sensibilidade de membros inferiores, perda de dedos e ulcerações nas extremidades, há 40 anos e freqüentes episódios de dor. Na avaliação ortopédica foi indicada amputação, porém a paciente não concordou e foi encaminhada para o implante de célula tronco, (Figura 15).



Figura 15 – Membro Inferior esquerdo da paciente 1 .

Paciente 02.

Paciente feminina, 61 anos de idade, cor branca, com seqüelas de hanseníase, úlceras em membros inferiores, com evolução de 27 anos. Apresentava úlceras em região de membro inferior, acompanhada de processos dolorosos intensos (figura 16).



Figura 16: Membro inferior direito – paciente 2.

Paciente 3

Paciente masculino com 44 anos de idade, cor branca, tabagista, com diagnóstico de hanseníase há 10 anos. Apresentou manchas no corpo com diminuição de sensibilidade em membros inferiores e ulcerações. Foi tratado com poliquimioterapia para hanseníase multibacilar. Foram realizados diversos curativos e três implantes de queratinócitos (2007 – 2009) com discreta melhora (figura 17).



Figura 17- Membro inferior direito paciente 3.

Paciente 04.

Paciente masculino, 68 anos de idade, cor branca, tabagista, ficou 14 anos sem diagnóstico de hanseníase. A história clínica mostrava edema nos pés e parestesia em mãos desde 1989. Foi tratado de forma inespecífica por um período de 2 anos em outros serviços. No decorrer do tempo desenvolveu lesões ulceradas em orelhas, nariz, mãos e pés. Foi internado por 6 meses e em 2005 foi diagnosticado hanseníase quando já apresentava 12 anos de feridas e seqüela nestas áreas. Foi tratado com poliquimioterapia específica e em maio de 2010 apresentava ulcerações em membros inferiores, quando foi incluído neste protocolo (Figura 18)



Figura 18: Membros inferiores do paciente 4.

Paciente 05.

Paciente feminina, 43 anos de idade, portadora de feridas há 13 anos com episódio de infecção generalizada e posterior tromboembolismo e a dor era constante. Além disso, era tabagista, hipertensa, com insuficiência renal apresentava hemangioma em hemidimidio direito. As úlceras receberam enxerto de pele com melhora parcial, sem fechamento da ferida, (Figura 19).



Figura 19 – Membro inferior direito paciente 5.

Indicadores de avaliação

As feridas foram avaliadas em consonância com aspecto, tamanho da lesão antes e após o curativo; características do leito da ferida, tecidos subjacentes, bordas, coloração, presença ou não de colonização e/ou infecção; aparecimento de tecido de epitelização, remodelamento e área da ferida.

Análise estatística

As dimensões das feridas foram avaliadas pelo cálculo da área e do perímetro antes e após o tratamento, respectivamente. O software *instat3* (Graph Pad) utilizado para a análise estatística. Para tanto foi considerada cada ferida como uma unidade amostral. Foi calculada as médias e o desvio padrão. As diferenças estatísticas, entre as médias, foram avaliadas pelo teste “t”, pareado, não-paramétrico de Wilcoxon, sendo considerado significativo $p < 0,05$.

As demais variáveis das feridas foram avaliadas clinicamente.

Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, parecer de nº 3393-2009 (ANEXO 04) e Instituto Lauro de Souza Lima, com parecer CT.:CEP. nº 004/2010 (ANEXO 05). O início do estudo ocorreu após assinatura dos termos de consentimentos livres e esclarecidos (ANEXO 3) e cumpridos os preceitos do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa com seres humanos (CONEP).

RESULTADOS

4- RESULTADOS

Os resultados foram descritos para dois momentos diferentes, envolvendo as fases pré-clínica (fase I) e clínica (fase II), respectivamente. Sendo que na fase pré-clínica, foram descritos os resultados referentes às técnicas da coleta do tecido adiposo, cultivo das células e teste cometa. Na fase clínica, os resultados são referentes ao efeito da terapia com células tronco associadas ao curativo de gel laminar de plaqueta e laserterapia, no processo de reparação de feridas.

4.1. Fase pré-clínica (fase I)

Validação da cultura de pele humana (fase I) pela técnica de separação celular por dissociação mecânica

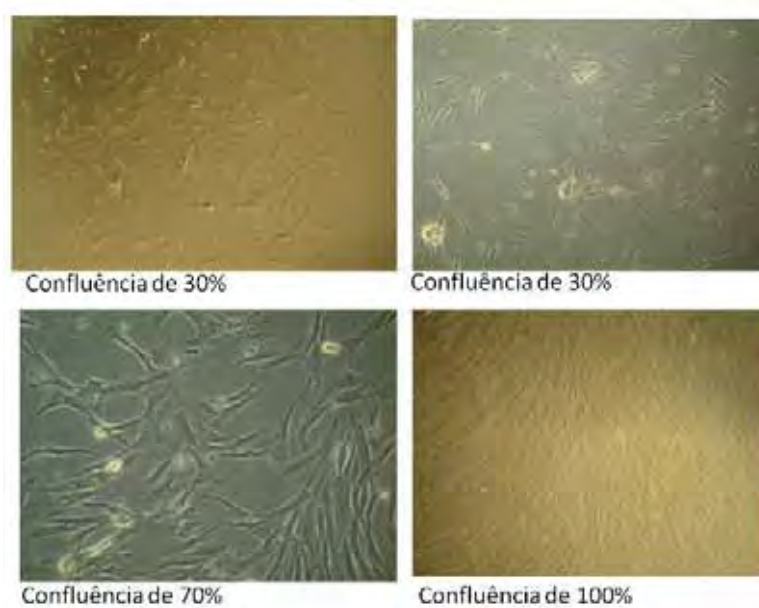


Figura 20. Confluência das células em meio de cultura.

Desempenho das técnicas de dissociação mecânica *versus* enzimática de células tronco mesenquimais de tecido adiposo.

As 5 amostras de tecido foram separadas em segmentos, e estes, dissociados tanto pelo método clássico usando enzima, como pelo processo mecânico que é mais simples, porém bem mais barato embora mais demorado. Assim equaciono-se o custo do procedimento, visto que o uso de enzimas representa alto custo financeiro. Todos os folhetos do tecido adiposo foram divididos em dois segmentos de igual peso, para obtenção das células tronco. Sendo que um foi dissociado mecanicamente com ajuda do cell scraper e o outro fragmento colocado em tudo contendo collagenase. As células foram plaqueadas e avaliada o seu desempenho em % de confluência observado por microscopia invertida. Em todas as amostras o método mecânico foi superior quando comparado ao método enzimático, conforme (figura 20).

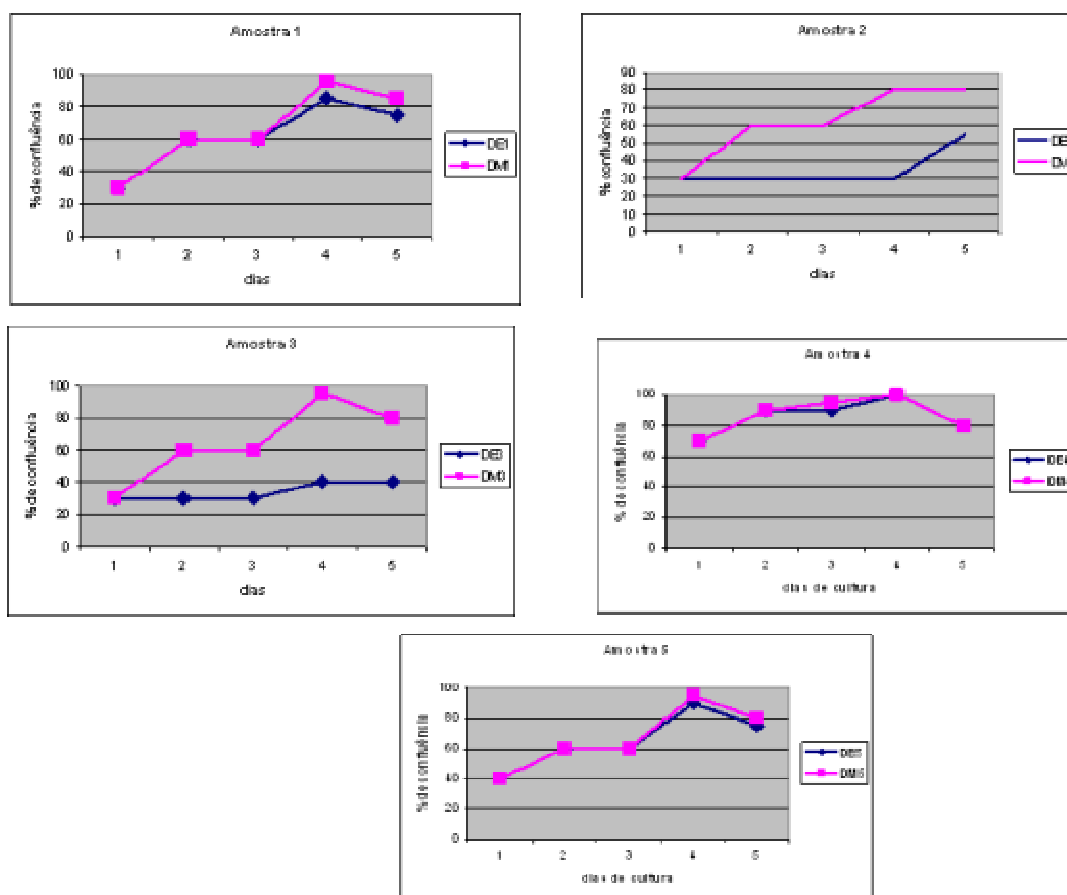


Figura 21 - Desempenho das técnicas de dissociação mecânica *versus* enzimática de células tronco mesenquimais de tecido adiposo.

Desempenho das culturas de CTM ao longo do tempo

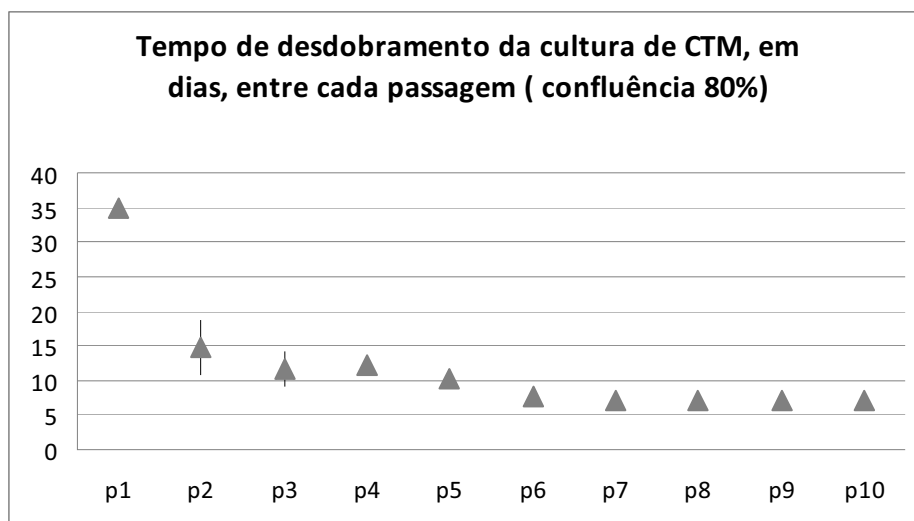


Figura 21 - Tempo de desdobração da cultura de células tronco mesenquimal em dias.

Assim foi evidenciado que a partir da 5ª repicagem, as células atingiram um plateau, sugerindo pouca variabilidade tanto do meio de cultura quanto a habilidade do manipulador, pois se observa um crescimento celular uniforme com pouca diferenciação o que caracteriza uma linhagem purificada pelo método de cultura (figura 21).

Teste Cometa – Fase pré-clínica

Nesta fase, foram processadas as amostras obtidas por ambas as técnicas de dissociação e submetidas ao teste cometa para a seleção da técnica com menor possibilidade de determinar lesão de DNA. Foram contados 50 nucleossomas de cada amostra processada. O gráfico abaixo indica a média dos resultados obtidos. Pode-se observar que nas 50 caudas de cada uma das técnicas avaliadas, encontrou-se 17/50 com escores ≥ 10 para a técnica DE (34%) enquanto que para a dissociação mecânica registrou-se apenas 5 caudas com escore ≥ 10 , ou seja 10%, o que nos assegura, nesta amostragem que as técnicas utilizando a dissociação enzimática podem ser até 3,4 vezes mais determinantes de alterações de DNA e conseqüentemente induzirem a uma transformação neoplásica, (figura 22).

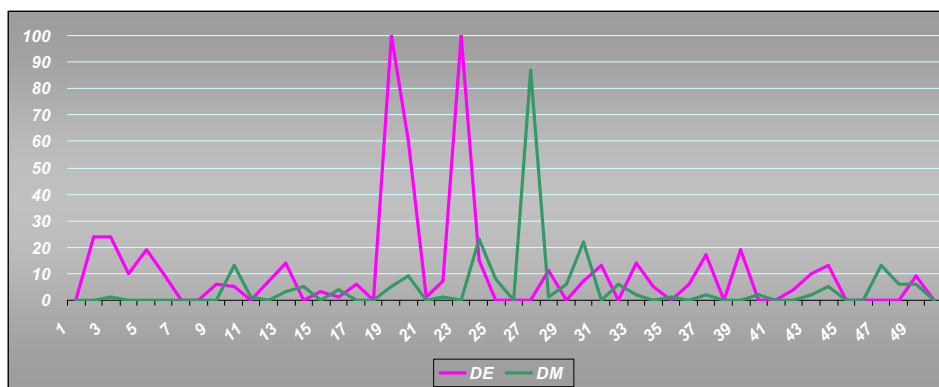


Figura 22 – Análise comparativa de dissociação mecânica e enzimática pelo ensaio cometa.

Tabela 01- Comparação do teste cometa para os 5 pacientes (fase pré-clínica) na pós-cultura com o controle negativo pelo teste para uma média.

n	Controles		Pacientes	
	Positivo	Negativo	Pré-cultura	Pós-cultura
1			21,48	26,48
2			24,29	19,29
3			28,89	33,12
4			20,02	17,07
5			12,28	35,18
Média	69,42	12,65	21,39	26,22
DP	28,88	16,65	6,11	8,05

$t = 3,78$ ($p = 0,009$). Comparação do teste cometa do controle negativo com pré-cultura: $t = 3,21$ com $p = 0,016$.

4.1.2. Fase Clínica (faseII)

Teste Cometa

As amostras pré e pós-cultura foram submetidas ao estudo do teste cometa para avaliação do dano nuclear. No momento pré, 2 pacientes tiveram padrão de baixo dano e 3 outros de médio dano. Estes padrões foram mantidos pós-cultura. No entanto, há que se destacar que são padrões altos em relação aos indivíduos normais, onde somente 10% das análises processadas por dissociação mecânica foram ≥ 20 . Comparando estes resultados com os resultados da padronização verifica-se que o dano existente nos pacientes nas amostras pré, são superponíveis aos danos de DNA nas amostras dos indivíduos normais quando submetidas à dissociação enzimática.

Tabela 02 – Escore de nível de dano nuclear, determinado pelo teste do cometa, em amostras de tecidos submetidos à dissociação mecânica, na pré- e pós-cultura, para os 5 pacientes-estudo, respectivamente.

Nível de dano nuclear pelo teste cometa		Escore determinado nos pacientes	
Valor referência		Amostras pré	Amostras Pós
Sem dano	< 5	0	0
Baixo	6-20%	2*	2(40%)
Médio	21-40%	3**	3(60%)
Alto	40-95%	0	0
Muito alto	100%	0	0

* (porcentagem de pacientes com baixo dano= 40%; ** porcentagem de pacientes com médio dano=60%)

Os marcadores de superfície foram analisados por citometria de fluxo na pré-cultura e evidenciou uma amostra heterogênea de células, enquanto que na pós-cultura a amostra mostrou-se mais homogênea, sugerindo que a cultura funcionou como método de purificação (figura 23).

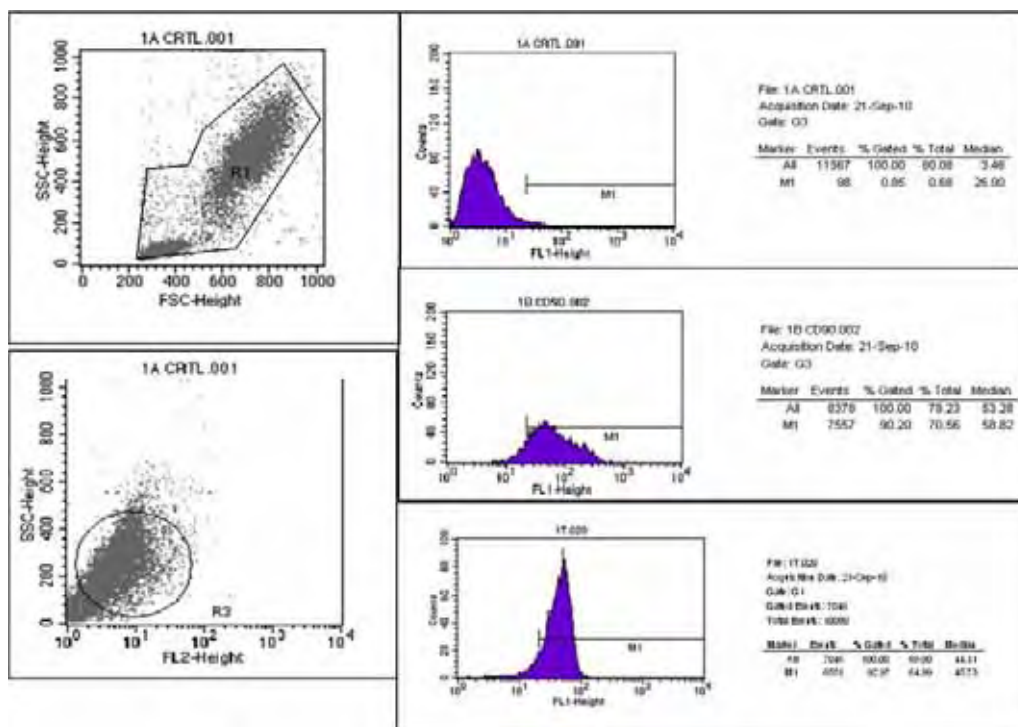


Figura 23 - Análise dos marcadores de superfície por citometria de fluxo.

Os marcadores CD45, CD34 e CD90 das células cultivadas foram monitorados por citometria de fluxo. Este método mostrou que a evolução dos marcadores foi semelhante em 4 pacientes. Contudo um dos pacientes apresentou um dos marcadores com comportamento diferente. Diante deste resultado os testes foram repetidos, e mesmo assim, os resultados foram mantidos. Desta forma este resultado sugere que a expressão fenotípica destes marcadores possa representar um papel importante no entendimento da fisiopatologia da ferida com dificuldade de cicatrização, (figuras 24, 25, 26, 27 e 28).²³

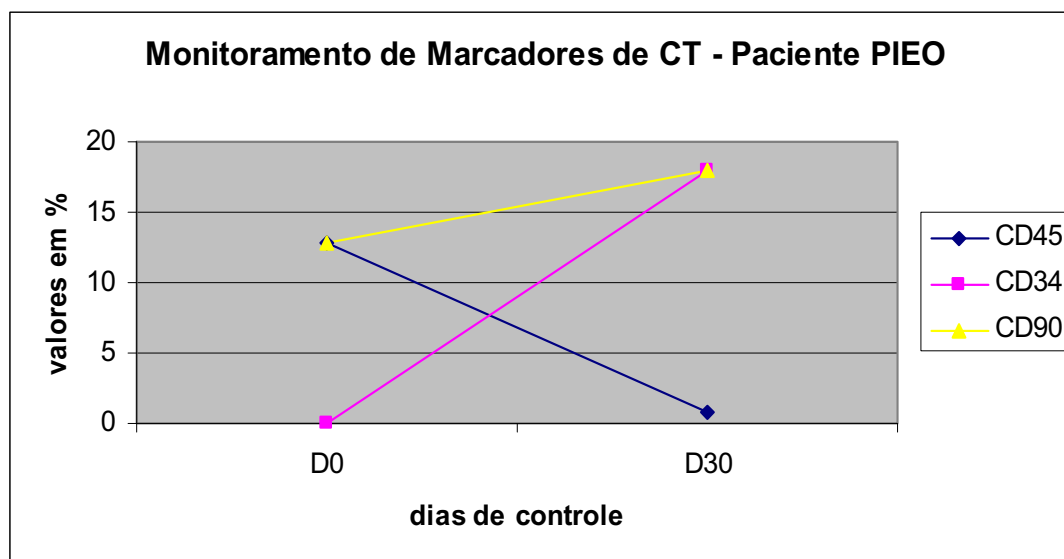
Análise dos marcadores de superfície por citometria de fluxo dos 5 pacientes casos

Figura 24 – Monitoramento de marcadores de células tronco

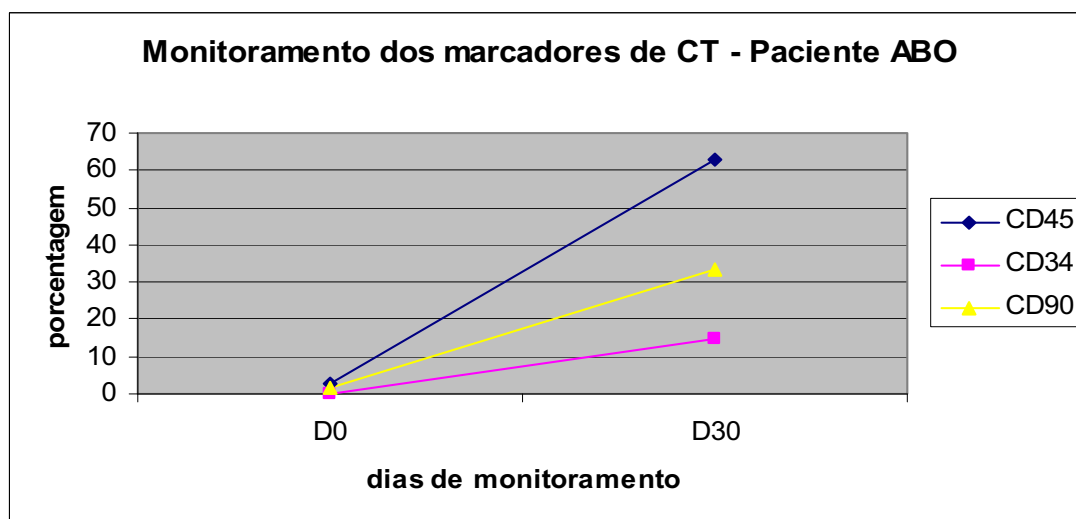


Figura 25 - Monitoramento de marcadores de células tronco.

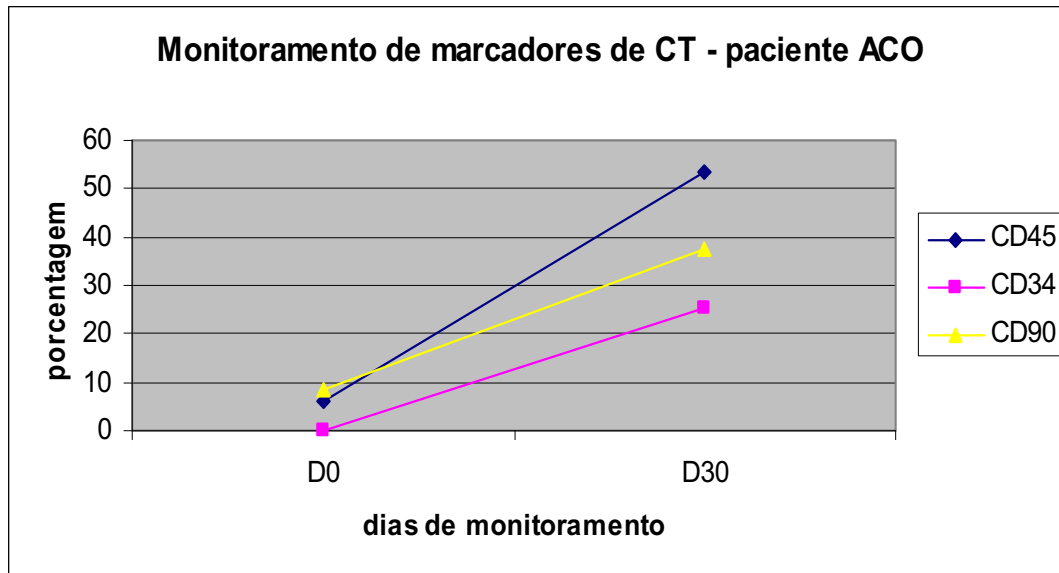


Figura 26 – Monitoramento de marcadores de células tronco

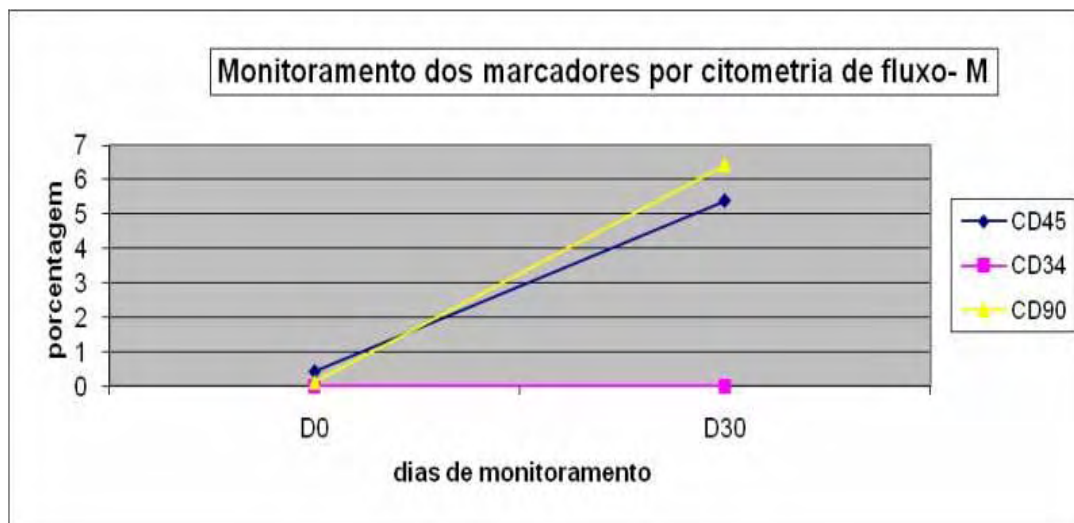


Figura 27 – Monitoramento de marcadores de células tronco

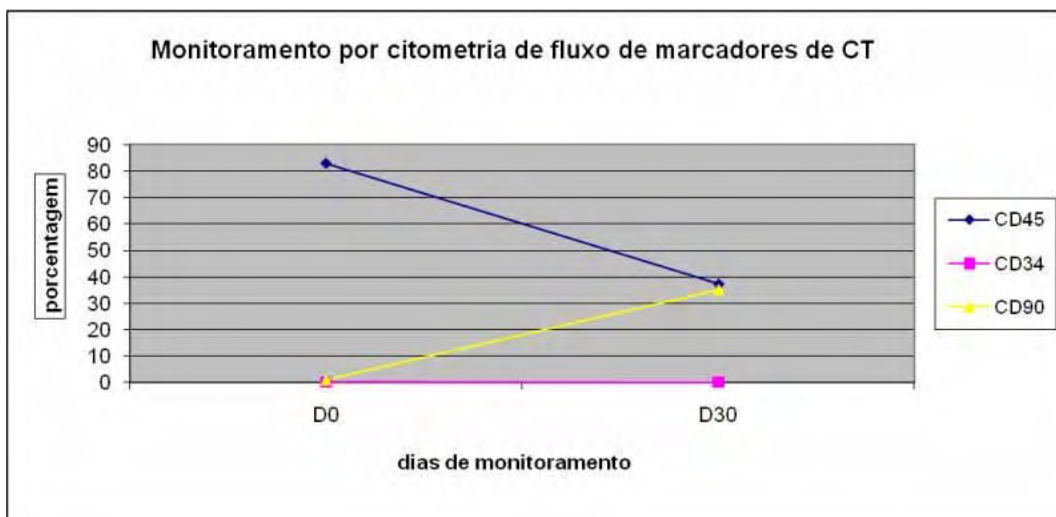


Figura 28 – monitoramento de marcadores de células tronco

Como descrito no material e métodos, as culturas celulares foram acompanhadas por microscopia invertida em contraste de fase. A figura 29 mostra o aspecto inicial da cultura com a formação de clusters de células aderentes (a). Em b, aspecto do crescimento das células com grande confluência em cultura de múltiplas camadas.

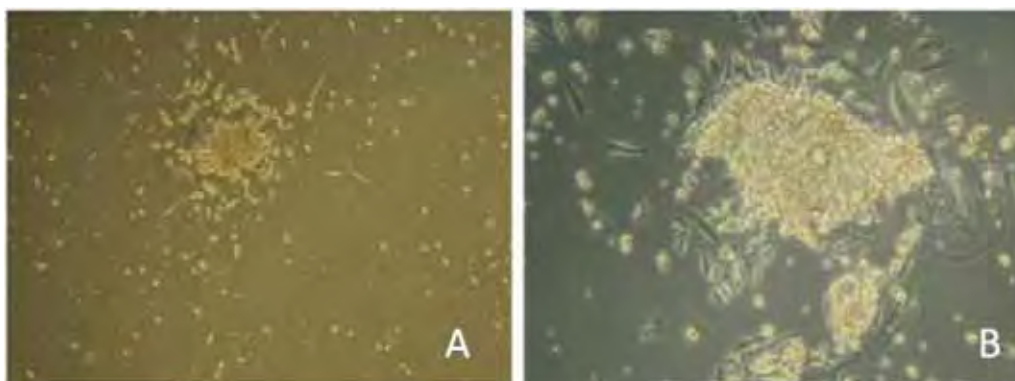


Figura 29- Aspectos fotográficos da cultura celular antes da aplicação clínica de células aderentes de sangue periférico

Na figura 30 são observados respectivamente: A) fase inicial da adesão das células após 48 horas de plaqueamento; B) o alongamento celular é evidente, aspecto fibroblastóide, pouco citoplasma, presença de núcleos de auto-fluorescência e C) confluência celular evidente, prolongamentos se comunicando e a rede de células interagindo, iniciando a formação de tapete celular com uma confluência de 60%.

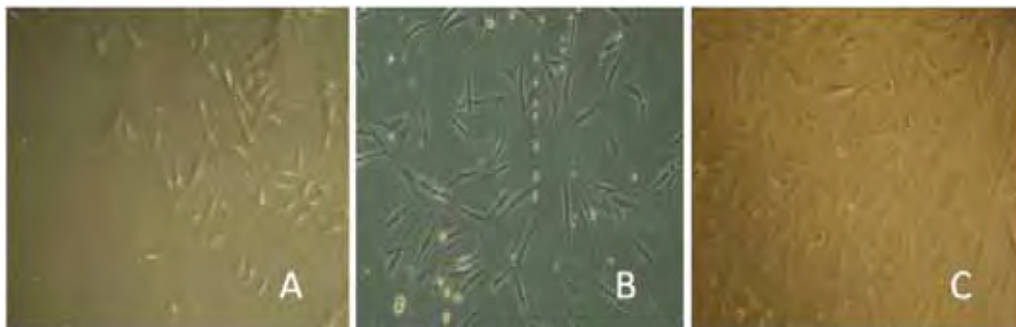


Figura 30- Aspectos fotográficos da cultura celular antes da aplicação clínica da células tronco mesenquimais de tecido adiposo.

Um total de $1,5 \times 10^6$ células foi plaqueado em frasco de cultura T, 25cm^2 acrescido meio de cultura Dmem F-12. A confluências das células foram observadas em diferentes dias, por microscopia invertida em contraste de fase: **D7**, confluência de 30%; **D12**, confluência de 40%; **D21**, 60% de confluência; no trigésimo quarto dia de cultura observou-se a confluência de 100% sendo procedida a 1ª passagem. Do total de células obtidas após tratamento enzimático para remoção do plástico, $1,10 \times 10^6$ foi congelado para futuros testes. Após 5 dias de congelamento as células foram novamente plaqueadas sucessivamente até atingirem a 10ª passagem com a intenção de transformar pelo método em cultura, o fenótipo das CTM em fibroblastos. Observou-se nestes experimentos, que a cada passagem, após as células terem atingido confluência de 100%, o seu tempo de desdobração era progressivamente menor, ou seja, a cultura evoluía muito mais rapidamente. No primeiro plaqueamento, ou primeira passagem, foram necessários 34 dias para se obter 100% de confluência das células. Na segunda passagem apenas 16 dias para se atingir 100% de confluência. Houve estabilização da taxa de crescimentos entre as passagens partir do 7º plaqueamento. O aspecto morfológico das células foi acompanhado por microscopia invertida em contraste de fase, onde observamos na figura 31, em a e b aspecto de fibroblasto clássico, citoplasma mais abundante e baixa auto-fluorescência. O fenótipo destas células foram monitorados por citometria de fluxo evidenciando queda progressiva do marcador CD90. No entanto,

o que mais chamou a atenção foi o perfil, muito alongado e grande, das células marcadas.

A imunohistoquímica para marcadores colágeno I não fibrilar contra-corado com hematoxilina-eosina, conforme figura 31 (D), indicada pela seta, mostrou a presença de células fracamente marcadas. Esta marcação, mesmo que fraca associada à morfologia celular aponta para o fenótipo de fibroblastos.

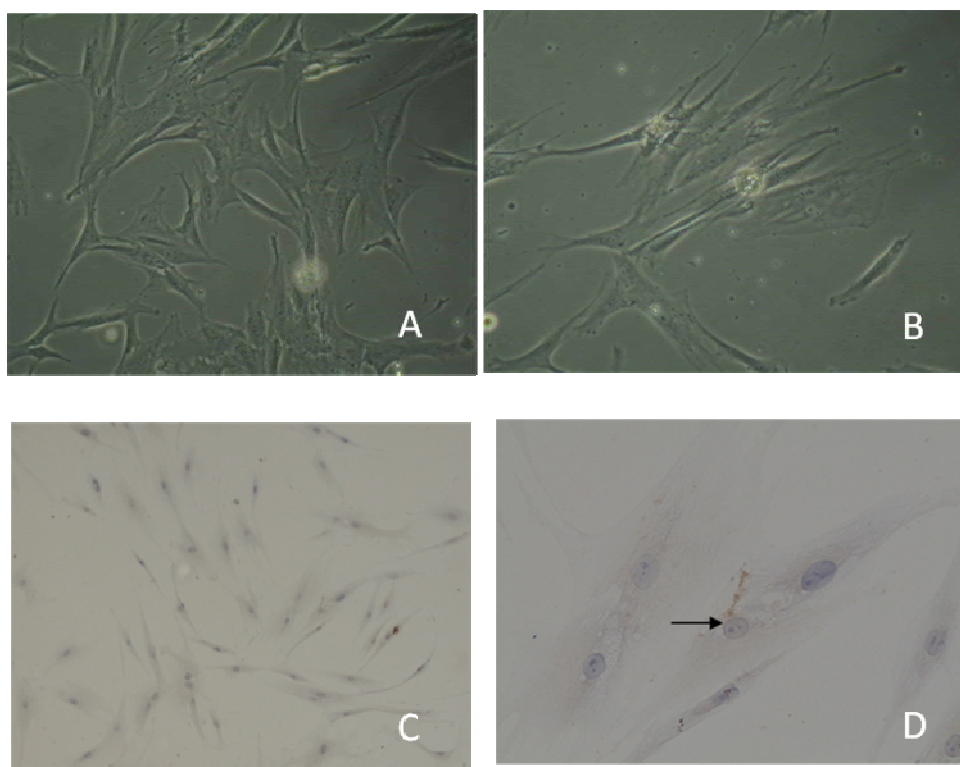


Figura 31- (A e B) Aspecto de fibroblasto clássico, (C e D) fenótipo de fibroblasto

Na figura 32, pode ser observado que na cultura há contaminação com células da epiderme evidenciando prolongamentos muito maiores, numerosos autofilamentos, citoplasma abundante, granulação visível, borda citoplasmática acentuadamente mais escura e multinucleada. Destaca-se a exuberância da autofluorescência. A observação em aumento maiores permitiu observar a presença de grânulos sendo transferidos das células com prolongamentos grande, para as demais, poliédricas, citoplasma mais globoso, correspondendo a passagem dos grânulos de melanina dos melanócitos para os queratinócitos (figura 32 E e F).

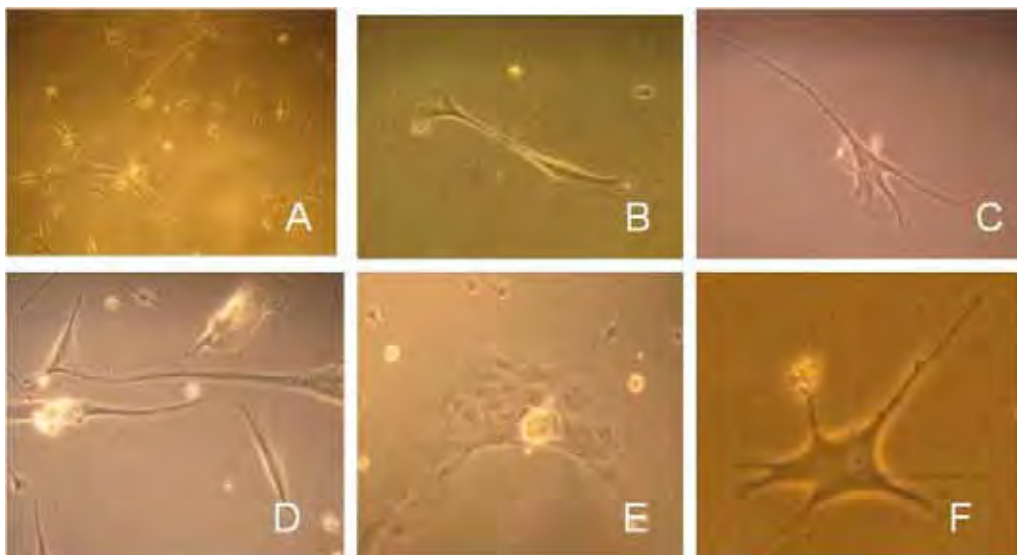


Figura 32 - Cultura de derme com “contaminação” de células de epiderme, com 7 dias de cultura. A) aspecto inicial da cultura de derme com células alongadas e autofluorescência; B) Melanócito se comunicando entre si através dos prolongamentos citoplasmáticos; C) Detalhe do melanócito aumento 20X; D) Vários melanócitos e na porção superior, aproximação de queratinócitos. E) Núcleo de melanócitos autofluorescente num grupo de queratinócito. Observam-se os prolongamentos de melanócitos se comunicando com o agrupamento de queratinócitos. F) Melanócito transferindo melanina para queratinócitos.

No momento da expansão em maior escala, estas células foram transferidas para frascos de cultura T-125cm² formando uma membrana que se destaca do fundo do frasco. Em pacientes de pele branca, a membrana é clara. No paciente de pele negra, a formação de *cluster*, mais enegrecidos foi evidente (Figura 33).

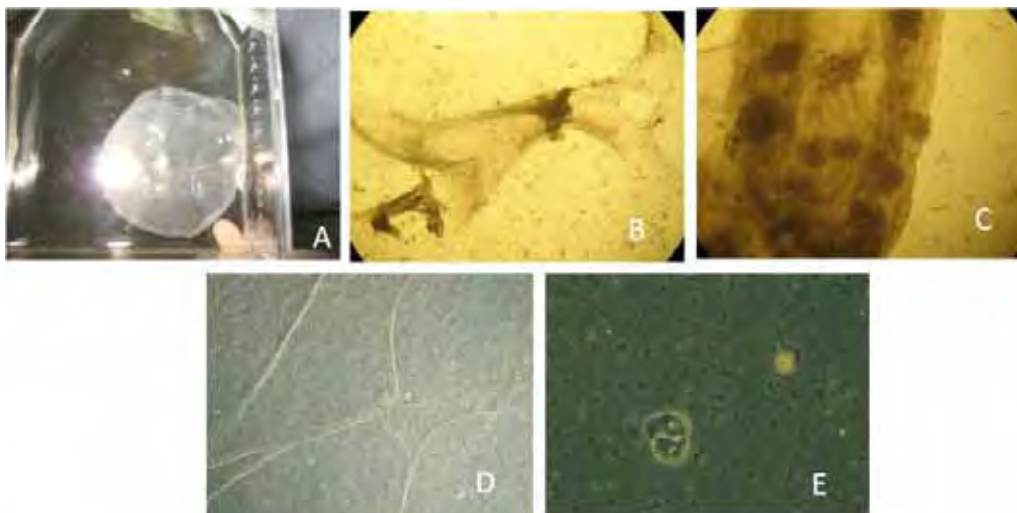


Figura 33 - Aspectos fotográficos da cultura celular antes da aplicação clínica- melanócitos e queratinócitos. A) cultura de queratinócitos e melanócitos em gel de plaquetas de paciente de cor branca. B e C) aspecto enegrecido de paciente cor negra. D e E) detalhe da membrana visto em aumento maior, com a formação de cordões celulares e em F detalhe de queratinócito.

Efeitos da terapia com células tronco mesenquimais incorporada ao gel de plaquetas, associado a laserterapia no processo de cicatrização de feridas.

Os resultados referentes aos efeitos da terapia celular associado à laserterapia foram mostrados para cada paciente, de forma descritiva, possibilitando maior visualização do tratamento.

Assim, para a paciente 1 (figuras 34 A, B, C, e 35), as áreas das feridas 1 antes da terapia, era $164,925\text{cm}^2$, ferida 2 = $4,252\text{cm}^2$ e ferida 3 = $308,182\text{cm}^2$. Na 12^a semana do tratamento, as respectivas áreas foram reduzidas para $46,677\text{cm}^2$, $0,0\text{cm}^2$, $141,236\text{cm}^2$, ou seja, a ferida 2, região plantar, sofreu completa cicatrização, (figura 36 D).

Contudo a cicatrização das feridas 1 e 3, foi parcial, mas apresentou melhora. A borda apresentava cicatrização à medida que o leito também apresentou tecido de granulação e aparecimento de ilhas confluindo com bordas e redimensionando a área para menos (figuras 37A e B).

Além das áreas, foram avaliados os perímetros para cada ferida antes e após a terapia, sendo o perímetro da ferida 1 = $139,289\text{cm}$, ferida 2 = $9,35\text{cm}$ e ferida 3 = $108,732\text{cm}$. Após a terapia, a ferida 1 reduziu seu perímetro para $61,482\text{cm}$; a ferida 2, região plantar, mostra regeneração completa, (figura 36D). Contudo com ferida 3, ocorreu aumento para $119,970\text{cm}$. Isto pode ser decorrente da própria dinâmica de

regeneração e reestruturação da ferida, que nesta fase, sofre invaginações, dividindo uma ferida em duas menores, contribuindo para a elevação do perímetro, (figura 39).



Figura 35 – Aspectos das feridas após curativos com células tronco mesenquimais e laserterapia após 4 dias (A e B) e 7 dias (C).



Figura 36- Aspecto da ferida 2. A) antes do tratamento com curativo de células tronco mesenquimais associado à laserterapia; B) 4 dias após C) 7 dias após e D) 3 meses após.



Figura 37- Aspecto da ferida. A) em 23/07/10 e B) 05/11/10.

Os resultados da terapia celular mostram que, na paciente 2, ocorreu uma redução de 79,63%, 91,97% e 98,22%, nas áreas das feridas 1,2 e 3, respectivamente, conforme tabela 03. Este efeito também foi verificado sobre os perímetros em 38,34%, 53,8% e 87,7%, (tabelas 04) e também com aspecto muito satisfatório, (figura 38).



Figura 38 – Aspectos das feridas após terapia celular com células tronco mesenquimais associada à laserterapia.

Para o paciente 3 os resultados da terapia celular mostraram que houve redução de 41,65%, 48,88% e 75,46% nas áreas das feridas 1, 2 e 3, respectivamente. No tocante aos perímetros ocorreu redução de 49,0 % e nas feridas 1 e 43,4% na ferida 3; enquanto que, na ferida 4 observou-se aumento de 9,6%, mostrando o processo de reestruturação da ferida (tabelas 03 e 04) e ao exame clínico o aspecto destas feridas foram muito satisfatório, apresentando bom tecido de granulação sem infecção, borda com tecido íntegro e sem dor (figura 39).

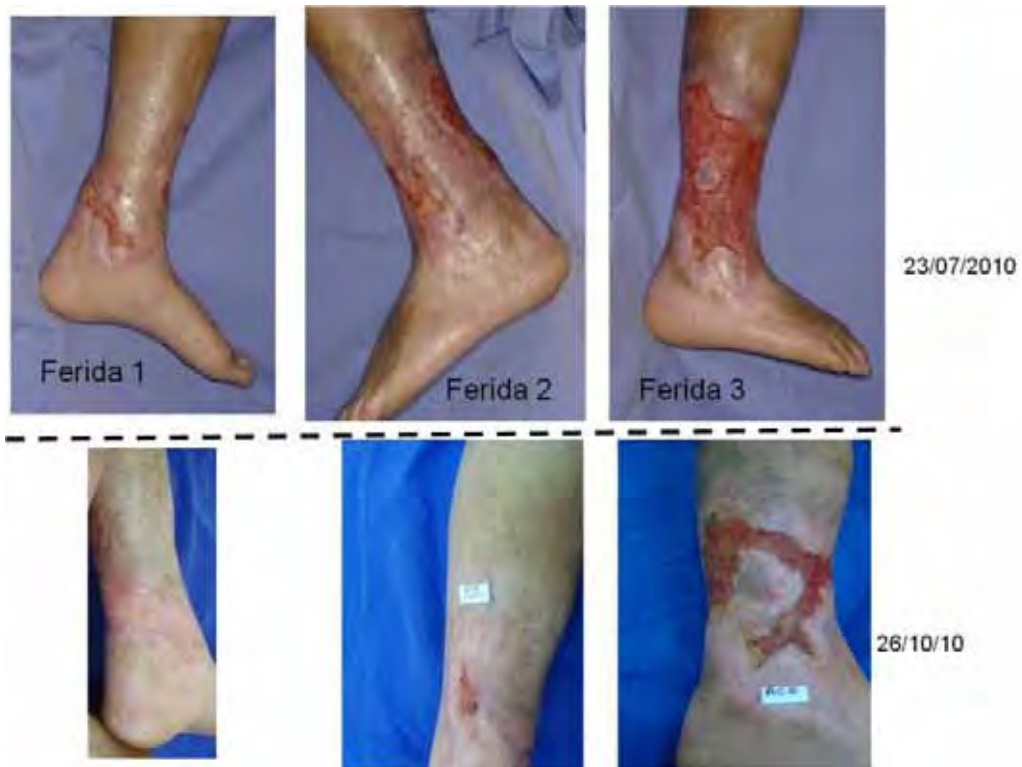


Figura 39 – Aspectos das feridas após terapia celular com células tronco mesenquimais associada à laserterapia.

O paciente 4, apresentava uma ferida, na região plantar, com $9,618\text{cm}^2$ de área. Nos membros inferiores direito e esquerdo as feridas eram em circular na perna, dificultando inclusive as mensurações. Para tanto foi necessário fazer uma oclusão das lesões com um filme plástico e posteriormente fazer o decalque, para fotografá-lo. Assim foi considerado-se uma ferida para cada membro.

Contudo, este paciente, mesmo com toda extensão das feridas respondeu de maneira muito positiva à terapia, pois os resultados mostram que as respectivas áreas das feridas dos membros inferiores esquerdo e direito sofreu redução de 82,0% e 57,4%; com leito em nível da borda e tecido de granulação satisfatório; enquanto que a ferida plantar cicatrizou totalmente (figura 40).

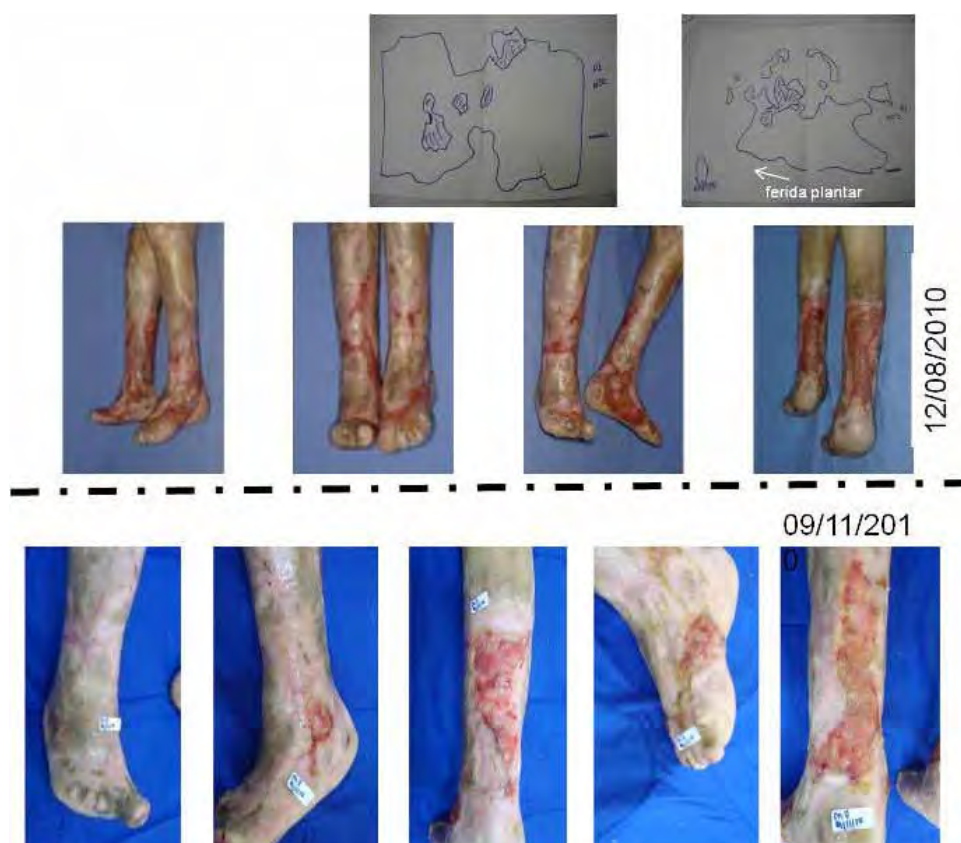


Figura 40 – Características da ferida antes do implante de células trocos mesenquimais 12/08/10, e após a terapia em 09/11/10.

As áreas das feridas nesta paciente foram reduzidas em 57,09% e 44,84%, respectivamente, conforme tabela 03. O leito apresentou-se com pouco tecido de granulação, porém as bordas confluíram-se e com consideráveis sinais de reparação, além de não apresentar mais queixa de dor.

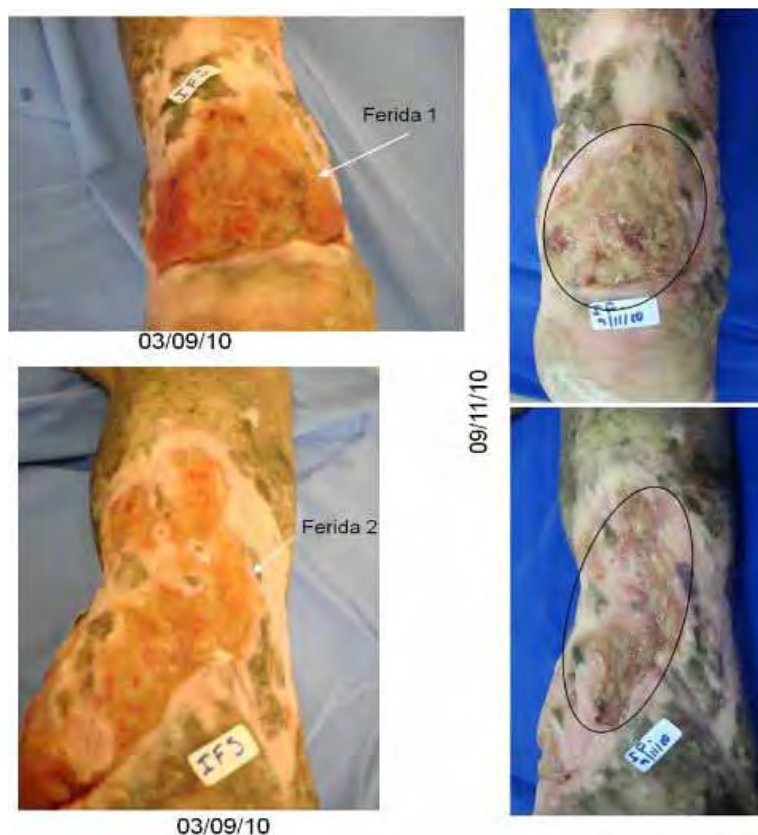


Figura 41 – Aspecto da ferida antes da terapia, em 03/09/10 e após terapia (09/11/10).

Como pode ser observado nas Tabelas 03 e 04, na paciente portadora de 3 feridas, o menor percentual de fechamento foi de 54,17; no entanto, a ferida 2, cicatrizou 100%. No tocante ao paciente 2, o menor índice foi de 79,63% e o maior de 98,22%. Contudo o paciente 3 corresponde ao que menos respondeu 41,65 X 75,46%. O resultado do paciente 4, com a terapia celular, é semelhante à resposta obtida com a paciente 1.

Os resultados também foram abordados no âmbito da ferida individualmente, como uma unidade amostral, de maneira que a casuística do presente estudo fique maior

e com isto a análise estatística torna-se mais robusta, onde os resultados possam ser mais elucidativos. Assim as tabelas 03 e 04; figuras 42 e 43 mostram que terapia com células tronco mesenquimais associada à laserterapia reduziu significativamente as áreas de todas as feridas. Quanto ao perímetro também ocorreu redução significativa na maioria dos pacientes. Assim tocante à estas duas variáveis pode-se observar o perfil do processo de cicatrização de cada ferida.

Tabela 03 – Áreas das feridas de 5 pacientes antes e após tratamento com células tronco mesenquimais incorporadas ao gel laminar de plaquetas associado à laserterapia.

Paciente	Feridas	Área (cm ²)		
		Pré-tratamento	Pós- tratamento	Redução da ferida em (%) *
1	1	164,925	46,677	71,69
	2	4,252	0,0	100
	3	308,182	141,236	54,17
2	1	59,628	12,146	79,63
	2	28,434	2,282	91,97
	3	1,856	0,033	98,22
3	1	46,840	27,330	41,65
	2	2,913	1,489	48,88
	3	320,53	78,635	75,46
4	1 MIE	312,53	55,978	82,0
	2 MID	164,39	70,107	57,4
	3 plantar	9,618	0,00	100
5	1	52,564	22,555	57,09
		44,688	24,648	44,84
Média	n=14	180,67	33,572	-
DP		122,70	40,861	-

MIE = área total das feridas do membro inferior esquerdo; MID = área total das feridas do membro inferior direito; P = 0,0001; * reparação da ferida.

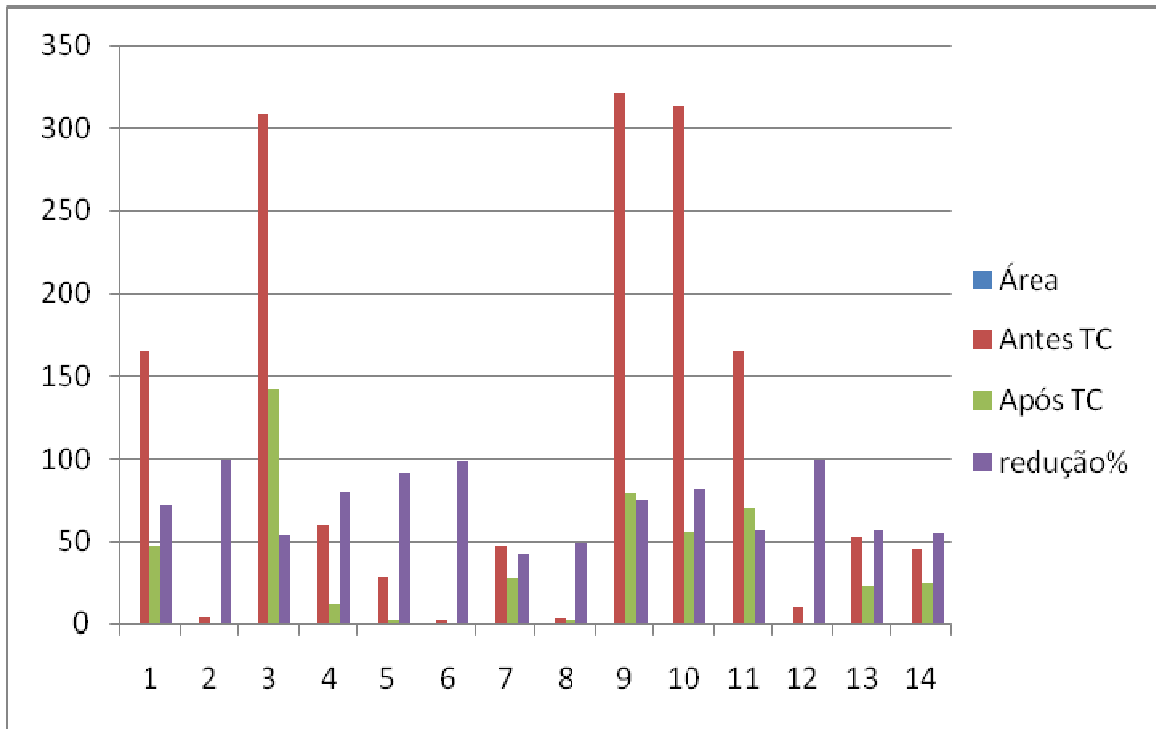


Figura 42- Efeitos da terapia celular com célula tronco mesenquimais associada à laserterapia sobre a area de 14 feridas .

Tabela 04 – Perímetros das feridas de 5 pacientes antes e após tratamento com células tronco mesenquimais incorporadas ao gel laminar de plaquetas associado à laserterapia

Paciente	Ferida	Perímetro (cm)		
		Pré-tratamento	Pós- tratamento	Diferenças (%)*
1	1	139,289	61,482	-55,8
	2	9,350	0,0	- 100,0
	3	108,732	119,970	+ 10,3
2	1	35,339	21,763	- 38,4
	2	21,343	9,848	- 53,85
	3	6,367	0,778	- 87,78
3	1	61,524	31,350	- 49,0
	2	8,677	9,508	+ 9,57
	3	94,329	53,430	- 43,5
4	1 mie	77,606	58,847	- 24,22
	2 mid	140,37	59,119	- 57,88
	3 plantar	9,618	0,0	- 100
5	1	31,810	45,249	+ 42,0
	2	61,118	20,264	- 67,00
Média	n= 14	57.319	35.115	–
DP		48,322	33.770	–

MIE = perímetro total das feridas do membro inferior esquerdo; MID = perímetro total das feridas do membro inferior direito; P = 0,0001; *Comportamento do perímetro: (+) aumento e (-) redução.

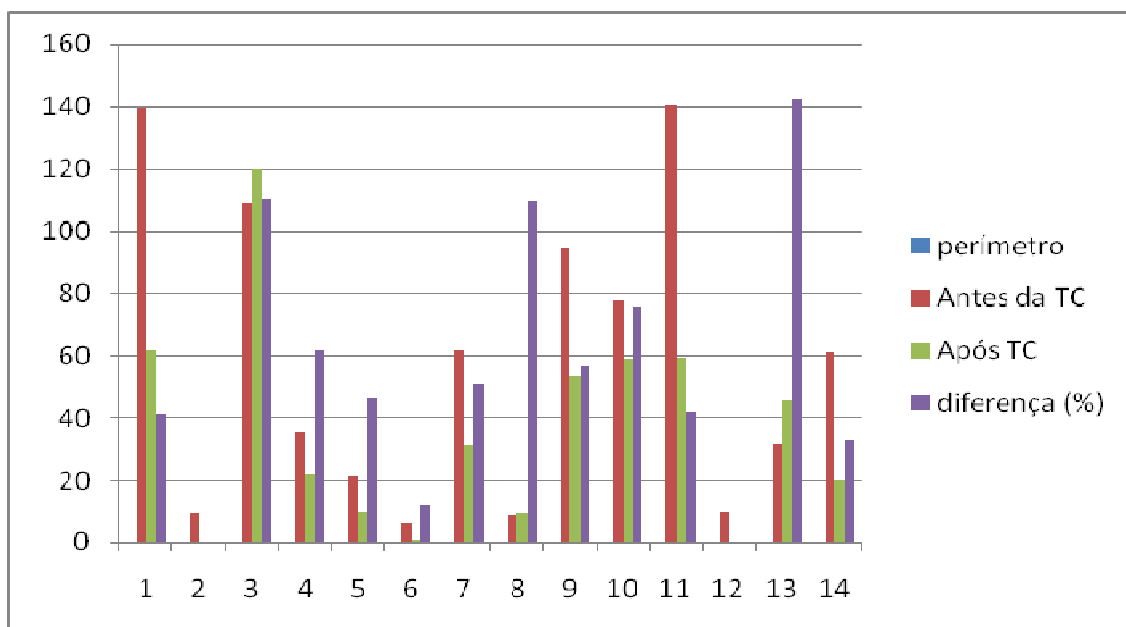


Figura 43- O gráfico mostra o perímetro de cada ferida antes e após a terapia celular associada à laserterapia..

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A fisiopatologia das Feridas crônicas é complexa e os processos de regeneração envolvidos incluem coagulação, inflamação, com a participação de citocinas; angiogênese e epitelização.²⁴

As feridas crônicas são acompanhadas por alterações na matriz extracelular secundárias ao estresse, às forças de cisalhamento mecânica e inflamação no microambiente ao redor. Estas alterações resultam na ativação de fibroblastos que expressam feixes contráteis e α actina de músculo liso diferenciando-se em miofibroblastos. Os miofibroblastos participam na cicatrização de feridas através da migração, proliferação e contração necessárias para restaurar a homeostase do tecido danificado. A recuperação da fisiologia normal requer a resolução da inflamação associada à lesão.²⁵ Evidências atuais demonstram claramente a importância da rede local do estroma na mediação e no clearance de células inflamatórias ativas.²⁶

O reparo tecidual inadequado e agressões contínuas podem resultar em inflamação crônica e levar a fibrose. No nível celular, acúmulo e persistência de miofibroblastos durante a reparação tecidual e cicatrização tem sido proposta como uma das principais causas de fibrose.²⁷ Este processo está associado com a transformação de granulação tecido em uma cicatriz hipertrófica com a produção excessiva do MEC e rarefação da microvascularização. A fibrose é modulada pela "interação leuco-estromal" em um processo dinâmico.

A busca para solução deste problema data dos primórdios da humanidade. Nesta caminhada a humanidade possui mais de 2 dezenas de princípios ativos empregados como curativos, incluindo os ácidos graxos essenciais, alginatos, biomembranas, agentes desbridantes e adsorvente; agentes enzimáticos que degradam o colágeno e/ou a fibrina; os hidrocolóides que umidificam a ferida os antimicrobianos e os hemocomponentes que induzem a divisão e proliferação celular. Contudo ainda há uma grande incapacidade destes agentes interagirem na complexa dinâmica de reparação tecidual.

Neste contexto, a engenharia de tecido e a medicina regenerativa dispõem grandes esforços para gerar novas terapias, para pacientes com doenças crônicas, que o

organismo não consegue mais restaurar a função tecidual, sendo que para a medicina as células tronco constituem o foco principal.¹⁰

Células-tronco mesenquimais são considerados como um dos tipos de células mais promissoras para aplicações terapêuticas, se tornando o ícone da medicina regenerativa. Mecanismos completamente responsáveis pela função terapêutica não são totalmente compreendidos, e podem envolver a diferenciação, ou, como a maioria das evidências apontam, atividade parácrina das células. A capacidade de modular o sistema imunológico abre uma ampla gama de aplicações, principalmente para as doenças auto-imunes e doença do enxerto contra o hospedeiro. Estudos pré-clínicos e clínicos mostram resultados promissores, apesar de ainda persistir alguma controvérsia relatada, indicando a necessidade de investigação básica e pré-clínicos sobre seu potencial terapêutico.^{28 e 29}

Durante os últimos anos, uma intensa pesquisa centrou-se nas células tronco adultas, mostrando que cada órgão ou tecido tem seu próprio compartimento de células-tronco. Estas células estaminais órgãos-específicos são as células responsáveis pela ciclagem lenta substituindo células danificadas em um processo que envolve a proliferação e a diferenciação.³⁰ A taxa de reposição de células-tronco vai depender da taxa de morte celular por apoptose ou lesão tecidual, que é variável para diferentes órgãos ou tecidos. Alguns órgãos, como a pele e intestino, têm uma taxa de renovação rápida (alta rotatividade). O *turnover* das células a serem reparadas tem de ser levado em consideração na hora de se eleger o tecido doador de células tronco. Em função disto, e do fenômeno de *home* natural que ocorre, atualmente, considera-se que em terapêutica deva ser utilizado as células tronco tecido específico.³¹

No presente estudo foram avaliados os efeitos da terapia das células troncos mesenquimais incorporadas ao gel de plaquetas associado à laserterapia. A associação de 3 agentes inovadores : células tronco mesenquimais tecido-específico, curativo bio-ativo e a laserterapia evidencia a tendência atual na abordagem das feridas crônicas, levando-se em consideração que são sempre sua etiopatogenia é multicausal. Esta associação permitiu usar produto de duas gerações: gel de plaquetas como meio de microencapsulação das células tronco considerado como terapia celular indutiva que aumenta o poder das próprias células tronco a se diferenciarem no tecido de interesse no

local da lesão. As feridas foram avaliadas clinicamente quanto a presença de tecido de granulação, coloração, odores e presença de episódios dolorosos. As dimensões da ferida foram avaliadas calculando-se a área superficial e o perímetro, antes e após a terapia, empregando um *software ImageJ*[®].

Na fase pré-clínica comparou-se o uso da enzima de dissociação, colagenase tipo I, com métodos menos agressivos denominados dissociação mecânica. Os resultados em cultura celular foram surpreendentes: não houve diferença significativa nos tempos de desdobraimento da cultura que comprometessem sua aplicabilidade. Na avaliação dos resultados do ensaio Cometa para quantificar o dano de DNA observou-se que a técnica de dissociação enzimática determina maior dano de DNA, mas amostras pré-cultura quando comparados com resultados da dissociação enzimática. Apesar de a literatura apontar as técnicas enzimáticas como de eleição, estes resultados sugerem o uso de técnicas mais conservadoras, laboriosas, mas que são mais seguras quando se trata de aplicação terapêutica futura, como o caso da dissociação mecânica com auxílio de *cell scrapper*.

No monitoramento das diferentes culturas: tronco mesenquimal, fibroblasto dermóide, melanócitos e queratinócitos e sua observação pelos aspectos morfológicos, histológicos e imunohistoquímica evidenciam a importância dos marcadores, tendo em vista que duas das populações celulares apresentam aspecto por microscopia invertida muito semelhante: células tronco mesenquimais e fibroblastos. Mesmo com auxílio de marcadores, alguns autores relatam que há dificuldade de diferenciar CTM de fibroblastos, a não ser pela sua capacidade de sofrer diferenciação em outros tecidos. Neste trabalho, optou-se por fazer o co-cultivo de melanócitos e queratinócitos tendo em vista o processo dinâmico de cooperação destas células.³² O melanócitos obtidos parecem delgados com uma protuberância central contendo seus núcleos vesiculares. Em ambos os pólos, pequenos inchaços globulares são sempre observados representando melanossomas a serem transferidos pelos prolongamentos dendríticos. O processo de coepração entre as células pode ser registrado (figura FD).

O método de citometria de fluxo foi a ferramenta tecnológica utilizada para monitorar o desempenho das culturas com diferentes marcadores CD34, CD45 e CD90. Em todos os pacientes foi padronizada a quantidade de célula a ser plaqueada : 1×10^5 células. O desempenho de cada um dos 5 pacientes da fase clínica foi diferente. O

cultivo das células dos 5 pacientes podem assim ser distribuídas: 3 amostras com curva de crescimento superponível ao padrão estabelecido na fase pré-clínica (paciente 1, 2 e 3) e dois outros pacientes, cujas amostras tinham uma taxa de desdobraimento muito lentificada. Neste caso, a cultura foi lenta, mais difícil. Estes resultados podem eventualmente estar relacionados ao dano de DNA que estes pacientes já apresentam tendo em vista o resultado do ensaio cometa que para um paciente foi de médio dano na amostra pré (33%), mantendo este perfil com as amostras cultivadas, e/ou ainda com as co-morbidades que os mesmos apresentam. No segundo caso em que a amostra cresceu lentamente, o ensaio cometa mostra-se com percentual de dano que diminuiu durante o processo de cultivo celular, dado este já descrito na literatura.³³

Os resultados da fase clínica mostraram consideráveis benefícios para os sujeitos da pesquisa, em todos os pacientes. O perímetro também foi reduzido para maioria. Porém, em três pacientes, uma ferida aumentou o perímetro. Contudo tal fato não implica necessariamente que cicatrização não esteja ocorrendo. Há situações em que perímetro da ferida pode aumentar durante o processo de cicatrização, pois a invaginação da borda, formando ilhas de tecido, indicando cicatrização. Além da redução das dimensões da ferida os episódios dolorosos também reduziram, em três dos 5 pacientes que apresentavam fortes dores antes da terapia. Os efeitos reparadores e analgésicos obtidos nesta pesquisa, com terapia celular, estão de acordo com os resultados encontrados no tratamento de úlceras de córneas com células tronco mesenquimais de medula³⁴, e também melhora significativamente os parâmetros de úlceras de extremidades com dificuldade de reparação.³⁵ Este fato pode ser explicado pela elevada quantidade de mediadores químicos, em especial o TGF β , modulando a resposta inflamatória e protegendo terminações nervosas de dano.³⁵

Entretanto no presente trabalho foram empregadas células tronco mesenquimais obtidas de pele de abdome respeitando a orientação internacional que aponta para a tendência do uso de células tronco tecido específico. Como em estudo anterior desenvolvido no laboratório de Engenharia celular do Hemocentro de Botucatu evidenciou que fragmentos de tecido adiposo, de mesmo tamanho, possuem quantidades diferentes de células tronco mesenquimais, e que colocadas em cultura, as células obtidas de braço, abdome, dorso e coxa, possuem também uma capacidade de

desdobramento (multiplicação) diferentes. As amostras de CTM de abdome crescem 3-4 vezes mais rápido do que as demais.³⁶

O outro aspecto que deve ser salientado neste trabalho é o fato das células tronco quando incorporadas ao gel de plaquetas, pode potencializar sua; visto que o gel de plaquetas é rico em fatores de crescimento e é usado individualmente na terapia de feridas crônica com resultados favoráveis.⁸ O uso de cola de fibrina e gel de plaquetas em cirurgia plástica tem aumentado inclusive em úlceras venosas onde os autores evidenciaram melhora consistente na associação de plasma rico em plaquetas e células da gordura autólogas retiradas de forma extemporânea, sem cultivo.³⁷

Além dos fatores de crescimento do gel de plaquetas a literatura também relata as células tronco mesenquimais tem sido de grande interesse também na cardiologia pelo fato produzirem citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e podem mediar processos indutores de neovascularização efeitos antiinflamatório e antiapoptótico e até mesmo antiarrítmico.³⁸

Os resultados deste projeto também permitem cogitar a contribuição da fototerapia, com laser de baixa frequência, neste estudo, embora os resultados não tenham sido analisados separadamente. Tais benefícios são descritos na literatura e há relatos que mostram a participação efetiva da laserterapia de baixa frequência na cicatrização de úlceras crônicas. Reforça esta hipótese o fato do FDA a aceitá-la como tratamento clínico eficaz para cicatrização de tecidos, visto que há aumento da motilidade de queratinocitos, liberando fatores de crescimento, além de transformar fibroblastos em miofibroblastos e diminuir o infiltrado inflamatório, reduzir a dor e estimular a regeneração tecidual.^{39 e 40}

Diante do exposto, este trabalho sugere que as células tronco mesenquimais incorporadas ao gel de plaquetas e a fototerapia constituem numa terapia promissora para pacientes portadores de feridas crônicas.

Naturalmente que o número de pacientes estudados ainda é muito reduzido. Portanto há necessidade de novos estudos para compreender a dinâmica de cicatrização das feridas e, possíveis mecanismos de interação entre células tronco e o processo de

reparo tecidual. Entretanto este estudo representa uma contribuição adicional no espectro da medicina regenerativa. Inclusive ponderando o papel da laserterapia de baixa frequência neste contexto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. Considerações finais

- A obtenção das células por dissociação mecânica mostrou-se superior devido ao seu menor escore de quebra de DNA, Sendo assim, é melhor indicada para a aplicação clínica. (mais trabalhosa)
- O Biogel (gel laminar de plaquetas) comprovou ser um excelente meio de microencapsulação das CTMs, fibroblastos e queratinócitos.
- A aplicação do Biogel com CTM, mostrou signitiva melhora clínica nos 5 pacientes, em especial com a diminuição das manifestações inflamatórias e dolorosas.
- A enxertia de lâminas de pele recobertas com o Biogel associado a laserterapia apresenta bons resultados na cicatrização de feridas de extensões menores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mandelbaum SH, Pampado EDS, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares. *An Bras Dermatol.* 2003; 78(4): 393-408,
2. Universidade Católica de Goiás. Santa Casa de Misericórdia de Goiânia. Comissão de controle de infecção hospitalar Serviço de controle de infecção hospitalar: Manual de Curativos. Goiânia: UCG; 2005 [Acesso em: 18/01/2011]. Disponível em: <http://www.santacasago.org.br>.
3. Pereira LA. Revisão sistemática da literatura sobre produtos usados no tratamento de feridas [Dissertação.] Goiania: Universidade Federal de Goiás; 2006.
4. Nicolosi JG, Moraes AM. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. *In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 6, 2005, Resumos Eletrônicos. Campinas, Brasil [Acesso em: 13/10/2008]. Disponível em: www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xiiicongresso/resumos.
5. Agencia de Vigilância Sanitária (Brasil). Ministério da Saúde. Resolução nº 153, . de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos [portaria na internet]. Diário Oficial da União 14 de jun. de 2004. [Acesso em: 13/10/2008]. Disponível em: <http://www.legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=11662..>
6. Garcia, M. Uso de Biocurativo na abordagem de úlceras por pressão [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 2003.
7. Dusse LMSA, Macedo AP, Batschauer AP, Carvalho MG. Platelet – Rich Plasma and its application in dentistry. *RBAC.* 2008;40(3); 193-197.
8. Lourenço EA, Pacheco SAF, Almeida CIR, Cossi M. Adesivo de fibrina-conceitos e aplicações em septoplastias. 1983; Jul-sep:(49)3:18-21.
9. Crovetti G. *et al.* Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci.* 2004; (30)2; 145-151.
10. Borzini P, Mazzucco L, Giampaolo A, Hassan HJ. Platelet gel - the Italian way: a call for procedure standardization and quality control. *Transfus Med.* 2006; (16)4; 303-4.

11. Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. *Int J Clin Exp Med*. 2010; Sep; 7;3(4):248-69.
12. Opromolla DVA. Noções de Hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p.
13. Barreto JG, Salgado CG. Clinic-epidemiological evaluation of ulcers in patients with leprosy sequelae and the effect of low level laser therapy on wound healing: a randomized clinical trial. *BMC Infect Dis*. 2010; (10);10:237.
14. Khanolkar VR. Studies in the histology of early lesions in leprosy. *Lepr India* 24, p. 62-77, 1952.
15. Shetty VP, Antia NH, Jacobs JM. The pathology of early leprosy. *Journal of Neurological Science*. 1988; Dec: (88); 115-131.
16. Bhatt YC, Panse NS, Vyas KA, Patel GA. Free tissue transfer for trophic ulcer complicating leprosy. *Indian J Plast Surg*. 2009; Jan-Jun:42:115-7
17. Rai VM, Balachandran C. Necrotic erythema nodosum leprosum. *Dermatol Online J*. 2006; Mar 30:12(3):12
18. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1283-316.
19. Wu Y, Brock AR, Wang Y, Fujitani K, Ueda R, Galko MJ. A blood-borne PDGF/VEGF-like ligand initiates wound-induced epidermal cell migration in *Drosophila* larvae. *Curr Biol*. 2009; Sep: 15;19(17):1473-7
20. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 123: 291-98.
21. Souto LRM. et al. Model for human skin reconstructed *in vivo* composed of associated dermis and epidermis. *São Paulo Méd J*. 2006;(2)124:71-6.
22. Abbade LPF. Estudo sóciodemográfico e clínico de pacientes portadores de úlcera de estase [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 2001.
23. Ravelli, J. Marcadores de superfície de Células-tronco [monografia]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 2010.
24. Fivenson DP, Faria DT, Nickoloff BJ, Poverini PJ, Kunkel S, Burdick M, Strieter RM. Chemokine and inflammatory cytokine changes during chronic wound healing. *Wound Repair Regen*. 1997;Oct-Dez: 5(4):310-22.

25. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J* 2007;21:325-32.
26. Ariel A, Serhan CN. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol.* 2007; Apr:28:176-83.
27. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest.* 2003; Dez:83:1689-707.
28. Zhou, Q. Melton, D.A. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell.* 2008;3: 382-388.
29. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003; Nov:102: 3483-3493.
30. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd E, Kloster A, Halvorsen YD, Storms RW, Goh B, Kilrov G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006; 24: 376-385.
31. Morrison, S.J. and Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008; 132 598-611.
32. & Todd, C; Hewitt, S.D; Kempenaar, J; Noz, K.; Thody, J and Ponc, M. Co-culture of human melanocytes and keratinocytes in a skin equivalent model: effect of ultraviolet radiation. *Archives of Dermatological Research.* 1993; 285(8),
33. Lim CK, Yaacob NS, Ismail Z, Halim AS . In vitro biocompatibility of chitosan porous skin regenerating templates (PSRTs) using primary human skin keratinocytes. *Toxicology in Vitro.* 24: 721–727.
34. Chebbi CK, Kichenin K, Amar N, Nourry H, Warnet JM, Barritault D, Baudouin C. Pilot study of a new matrix therapy agent (RGTA OTR4120) in treatment-resistant corneal ulcers and corneal dystrophy. *J Fr Ophtalmol.* 2008 May;31(5):465-71.
35. Dash NR, Dash SN, Routray P, Mohapatra S, Mohapatra PC. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res.* 2009 Oct;12(5):359-66.
36. Nogueira, FR, J. Determinação quantitativa de células tronco mesenquimais de tecido adiposo [monografia]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 2010.
37. Cervelli V, Gentile P, Grimaldi M. Regenerative Surgery: Use of Fat Grafting Combined with Platelet-Rich Plasma for Chronic Lower-Extremity Ulcers- *Aesth Plast Surg.* 2009;33(3):340-5.

38. Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J, Wang T. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. In press 2010.
39. Rocha Jr AM, Oliveira RG, Farias RE, Andrade LCF, Aarestrup FM. Modulation of fibroblast proliferation and inflammatory response by low-intensity laser therapy in tissue repair process. *An Bras Dermatologia*. 2006;81(2):150-6.).
40. Minatel DG, Chukuka Samuel Enwemeka CS, Franca SC, Frade MAC. Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *An Bras Dermatol*. 2010;85(6):849-55.

ANEXOS

ANEXO I

INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO**Dados do paciente:**

Nome: _____ Idade: _____

Pront.: _____

Data: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Raça: _____

Avaliação geral: MID () MIE ()

- PA braquial: _____ PA pedial: _____ Ind. Tornozelo braquial: _____
- Pulso Pedioso () Pulso poplíteo posterior ()
- Recorrência de úlceras () Osteomielite ()
- História pregressa: TVP () Tromboflebite Superficial ()
- Doenças associadas: () HAS () DM ()
- Outras: _____
- Estado Nutricional: Peso: _____ Altura: _____
IMC: _____
- Escore de dor: () 1 a 3 fraca () 4 a 6 moderada () 7 a 9 forte () 10 insuportável

Exame da ferida:

- Tempo de evolução: _____
Localização: _____
- Fase de cicatrização: () inflamatória () proliferativa () maturação
- Tipo de cicatrização: () 1ª intenção () 2ª intenção () 3ª intenção
- Conteúdo microbiano: () limpa () limpa- contaminada
() contaminada () infectada
- Estadiamento: () estágio I () estágio II
() estágio III () estágio IV
- Perda de tecido: () parcial () total
- Bordas: () regular () irregular
() fina () espessa
- Pele ao redor: () edema () descoloração () hiperpigmentação ()
eczema mibrobiano
() lipodermatosclerose () prurido () exposição óssea
() úlcera sobre cicatriz () dermatite de contato () varizes
- Leito da ferida: Tecido viável (%): granulação: _____ fibrina: _____
epitelização: _____
Tecido inviável (%): esfacelo: _____
escara: _____
- Exsudato:
Odor: _____
Aspecto: _____
Quantidade: _____

- Sinais de infecção: () inapetência () calor () rubor () edema
() exsudato purulento () dor () taquicardia
- Presença de: ()
túneis: _____
- () corpos estranhos: _____

Tratamento

- Gel de Plaquetas () **Auto-enxerto** ()

Evolução

Neovascularização:

- D₀: _____
- D₆₀: _____

Extensão da Ferida

Dias	Mensuração (cm ²)
D ₀	
D ₁₅	
D ₃₀	
D ₄₅	
D ₆₀	
D ₉₀	

Queixas referidas quanto ao uso do curativo: _____

Observações e Orientações:

Dra. Norma Gondim Cleto Nascimento

ANEXO II-

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - HOSPITAL DAS CLÍNICAS -
DIVISÃO HEMOCENTRO - HEMOCENTRO DE BOTUCATU

DISTRITO DE RUBIÃO JÚNIOR S/Nº - BOTUCATU – SP - CEP: 18.618-000 - ☎
(14) 3811-6041/6453 – 3814-8004 – FAX (14) 3811-6234

Home page: <http://www.hemocentro.fmb.unesp.br>

e-mail: hemocentro@fmb.unesp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____ RG:

telefone _____, endereço: _____

concordo em participar do Projeto de Pesquisa intitulado como “ Terapia celular no tratamento de feridas crônicas ”. O projeto será desenvolvido pela dermatologista Dra. Norma Gondim Cleto Nascimento mestranda do Programa de Pesquisa e desenvolvimento: Biotecnologia Médica, sob orientação da Médica Elenice Deffune. Fui informado de que se trata de uma PROPOSTA DE CARÁTER EXPERIMENTAL, com produto chamado gel de plaquetas, feito no laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro, não disponível para compra e a confecção de modelo de produção de pele a partir de pedaços da minha própria pele. Durante a aplicação serão realizadas consultas de rotina a cada 7 dias, momento de troca do curativo. Havendo necessidade, estou ciente que posso recorrer ao ambulatório a qualquer momento. Como estamos analisando riscos que possam ocorrer, uma amostra de sangue e outra de pele deverá ser retirada em dois momentos para estudo. Em caso de alergias ou qualquer decisão minha, sei que posso parar de usar o curativo e serei re-encaminhado para setor de origem (dermatologia ou vascular) sem prejuízo ao meu tratamento.

Concordo em receber o tratamento de feridas proposto e as orientações para o cuidado das mesmas. Estou ciente que as responsáveis por este trabalho estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas, de minha parte, e que manterão em sigilo minha identidade e as informações coletadas com a aplicação do questionário. Fui informado (a), ainda, que posso retirar este meu consentimento a

qualquer momento, sem prejuízo do meu atendimento em qualquer âmbito deste Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Estou ciente, de que após o estudo, havendo melhora da ferida sem fechamento ou mesmo recaída da mesma, o Hemocentro dispõe de um ambulatório com atendimento médico e de enfermagem para dar continuidade a meu tratamento.

Sei que a participação é de livre escolha, havendo riscos que serão analisados tais como alergias, desconforto como aumento temporário da dor, problemas estes que ao informar a equipe deverão ser resolvidos. Fui informado de que não terei gastos de qualquer natureza, como também não receberei pagamento pela participação no estudo. Os resultados destinar-se-ão à elaboração de trabalho científico e possível publicação. Por isso, autorizo a divulgação dos resultados.

Este documento após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa será elaborado em 2 vias, sendo que uma será entregue ao participante da pesquisa e a outra será arquivada pela pesquisadora. Se você quiser alguma informação adicional poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone: 14 – 38116143.

Paciente

Pesquisadora

Botucatu, _____

Orientadora: Profª. Dra. Elenice Deffune.

Hemocentro – FMB – UNESP

Rubião Junior, s/n

Fone: (14) 3811-6070

Pesquisadora: Norma Gondim Cleto

Nascimento



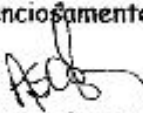
R: 7 de setembro, 1624

(14) 3264-9593

e-mail: normagc@uol.com.br

ANEXO III

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO CEP DA FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.518-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: tsardeni@fmb.unesp.br	Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
Botucatu, 07 de dezembro de 2.009	OF. 457/2009-CEP
<p>Ilustríssima Senhora Prof.^a, Dr.^a. Elenice Deffune Divisão de Hemocentro Faculdade de Medicina de Botucatu</p>	
<p>Prezada Dr.^a Elenice,</p>	
<p>De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3393-2009) "Terapia celular no tratamento de feridas crônicas" a ser conduzido por Norma Gondim Cléto Nascimento, orientada pela Prof.^a. Dr.^a. Elenice Deffune, co-orientado pelo Prof. Dr. Hamilton Ometto Stolf, com a participação dos Profs. Drs. Maria Rita Parise Fortes e Daisy Maria Fávero Salvadori, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07 de dezembro de 2.009.</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".</p>	
<p>Atenciosamente,</p> 	
<p>Alberto Santos Capelluppi Secretário do CEP</p>	

ANEXO IV

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO NO CEP DO INSTITUTO LAURO DE SOUZA
LIMA – BAURU

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA
Caixa Postal 3021 – CEP: 17034-971 – Bauru – SP – Brasil
Fone: 55 14 3103-5852 – 3103-5856
Fax: 55 14 3103-5914 – 3103-5856

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA

CT.: C.E.P. nº 004/2010

Bauru, 15 de março de 2010

Ilma. Sra.
Dr.^a Norma Gondim Cléto Nascimento
A/C Dr.^a Elenice Deffune

Prezada Senhora

O projeto de pesquisa intitulado "Terapia celular no tratamento de feridas crônicas", protocolo 196/10, foi apreciado neste Comitê de Ética em Pesquisa e foi **APROVADO**.

Aproveitamos a oportunidade para reiterar nossos protestos do mais elevado apreço.

Atenciosamente



Dra. Ida Maria Foschiani Dias Baptista
Vice - Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Lauro de Souza Lima

ANEXO V

PROTOCOLO DE BIOCURATIVOS

Quadro 1 – Tipo de ferida, características da lesão e frequência da troca do curativo:

Tipo de Ferida	Características	Frequência de Troca
seca	Lesão definida, sem hiperemia peri-lesional, nenhuma secreção	Diária respeitando sempre o mesmo horário aproximado com máximo de variação de 1 hora para mais ou menos
Exsudato abundante	Lesão macerada, pele peri-lesional macerada, esbranquiçada, com hiperemia em halo. Grande quantidade de secreção “melando” o curativo secundário.	Duas vezes ao dia respeitando intervalos de 12 horas. De manhã após banho e à noite antes de dormir.
Exsudato em pequena quantidade	Contorno sem maceração, moderada a pequena quantidade de secreção sem atingir externamente a faixa.	1 curativo a cada 24 horas respeitando a frequência de trocas sem muita disparidade de horário. Preferencialmente fazer o curativo pela manhã.

Quadro 1 – Tomada de decisão sobre a frequência de troca de curativos**Observações de relevância:**

O material do biocurativo (Biofibrin) deverá ser armazenado na porta da geladeira. Retire-o 15 minutos antes do uso, para que ocorra termo-estabilização e evite-se que o frio do produto promova vasoconstrição, o que entre outros problemas, cause dor.

No momento do Curativo

- 1) insistir com paciente diariamente para **NÃO** usar nenhum sabão, detergente, água corrente no curativo. Os itens mencionados são determinantes de aumento da lesão por citotoxicidade;
- 2) o curativo deve ser feito respeitando o quadro orientativo de trocas acima descrito;
- 3) o paciente deve recobrir o membro afetado com plástico diariamente ao fazer o banho. Caso a lesão seja muito exsudativa sugere-se banho sentado em cadeiras plásticas para evitar que ocorra contacto de água de banho corporal com o curativo, fato este determinante do índice de contaminação das feridas. Ao fazer a remoção das bandagens, **JAMAIS** retire as gazes secas e aderidas, umedeça-as com **soro fisiológico qualidade injetável** para remover com auxílio de pinça estéril, de forma suave evitando assim agredir o novo e delicado tecido que está se formando;
- 4) o ato de umedecer com **solução salina fisiológica estéril** deve ser feito com jato de soro fisiológico: higienize a parte superior do soro fisiológico com uma agulha de grosso calibre e use este jato a uma distância média de 15-20cm para remover restos do curativo anterior e eventual tecido desvitalizado que foi removido pela ação do curativo;
- 5) pegue parte da cola de fibrina que está no tubo encaminhado junto com o paciente, distribua o material em pequena quantidade na gaze com auxílio de uma espátula espalhe-a na gaze deixando sempre um “quadrado” de gaze nas bordas, sem o material. Isto se deve pelo fato de que a aplicação de material com potencial desbridante em pele íntegra promove a maceração da mesma. Recubra toda a ferida respeitando as bordas que não deverão receber a cola de fibrina;
- 6) depois de estar toda a lesão recoberta, umedeça com o mesmo jato de soro fisiológico as gazes e recubra com mais gaze ou compressas estéreis;
- 7) em caso de ferida de membros inferiores do paciente em discreta elevação por 5 minutos e inicie o enfaixamento com faixa de compressão elástica começando pela sola dos pés, com suave pressão e suba com o enfaixamento até o joelho, sem apertar;

- 8) não pressione demais. O curativo deve ser confortável quando o paciente fica de pé, e não exercer pressão sobre os vasos sanguíneos;
- 9) nos primeiros dias pode se ter a impressão de aumentar a secreção. Isto é esperado, pois a cola de fibrina removerá tecido desvitalizado aumentando por 3-5 dias a secreção. Este fato não é obrigatório. Alguns pacientes não aumentam o exsudato. Caso ocorra, considere o fato normal. Após 5 dias, a lesão deve começar a ter um aspecto mais limpo. Em 10 dias, deveremos fazer novo curativo e reavaliá-lo para mudança do produto.
- 10) O material deverá ficar OBRIGATORIAMENTE em geladeira a +4°C;

Contacto para tirar dúvidas:

14- 3811-6041 R. 234 ou 235 falar com o Responsável : Alessandro Fagner ou Dra. Elenice

Elenice Deffune

Profa. Dra. Disciplina de Hemoterapia

Responsável pelo Laboratório de Engenharia Celular/Biocurativo

Hemocentro de Botucatu