

CARLA APARECIDA FACCIO BOSNARDO

Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada.

CAMPINAS

2010

CARLA APARECIDA FACCIO BOSNARDO

Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada.

**Tese de Doutorado apresentada á Pós Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Doutor em Cirurgia, área de Cirurgia**

Aluno : Carla Aparecida Faccio Bosnardo

Orientador: Prof^ª Doutora Ana Terezinha Guillaumon

Co- Orientador : Prof^ª Doutora Maria Beatriz Puzzi

CAMPINAS

2010

Ficha Catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B652a Bosnardo, Carla Aparecida Faccio
Análise clínica prospectiva randomizada aberta, do tratamento das úlceras venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada / Carla Aparecida Faccio. Bosnardo Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Ana Terezinha Guillaumon, Maria Beatriz Puzzi
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Úlceras. 2. Queratinocitos. 3. Cicatrização. I. Guillaumon, Ana Terezinha. II. Puzzi, Maria Beatriz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Prospective randomization open clinical analysis to treatment of venous stasis ulcer, through cell therapy with keratinocyte autograft, compared in two, groups users or not of micronized diosmin and hesperidin

Keywords: • Ulcers • Keratinocytes • Cicatrization

Titulação: Doutor em Cirurgia

Área de concentração: Cirurgia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Terezinha Guillaumon

Profa. Dra. Ilka De Fátima Santana Ferreira Boin

Prof. Dr. Marco Antonio De Oliveira Peres

Profa. Dra. Maria Elizabeth Rennó Castro Santos

Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida

Data da defesa: 06-04-2010

Banca Examinadora

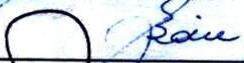
Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Carla Aparecida Faccio Bosnardo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Terezinha Guillaumon

Membros:

1. Profa. Dra. Ana Terezinha Guillaumon - 

2. Profa. Dra. Ilka De Fatima Santana Ferreira Boin - 

3. Prof. Dr. Marco Antonio De Oliveira Peres - 

4. Profa. Dra. Maria Elizabeth Rennó C. Santos - 

5. Prof. Dr. Winston Bonetti Yoshida - 

Curso de pós-graduação em Cirurgia, da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/04/2010

DEDICATÓRIA

*À minha Mãe,
fonte de minha vida e da minha inspiração, luz da minha
existência e razão da minha vida.*

*A meu Pai
"in memoriam"*

Agradecimentos

A **minha Mãe** – pelo amor incondicional, pela força, incentivo, paciência, defesa e carinho em todos os momentos da minha vida.

A Deus e a Nossa Senhora

A **Prof. Dr.^a Ana Terezinha Guillaumon** – pela compreensão, pelas oportunidades, incentivo, por acreditar em mim em todas as situações e tornar possível um sonho.

A **Prof. Dr.^a Maria Beatriz Puzzi**- pelo carinho, incentivo, paciência, apoio e gentileza em todos os momentos.

A **Jussara Rheder**- pelo companheirismo, amizade e ajuda durante todo o estudo.

A **Cláudia Brognoni** – Por todo o empenho, gentileza e profissionalismo

Ao **Laboratório Servier do Brasil** – Pela doação dos medicamentos utilizados no estudo

Aos **Médicos Residentes** – pela ajuda na triagem de pacientes, pelos ensinamentos, que cada um me deu ao longo dos anos.

As **Secretárias Alice e Claudete** - pelo apoio, cooperação e gentileza.

Aos **Companheiros de Trabalho** – pelo aprendizado diário da convivência e do que é ter paciência.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta ajudaram a concluir este trabalho, principalmente a colaboração dos doentes sem os quais seria impossível chegar até aqui.

SUMÁRIO

PÁG

1. Lista de Abreviaturas.....	x
2. Lista de Tabelas.....	xi
3. Lista de Gráficos e Quadro.....	xii
4. Lista de Figuras.....	xiii
5. Resumo.....	15
6. Introdução.....	17
7. Objetivo.....	22
8. Revisão Bibliográfica.....	24
9. Casuística e Método.....	61
9.1 Casuística.....	61
9.1.1 Grupos.....	63
9.2 Método.....	64
9.2.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	64
9.2.2 Anamnese.....	64
9.2.3 Exame Físico.....	66
9.2.4 Amostras.....	67
9.2.5 Cultura de células.....	69
9.2.6 Cultura de Queratinócitos.....	69
9.2.7 Passagem Celular.....	70
9.2.8 Cola de fibrina.....	70
9.2.9 Análise Estatística.....	75
10. Resultados.....	77
11. Discussão.....	90
12. Conclusão.....	101
13. Abstract.....	103
14. Referências Bibliográficas.....	105

1.Lista de Abreviaturas

1. DED – Derme humana desepidernizada
2. NGF- Fator de crescimento neural
3. TGF- Transforming growth factor
4. IGF1- Hormonio do crescimento
5. INF - Interferon
6. HAT- Hipoxantina aminopteria e timidina
7. VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular
8. EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
9. DSPG – Dermatan sulfato proteoglicano
10. IMC- Índice de Massa Corpórea
11. ELISA- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
12. CEAP - (C), clínica, (E) etiologia, (A) anatomia e (P) patologia

2.Lista de Tabelas, Gráficos e Quadro

Tabelas	PAG
Tabela 1 : Distribuição dos doentes quanto ao sexo e idade - Grupo I	62
Tabela 2 : Distribuição dos doentes quanto ao sexo e idade - Grupo II	62
Tabela 3 : Distribuição dos doentes quanto aos antecedentes pessoais- Grupo I	65
Tabela 4 : Distribuição dos doentes quanto aos antecedentes pessoais – Grupo II	66
Tabela 5 : Valores absolutos e percentuais iniciais e finais do estudo	77
Tabela 6 : Estatísticas descritivas das variáveis contínuas por grupo	78
Tabela 7 : Avaliação geral –Características gerais dos 25 pacientes	78
Tabela 8 : Estatísticas descritivas da variável úlcera	79
Tabela 9 : Estatísticas descritivas da variável percentagem de fechamento, por dias	80
Tabela 10 : Resultado da Anova para medidas repetidas (nos ranks) da variável percentagem de fechamento	80
Tabela 11 : Resultado da Anova para medidas repetidas (nos ranks) da variável percentagem de fechamento	82
Tabela 12 : Teste de Tukey – Apresenta o comportamento dos gupos nos dias do estudo	83
Tabela 13 : Teste de Contraste – comparação do fechamento entre os grupos	84

<u>3.Lista de Gráficos e Quadro</u>	PAG
Gráfico 1 : Média e desvio padrão da variável porcentagem de fechamento por grupo e dias de acompanhamento	81
Gráfico 2 : Evolução do fechamento das úlceras no período	83
Gráfico 3 : Médias da variação da dor entre o início e o final do estudo	85
Quadro	
Quadro 1 : Inventário de dor de Wisconsim	74

4.Lista de Figuras

Figuras	PAG
Figura 1 : Área Doadora	67
Figura 2 : Coleta da Amostra	67
Figura 3 : Queratinócitos	72
Figura 4 : Implante	73
Figura 5 : Arcabouço	73
Figura 6 : Exemplos de cicatrização em pacientes do grupo sem o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	86
Figura 7 : Exemplos de cicatrização em pacientes do grupo sem o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	86
Figura 8 : Exemplos de cicatrização em paciente do grupo com o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	87
Figura 9 : Exemplos de cicatrização em paciente do grupo com o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	87
Figura 10 : Exemplos de cicatrização em paciente do grupo com o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	88
Figura 11 : Exemplos de cicatrização em paciente do grupo com o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada	88

5.Resumo

5. Resumo

Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada

Introdução: A úlcera venosa é uma complicação da insuficiência venosa crônica, atinge indivíduos adultos, afastando-os do trabalho e do convívio social normal. **Objetivo:** Demonstrar uma nova terapêutica para o tratamento das úlceras venosas através do enxerto de queratinócitos autólogos. **Casuística e Método:** Foram selecionados, de forma aleatória no ambulatório de Moléstias Vasculares Periféricas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – Vinte e Cinco (25) doentes com úlcera de venosa, CEAP 6 , que não obtiveram cicatrização, das mesmas, com tratamentos convencionais; divididos em dois grupos, Grupo I- 11 doentes, 10 mulheres e 1 homem; Grupo II- 14 doentes, 11 mulheres e 3 homens. Ambos os grupos foram submetidos à aplicação do autoenxerto de queratinócitos sobre o leito limpo da úlcera; e ao grupo II, foi também ministrada dose de diosmina hesperidina micronizada a cada 12 horas. A todos os doentes, foi solicitado um repouso de 30 minutos em Trendelemburg para duas horas de atividade habitual. Os queratinócitos foram cultivados no Laboratório de Cultura de Células da Pele, CIPED-FCM – UNICAMP. **Resultados:** Após a aplicação de testes estatísticos não paramétricos, devido ao tipo da amostra, foi observada cicatrização e/ou melhora das úlceras com redução do leito nos dois grupos, sendo que o Grupo II obteve resultados mais precoces. **Conclusão** . Esse método mostra ser uma boa opção terapêutica no auxílio à cicatrização das úlceras venosas.

6.Abstract

6. Abstract

Prospective randomization open clinical analysis to treatment of venous stasis ulcer, through cell therapy with keratinocyte autograft, compared in two, groups users or not of micronized diosmin and hesperidin.

Introduction: The venous stasis ulcer is the most severe complication of chronic venous insufficiency, affecting adults and keeping them away from work and from normal social life. **Objective:** To demonstrate a new therapeutic method for accelerating healing.

Methods: Twenty-five (25) patients with venous stasis ulcers, CEAP VI, who have not healed with conventional treatments were selected from the Clinic of Peripheral Vascular Diseases, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP – were treated with autograft keratinocytes, grown in the skin cell culture laboratory, CIPED-FCM – UNICAMP. They were divided into two groups, Group I-11 patients, 10 female and 1 male, Group II-14 patients, 11 female and 3 male. Both groups were treated with autograft keratinocytes on the clean ulcer bed, and group II, was also given a dose of micronized diosmin hesperidin every 12 hours. All the patients were asked to take a 30-minute rest in the Trendelenburg position for two hours of usual activity. **Results:** After the evaluation of data with statistics methods no parametric Healing and/or improvement of the ulcers with significant reduction of the bed in both groups were observed, with Group II obtaining precocious results. **Conclusion** This method proves to be a good therapeutic option to help in the healing of stasis ulcers

6. Introdução

6.Introdução:

A doença venosa está presente em cerca de um terço da população mundial, sendo que, a partir de segunda década de vida já pode ser observada. É mais prevalente no sexo feminino na proporção quatro mulheres para um homem, e a principal alteração anatômica inicial é a dilatação das paredes venosas com a formação das varizes.^{1,2,3}

Pode-se afirmar que em cerca de 90% dos casos, a origem dessa doença é genética, sendo atribuída a alterações da parede do vaso, que quando exposto ao aumento da pressão intra luminal não resiste e dilata, dessa maneira originam-se as varizes primárias. Os 10% restantes são atribuídos a algum tipo de alteração funcional ou anomalia que acarretam na formação das varizes, aqui denominadas secundárias. Para exemplificar podemos citar a trombose venosa profunda, as fístulas arteriovenosas genéticas ou adquiridas e as mal formações venosas, que levam a alterações do sistema venoso e podem acarretar tardiamente na formação das varizes.^{1,2,3}

Sabe-se que a doença venosa é uma das principais causas de afastamento das atividades laborais, principalmente quando suas complicações se fazem presentes. Tal fato, leva a problemas sociais, econômicos e culturais. Estima-se que 1% da população economicamente ativa em todo o mundo, seja portadora de algum tipo de complicação das varizes como as varicorragias, flebites e principalmente as úlceras, segundo um estudo realizado pelo *Managed Care and Chronic Wounds*.⁴

A palavra úlcera é originada do latim *ulcus erisé*, que pode ser definida como uma solução de continuidade, aguda ou crônica, de uma superfície dérmica ou mucosa, acompanhada de processo inflamatório.^{5,6}

A úlcera, dentre as complicações da doença venosa é a mais significativa, que causa maior desconforto ao doente e, muitas vezes, leva-o à marginalidade social.

As úlceras de perna podem ter inúmeras etiologias, como diabetes melitus, doenças reumáticas, hematológicas e dermatológicas, além das causas vasculares: arteriais e venosas.

A etiologia vascular venosa é a mais freqüente das úlceras de perna, respondendo por quase 70% do total. É considerada a complicação mais grave da insuficiência venosa crônica. Dados relatam, que cerca de 1,5% da população adulta no mundo desenvolverá o quadro; suas causas são a hipertensão venosa, secundária a varizes e ou a síndrome pós flebitica.

A recidiva, talvez seja um complicador para o tratamento das úlceras. *MAYER et al* relatam que 30% das úlceras cicatrizadas recorrem no primeiro ano e esta taxa sobe para 78% após dois anos, quando a etiologia não for tratada adequadamente.⁵

O tratamento da úlcera venosa, vem sendo aplicado em doentes desde a antiguidade. Inúmeros curativos são conhecidos e tem o seu valor, mas todos eles se deparam com a fisiopatologia da doença, ou seja, para existir o fechamento da úlcera é necessário que se consiga acabar com a hipertensão venosa. A dificuldade está nesse ponto, pois para isso, o doente tem que permanecer em repouso durante grande parte do seu dia, o que impede que exerça um trabalho regular durante muito tempo. A idéia de se obter um fechamento rápido das úlceras venosas, a fim de possibilitar uma cirurgia corretiva breve, quando possível, ou um tratamento clínico preventivo, viria solucionar problemas sofridos por esses doentes.

Os curativos conhecidos para a cicatrização das úlceras venosas são inúmeros, indo desde curativos tradicionais com gazes, pomadas e ataduras, a compressão inelástica

conseguida com a bota de Unna (1896) e com as polainas, aos curativos mais modernos a base de hidrogel e o alginato que são caros e nem sempre acessíveis às condições econômicas do portador.^{6,28}

As medidas citadas acima, muitas vezes, são caras ou lentas, o que pode levar ao abandono do tratamento por parte do doente.

Além dos curativos, outra opção para o fechamento das úlceras é o enxerto simples de pele total, que apesar de conseguir um resultado rápido tem pouca eficácia e também exige extremo repouso do doente.

A terapia celular vem mostrando importantes resultados em relação à cicatrização de lesões de pele. Sabe-se atualmente, que avanços importantes estão sendo alcançados com a cultura de queratinócitos. Já é possível observar seu uso no tratamento de grandes queimados com excelentes resultados, seja através da colocação das células diretamente sobre as lesões, ou como parte constituinte de curativos biologicamente produzidos. Devido a isso, essa nova opção mostra ser bastante promissora para o tratamento futuro das lesões de pele.^{7,8}

Todos os tratamentos para essa enfermidade visam reduzir a hipertensão venosa crônica, já que é a causadora da úlcera. A medida que, essa enfermidade se instala, o retorno venoso é dificultado, a pressão hidrostática aumenta na microcirculação, levando a transudação para o espaço intersticial de líquidos e proteínas, causando o edema. Alguns fármacos, dentre eles a diosmina e a hesperidina atuam na microcirculação diminuindo a estase venosa, reduzindo o edema.⁹

Quando falamos a respeito das úlceras de estase venosas, não é apenas a lesão de pele o problema do doente. Talvez seja a parte mais sofrida devido aos transtornos

inerentes, mas a causa real, a doença vascular, que leva a hipertensão venosa não pode ser esquecida; de outra forma, a reicidiva das úlceras se torna mais freqüente ainda.

BOSS *et al*; TERSKIKH *et al* e BOLÍVAR-FLORES *et al.*, visando solucionar o problema da necessidade de grande quantidade de pele para enxertia em casos de queimaduras e úlceras crônicas de pele, com áreas doadoras escassas, tentaram inicialmente a utilização de células cultivadas *in vitro*, autólogas ou não, de forma isolada, sobre essas áreas.^{10,11,12}

Estudos realizados por AUGER *et al.*, MOLL *et al.* e COULOMB *et al.*, têm demonstrado que a cultura simultânea de queratinócitos e fibroblastos é uma abordagem mais adequada por reproduzir as características da pele humana *in vivo* do que monoculturas dessas células.^{13,14,15}

Pensando-se além do fechamento da úlcera, no tratamento da doença causadora, a associação de um método de cicatrização mais rápido junto de uma terapia para se minimizar as reicidivas, objetivou esse estudo, onde a associação da terapia celular através do auto enxerto de queratinócitos, para breve cicatrização e o uso de fármacos como a Diosmina 450 mg e a Hesperidina 50mg Micronizada para tratar a doença de base são utilizados.

7. Objetivo

7. Objetivo

Torna-se relevante a busca de novas terapias para úlceras venosas, visto que são atendidos no Ambulatório de Moléstias Vasculares Periféricas do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP cerca de cento e vinte pacientes semanalmente, sendo que, aproximadamente vinte por cento, são casos de doença venosa.

Com base nestas observações o objetivo desse estudo é , demonstrar uma nova terapêutica para o tratamento das úlceras venosas através do enxerto de queratinócitos autólogos, comparado em dois grupos com e sem o uso da Diosmina Hesperidina micronizada, avaliando sua eficácia e segurança no tratamento dessa doença.

8. Revisão Bibliográfica

8. Revisão Bibliográfica

8.1 Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano recobrimo-o em toda a sua extensão; apresenta dimensões que no adulto, variam entre 1,5 a 2,0 m² e peso que oscila entre 8,0 e 10,0 quilos, representando cerca de 15% do peso corpóreo; tem cerca de $1,0 \times 10^{11}$ células de origem epitelial, mesenquimatosa e neural. É indispensável a vida e isola os componentes orgânicos do meio exterior. É composta por uma infinidade de estruturas, que dispostas de maneira harmônica, desempenham suas exatas funções; É dividida essencialmente em três camadas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme, firmemente unidas entre si.¹⁶

A epiderme está constituída por epitélio estratificado cuja espessura geral varia entre 75 a 150 milimicras, com exceção das palmas das mãos e planta dos pés onde varia de 0.4 milímetros até 1 milímetro; está subdividida em camadas que são denominadas: germinativa, camada malpighiana ou espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.

A camada germinativa ou basal é a mais profunda; é essencialmente germinativa, sendo responsável por originar as demais camadas da epiderme, através da diferenciação celular. Apresenta dois tipos celulares os melanócitos e os queratinócitos. Os melanócitos se localizam de forma espaçada entre os queratinócitos da camada basal da epiderme. Em geral, para cada 10 queratinócitos há um melanócito.

Durante a diferenciação epidérmica, os queratinócitos sofrem modificações morfológicas e biológicas. A partir da camada basal, eles movem-se através das camadas espinhosa e granulosa e fixam-se na camada mais superficial (córnea), constituindo então

estruturas multilamelares de corneócitos anucleados, circundados por lipídeos extracelulares^{16,17,18,19}.

Os queratinócitos tem como função principal, a produção de queratina (proteína elástica e flexível que consiste no principal componente da camada córnea). A queratina forma, também, uma barreira contra os agentes externos físicos e/ou químicos; os melanócitos são células responsáveis pela produção de melanina (responsável pela coloração da pele), cuja função pigmentogênica apresenta obstáculo na ação das radiações solares, sendo uma proteção solar natural. O processo pelo qual forma-se a melanina é conhecido por melanogênese.

A camada malpighiana ou espinhosa é também conhecida como corpo mucoso de Malpighi é formada por células que se achatam progressivamente em direção à superfície. As células são ligadas umas as outras por pontes intercelulares denominadas desmossomas.

A camada granulosa é formada pelas células granulosas que recebem este nome devido ao grande número de grânulos em seu interior. Estes grânulos são formados por queratina, que são continuamente produzida pelos queratinócitos.

A camada lúcida apresenta uma estrutura compacta e resistente, apresentando grande quantidade de eleidina (substância oleosa responsável pelo tom translúcido da pele). É praticamente inexistente nas regiões palmo-plantares.

A camada córnea é formada por células anucleadas e cheias de queratina em constante descamação. É a camada mais superficial da pele. A derme é formada principalmente por feixes de fibras colágenas, elásticas e reticulares, em cuja trama inserem-se os capilares sanguíneos e linfáticos, músculos, estruturas nervosas, células de

tipos variados como fibroblastos, mastócitos, histiócitos e células de Langerhans; formações anexas como folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas e sudoríparas.

As fibras colágenas compreendem 95% do tecido conectivo da derme que está dividido em dois tipos: colágeno I (fibras mais espessas), e colágeno tipo II (fibras mais finas). As fibras elásticas são microfibras orientadas em diversas posições na derme, sendo responsáveis pela elasticidade da pele.

As fibras reticulares são as mais delicadas e se ramificam formando conexões firmes e apertadas.

Os capilares sanguíneos e linfáticos, tem como função a nutrição e regulação da temperatura da pele. Na pele, cada sistema (linfático e sanguíneo) forma dois plexos, um mais profundo (localizado no nível dermo-hipodérmico) e o plexo superficial (localizado na derme subpapilar). A termorregulação é o resultado de uma contínua alternância entre vasoconstrição e vasodilatação dos capilares, em função da situação ambiental, contribuindo para o controle da temperatura orgânica.

A musculatura da pele é lisa e compreende os músculos eretores dos pêlos, os dardos do escroto e a musculatura da aréola mamária. Os músculos da pele são importantes para gerar calor.

As estruturas nervosas, compreendem os nervos sensitivos responsáveis pela sensibilidade da pele, assim como receber informações necessárias para se adequar ao meio (tato, dor, calor, frio, pressão).

O aparelho pilo sebáceo é constituído de uma região infundibular, superior que se estende para baixo até a junção do ducto sebáceo com o folículo. O istmo é a região

intermediária entre o ducto sebáceo e a protuberância do músculo eretor do pelo. A região inferior que é localizada abaixo da protuberância do músculo eretor do pelo.. Existem dois tipos de pêlos: VELUS (pêlos tipo lanugem), e TERMINAL (mais espesso e pigmentado como cabelo, barba, pilosidade pubiana e axilar). Os pêlos compõe-se de uma parte livre, a haste, e uma parte intradérmica, a raiz. As glândulas sebáceas estão presentes em toda a pele, com exceção das regiões palmares e plantares. Desembocam sempre no folículo pilossebáceo com ou sem pêlo. A gordura liberada por elas, evita a perda de água, tem propriedades antimicrobianas e substâncias precursoras de vitamina D.

As glândulas sudoríparas liberam o suor que é incolor, inodoro, composto de 99% de água e solutos encontrados no plasma. O odor fétido do suor (bromidrose) é causado por bactérias próprias das regiões sudoríparas. É através do suor que a pele mantém a temperatura do corpo e também elimina substâncias como uréia, ácido láctico, etc. As glândulas sudoríparas podem ser:

A. ÉCRINAS, que estão dispersas por todo o corpo, existindo em maior quantidade nas regiões palmo-plantares e axilas. Suas glândulas desembocam diretamente na superfície da epiderme, cujo orifício por onde é eliminado o suor chama-se poro ou crossiríngio e se apresenta rodeado de queratina.

B. APÓCRINAS, que desembocam nos folículos pilossebáceos e não diretamente na superfície. Localizam-se na axila, área perimamilar e região anogenital, e, modificadamente, no conduto auditivo externo (cera), nas pálpebras (glândulas de Moll) e nas mamas (glândulas mamárias).

As unhas são estruturas queratinizadas que protegem as extremidades das pontas dos dedos, áreas com muita sensibilidade. As unhas têm quatro partes: raiz, lâmina (aderente ao leito ungueal), dobras laterais e borda livre. A espessura das unhas varia de 0,5 a 0,75 mm e o crescimento é de cerca de 0,1 mm por dia nas das mãos, sendo mais lento nas dos pés. Têm como funções: proteção, preensão, agressão e sensibilidade.

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, possui espessura variável, composta basicamente por células gordurosas que formam blocos entremeados por feixes conjuntivos que assumem disposições especiais. A hipoderme, além de tecido reserva de energia, participa no isolamento térmico, protege o organismo contra agressões mecânicas e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes.

8.2 Úlceras

Quando lesada, a pele se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos/melanócitos) remanescentes²⁰.

Em lesões extensas e profundas da pele e mucosas pode ocorrer destruição da derme e dos elementos epidérmicos, resultando numa lesão ulcerada.

Segundo, CESARETTI *at als* uma úlcera pode ser definida como interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico ou mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque.^{21,22}

Desde as mais remotas eras que se tem conhecimento, o tratamento das úlceras de perna se mostra um desafio, seja no que diz respeito a rapidez na cicatrização, o alívio das dores, além da melhora na qualidade de vida de seus portadores.

O homem de Neanderthal da região do Iraque já tratava de queimaduras com extratos de plantas, cerca de 60.000 anos A.C.²³.

O tratamento das feridas vem evoluindo desde 3000 anos A.C., onde as feridas hemorrágicas eram tratadas com cauterização. Os egípcios fizeram uso de encantamentos e de uma mistura de látex, leite de cabra e leite humano. Nos papiros Smith, que datam de 1.500 anos a.C., há relatos de misturas de vários tipos de cascas de limão molhadas em preparações oleosas. Os chineses, entre o sexto e quinto séculos a.C., usaram tinturas e extratos feitos de folhas de chá. O uso de torniquete é descrito em 400 A.C.; a sutura é documentada desde o terceiro século A.C.

ANDRADE *et als*, em uma revisão de literatura, descrevem que na pré- história existia uma preocupação com as úlceras sendo usados materiais como: plantas, água, neve, gelo, cortiça, cinzas, frutas e até lama sobre o leito das feridas a fim de curá-las. Na Mesopotâmia eram limpas as feridas com leite e ou água e cobertas com resina, mel, lã de carneiro folhas e cascas de árvores; no Egito antigo foi observado que a úlcera fechada com “ curativos “ cicatrizava antes que a mantida aberta.

Estudos mostram inúmeras técnicas para o fechamento das úlceras; desde a Grécia antiga são encontrados relatos referentes a maneiras de se realizar curativos; Hipócrates preconizava a colocação de pomadas para promover um debridamento; no velho testamento existem relatos de bandagens em ferimentos químicos e Celsus, já no século primeiro defendia o fechamento primário através de suturas.

Plínio acreditava que era melhor deixar as queimaduras expostas ao ar do que cobri-las com pomadas, e Galeno sugeriu o uso de vinagre ou vinho. No século IX, Rhases, um famoso médico árabe, recomendou o uso de água fria para o alívio da dor (ARTZ, 1980).²⁴

O cirurgião francês Ambroise Paré, dito pai da moderna cirurgia, inovou o cuidado com as feridas que até então eram cauterizadas com óleo quente; ocasionalmente, numa falta de óleo, substituiu-o por uma mistura de gema de ovo, óleo de rosas e terebintina, e surpreso, descobriu que a nova mistura provocava uma cicatrização mais rápida que o óleo fervente. Em 1585 orientou o tratamento das feridas quanto à necessidade de desbridamento, aproximação das bordas e curativos,^{25,26} conforme relatado em um dos primeiros livros dirigidos às queimaduras, publicado por William Clowes, de Londres, em 1596, e, depois, por Vander Elst, em 1964. (VANDER ELST, 1964). O uso de curativos feitos de algodão e lã foi descrito por Syme, em 1827. Lister, em 1884, introduziu o tratamento anti-séptico.^{25,26}

Nos séculos XVIII e XIX a descoberta de compostos de cloro e iodo possibilitaram a higienização do instrumental e da pele. Entre 1840 e a Segunda Guerra Mundial, o foco para o tratamento de feridas e cicatrização foi a utilização de anti-sépticos e agentes tópicos com ação antimicrobiana e a proteção com coberturas secas, como conseqüência às descobertas de Pasteur sobre a "Teoria dos Germes". Nessa fase, dá-se o período áureo de utilização de anti-sépticos como o líquido de Dakin, Eusol, derivados de iodo, mercúrio e alumínio.

Em 1896 um dermatologista alemão, Paul Gerson Unna, desenvolveu um tipo de curativo usado até hoje, que apresenta em sua composição apenas oxido de zinco e gelatina, a Bota de Unna; em 1916, John Homans publicou o primeiro trabalho para tratamento de úlceras em membros inferiores.^{27,28} É importante salientar que o Hospital das Clínicas da Unicamp foi durante décadas, centro de referência regional no tratamento das úlceras de estase através de um programa de tratamento domiciliar com botas de Unna.²⁸

Muitos medicamentos tópicos foram usados em feridas no início do século XX. Edward Clark Davidson, iniciou o uso de spray de ácido tânico em 1925; ele acreditava que esta técnica diminuía a perda de líquidos, aliviava a dor e produzia uma cicatriz mais limpa. Em 1944, após ser constatado que o ácido tânico era tóxico para o fígado, seu uso foi abandonado (ARTZ, 1980). Aldridge, em 1933, sugeriu o uso de violeta de genciana como agente esclerosante, sendo posteriormente adicionado nitrato de prata a cinco por cento como um esclerosante adicional. Em Chicago, em 1942, Harvey Allen popularizou o uso de gaze petrolada nos curativos, combinada à imobilização (ALLEN e KOCH, 1942). Na Grã-Bretanha, em 1949, Wallace, de Edinburgo, reintroduziu o método aberto para o tratamento de queimaduras (WALLACE, 1949). Douglas Lindsey, após a Guerra da Coréia, baseado em estudos de Liedberg, Ress e Artz, que relatavam infecções locais e septicemia por estafilococos em queimaduras, julgou que um dos melhores agentes antibacterianos locais nas feridas fosse o Sulfamylon. Charles Fox, de New York, em 1967, combinou a sulfa e a prata em um composto conhecido como sulfadiazina de prata, que é largamente utilizado até os dias atuais (ARTZ, 1980; SILVA, 1992).²⁴

No século XX, o aparecimento da sulfa e da penicilina para o tratamento das infecções. Hoje através da biologia celular a replicação de células e a síntese de substâncias facilitam os processos cicatriciais.

Na Guerra da Criméia, foram criados vários tipos de curativos, à base de fibras de linho, que, sendo reutilizadas várias vezes, se tornavam gradativamente mais macias, mas eram pouco absorventes. A enfermagem, que acompanhava os avanços da medicina, foi responsável, através de Florence Nightigale, pela introdução de procedimentos que hoje cercam todo o ato cirúrgico, como o uso de ambiente limpos, água pura, drenagem eficiente e luz adequada. Florence Nightigale foi uma enfermeira britânica que ficou famosa por ser

pioneira no conceito da assepsia para o tratamento de feridos de guerra, na cirurgia moderna (século XX) e com as feridas de modo geral. Os curativos tornaram-se estéreis, assim como as mãos dos cirurgiões são lavadas e seus procedimentos seguem técnicas assépticas.

Finalmente, os cuidados para com as feridas adotadas na cultura ocidental contemporânea seguem o progresso do conhecimento científico; o maior avanço do século XX foi o advento dos antibióticos, utilizados, por aplicação local através de pulverização ou por incorporação do material no próprio curativo.^{29,30}

A simplicidade no tratamento de feridas veio com o desenvolvimento de materiais como os filmes transparentes porosos para cobertura de feridas ou mesmo métodos como a exposição completa da ferida sob condições estéreis. Em 1982 as coberturas à base de hidrocolóides são lançadas nos Estados Unidos e Europa, passando a ser largamente utilizadas em feridas de espessura parcial. Tais coberturas só foram disponibilizadas no mercado brasileiro a partir da década de 1990, e seu custo elevado foi uma barreira inicial para sua difusão. Também no início dos anos 90 são lançados os hidropolímeros, que, além de manter o meio úmido, agregavam a propriedade de promover a evaporação do exsudato, favorecendo a granulação e diminuindo a maceração de tecidos neoformados.

Hoje em dia, existe grande variedade de materiais e sintéticos disponíveis no mercado facilitando a opção do profissional de saúde pelo material mais adequado para cada tipo de ferida.

8.3 Cicatrização

Os conceitos de cicatrização, em seus diversos aspectos, ressaltam a importância da atuação multidisciplinar na abordagem das feridas, bem como a percepção do paciente como um todo. São abordados os aspectos econômicos que representam as feridas agudas e crônicas. Apresenta ainda os recursos que podem auxiliar o processo de cicatrização, bem como os diversos tipos de curativos disponíveis.

A busca pela cicatrização das úlceras de estase vem se tornando um desafio, pela alta prevalência em nosso meio, levando a perda da qualidade de vida dos doentes portadores, bem como a gastos governamentais significativos com afastamentos trabalhistas, além de sobrecarga no sistema assistencial.^{31,32,33,34,35,36}

Classicamente, a cicatrização de feridas pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação

A fase inflamatória é uma fase dominada por dois processos: hemostasia e resposta inflamatória aguda, com objetivo de limitar a lesão tecidual. Em úlceras não complicadas, dura de 1 a 4 dias.

A fase proliferativa é caracterizada pela proliferação de fibroblastos na úlcera, sob a ação de citocinas, dando origem ao processo de fibroplasia (síntese de colágeno). A síntese de colágeno é estimulada pela TGF beta e IGF1, e inibida pelo INF gama e glicocorticóides; simultaneamente, ocorre a angiogênese e a infiltração densa de macrófagos, formando o tecido de granulação. Minutos após a lesão, tem início a ativação dos queratinócitos na borda da ferida, fenômeno que representa a fase de epitelização. Eles secretam laminina e colágeno tipo IV, formando a membrana basal.

A fase de maturação é o último passo no processo de cicatrização. É a formação do tecido cicatricial propriamente dito, que histologicamente consiste em tecido pouco organizado, composto por colágeno e pobremente vascularizado. O processo de remodelamento da ferida implica no equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno, redução da vascularização e da infiltração de células inflamatórias, até que se atinja a maturação da ferida. Este processo é longo, e pode ser avaliado clinicamente através da força tênsil da ferida. A contração da ferida é um dos principais fenômenos da fase de maturação. Durante o processo, as bordas são aproximadas, reduzindo a quantidade de cicatriz desorganizada. A contração caracteriza-se pelo movimento centrípeto da pele nas bordas da ferida, impulsionada pela ação dos miofibroblastos.

Nos casos onde existiu uma perda de tecido importante, a cicatrização pode ser dificultada. Nessas situações é importante levar em conta a possibilidade de se utilizar enxertos e retalhos de pele. Os enxertos podem ser classificados em autólogos, homólogos e heterólogos. Muitas são as técnicas desenvolvidas com o intuito de reduzir a formação de cicatrizes e acelerar o tempo de cicatrização.

As úlceras podem ser divididas em agudas e crônicas, as agudas apresentam um processo de cicatrização rápido e ordenado; as crônicas e aqui podemos encaixar as úlceras venosas, a cicatrização é lenta e permanece na fase inflamatória por tempo indefinido, o que impede a restauração do tecido lesado.

8.4 Enxertos

O enxerto de pele pode ser classificado como, parcial que inclui a epiderme e parte mínima da derme ou total onde toda a epiderme, derme e anexos estão envolvidos.

HISTÓRIA E FISIOLOGIA DOS ENXERTOS DE PELE

O primeiro enxerto de epiderme foi feito por Reverdin, cirurgião suíço, em 1869, que relatou a transferência de dois pequenos pedaços de epiderme em um paciente que havia perdido a pele do polegar.

Em 1872, Ollier relatou sucesso com peças maiores e mais grossas de pele. Thiersch, em 1874, descreveu o uso de peças mais profundas da pele, contendo derme.

Na Escócia, em Glasgow, em 1875, Wolfe relatou a reparação de um defeito na pálpebra inferior com um retalho livre de espessura total, proveniente do braço.

Em 1914, John Staige Davis descreveu um enxerto de pele fina com uma área central de espessura total, que ficou conhecido como enxerto em tenda de campanha e foi o principal método de cobertura para queimaduras de espessura total até 1930.

A partir daí, grandes enxertos em folha, de espessura parcial, passaram a serem retirados, manualmente, por inúmeros cirurgiões, que aprenderam a manusear uma lâmina longa e fina, chamada lâmina de Ferris; na Inglaterra, uma lâmina semelhante, com um cilindro na frente, passou a ser utilizada (lâmina de Humby), e seu uso foi popularizado por Blair e Brown, nos Estados unidos da América.

Em 1939, o popular dermatômetro do tipo tambor foi desenvolvido por PADGETT E HOOD, na Universidade do Kansas, o que permitiu a Harry M. Brown conceber o dermatômetro elétrico, durante a segunda guerra mundial. Com o dermatômetro elétrico, fragmentos extensos de pele passaram a serem obtidos de maneira fácil e rápida para

enxertia. Hargest modificou o motor elétrico de Brown em 1965, substituindo-o por um motor movido a ar aumentando a velocidade da lâmina possibilitando cortes mais suaves.²⁴

A cicatrização da ferida após a enxertia de pele se processa por dois eventos característicos e seqüenciais:

A - Integração

Um enxerto para ser considerado integrado deve apresentar aderência, boa perfusão e viabilidade do segmento doado e todo esse processo depende basicamente da perfusão local.

Durante as primeiras 24 horas existe uma transsudação de plasma da área receptora, que é absorvido pelo enxerto formando uma camada de fibrina, essa por sua vez será responsável pela fixação e nutrição do enxerto (fase de embebição plasmática). A seguir existe a formação de uma delicada rede de capilares que possibilita a comunicação da superfície do enxerto com o leito da ferida (fase inosculatória). Nessa hora a fixação do enxerto ainda é débil a viabilidade não pode ser afirmada, à medida que existe formação de rede uma vascular mais desenvolvida com melhora do fluxo sanguíneo para o enxerto é que se pode garantir a sobrevivência do mesmo; esse processo se dá por volta do sexto dia do implante (fase de revascularização).^{36,37,38,39,40,41}

O estudo realizado por YAMAGUSHI *et als* (2000), fala a respeito de uma quarta fase, a de ativação dos queratinócitos, na cicatrização dos enxertos cutâneos. Em enxertos realizados com pele parcial, provavelmente por apresentarem espessura mais delgada, foi avaliada a ativação dos queratinócitos através de marcadores de proliferação celular como o Ki-67 e a adesão da célula matriz, pela marcação de B1 integrina. O

resultado foi que esse tipo de enxerto permite melhor embebição na fase inicial da enxertia e necessitam de menor suprimento sangüíneo a partir do leito subjacente. A ocorrência da ativação dos queratinócitos é razão a mais que facilita a integração dos enxertos de espessura parcial quando comparados aos de espessura total.⁴²

B - Contração

Cerca de dez dias após o implante, o enxerto já está integrado iniciando-se então a ação de miofibroblastos e proteínas contráteis promovendo a contração do enxerto.

Os miofibroblastos (fibroblastos do tecido de granulação) adquirem características bioquímicas e ultra-estruturais de células musculares lisas, incluindo a presença de microfilamentos e a expressão da actina alfa de músculo liso; devido a essa característica atribui-se a eles, além da função retrátil na contração das feridas, a síntese de componentes da matriz extracelular. A fibronectina, elemento de sustentação da matriz provisória, desaparece quando as fibras colágenas já se encontram orientadas.

As conclusões obtidas a partir dessas observações falam que os enxertos de pele total, tendem a apresentar menor retração tecidual em relação aos parciais, devido a pequena proporção dos miofibroblastos e ao desaparecimento precoce da fibronectina.

STEPHENSON, *et als* (2000) realizaram um estudo cujo objetivo era avaliar a suposição de que os enxertos de pele humana de espessura total contraem minimamente. Até então, a contração dos enxertos de espessura total nunca havia sido mensurada em humanos. Cinquenta enxertos foram acompanhados por fotografias com mensuração da contração, em seguimento de oito meses. Parâmetros avaliados, como idade, área doadora do enxerto e tamanho inicial do defeito, não mostraram diferença significativa relacionada

à contração. Na presença de infecção a contração foi de quase metade da área inicial, e, em sua ausência, enxerto/leito receptor contraíram-se em um terço da área inicial.⁴³

YAMAGUSHI *et als*, 2000. também avaliaram a contração usando enxertos de diferentes espessuras em feridas com profundidades variadas. Feridas superficiais cobertas com pele de espessura total contraíam mais do que se cobertas com pele de espessura parcial. Feridas que atingiam a fáscia muscular, se cobertas com epiderme pura ou enxerto de pele de espessura parcial, apresentavam contração maior do que se cobertas com pele de espessura total. Tais resultados sinalizam para a necessidade de ajustar a espessura do enxerto à profundidade da ferida.⁴²

RUSZCZAK Z; SCHWARTZ R.A (2000), relatam o uso de tecidos dérmicos acelulares são sugeridos para o tratamento de queimaduras extensas e eles são obtidos por remoção dos componentes celulares presentes nos tecidos, uma vez que são as células as responsáveis pela ativação da resposta imunológica. A ausência das estruturas celulares provoca pouca inflamação, não levando à rejeição do tecido transplantado.⁴⁴

Outra opção para a cobertura das úlceras é com pele cadavérica fresca ou armazenada, ou, ainda, pele animal, que é de reconhecido valor em grandes queimados. Sua aplicação promove oclusão da ferida, e assim o ambiente permanece úmido, tendo sua granulação, neovascularização e conseqüentemente cicatrização aceleradas. Por serem fortemente imunogênicas, com o passar de alguns dias, são rejeitadas. Sofre rejeição devido à presença de antígenos do doador que estimulam a reação imunológica. Sua rejeição é anunciada por uma vasodilatação seguida da aparência de circulação lentificada. Completa cessação do fluxo sanguíneo ocorre na maioria dos aloenxertos de pele humana viável entre sete e dez dias. Ela então se torna seca e se desprende espontaneamente de seu sítio de

implantação. O uso de aloenxertos de pele cadavérica é mais seguros e economicamente viáveis do que outras coberturas biológicas temporárias, como xenoenxerto porcino e membrana amniótica. Apresentam rápida aderência e menor potencial de antigenicidade em comparação com as demais.

Essas coberturas temporárias muitas vezes são usadas com o intuito de preparar o leito da ferida para uma cobertura definitiva. Sobre áreas avasculares, como defeitos sobre ossos e cartilagens, esses enxertos aumentam dramaticamente a formação do tecido de granulação, aumentando a possibilidade de integração de um enxerto autólogo seqüencial.

Vários trabalhos demonstram a segurança do uso da pele cadavérica, isentando-a do risco de transmissão de agentes infecciosos viáveis. Para minimizar o risco de transferência de doenças, os bancos de pele seguem protocolos submetendo o doador cadáver a uma rigorosa análise sorológica.

Outra preocupação se refere à contaminação do enxerto por bactérias. OBENG *et als.* em estudo microbiológico envolvendo a pele de 1.112 doadores, demonstraram taxa de contaminação de 4,9%. Apesar da limpeza realizada com antissépticos antes da coleta e posterior incubação da pele em recipiente com antibióticos, o controle microbiológico dos enxertos deve ser feito de rotina, e, quando detectada a contaminação desse material, deve ser descartado.⁴⁵

A realização de enxertos e retalhos é uma opção já fundamentada para o fechamento das úlceras cutâneas, mas envolve algumas dificuldades como área doadora, necessidade de procedimentos anestésicos, além de custos hospitalares de grande monta. Com base nessas dificuldades, inúmeros autores iniciaram estudos para viabilizar um tipo

de tratamento que possibilitasse a cobertura dessas lesões de forma menos agressiva ao doente, principalmente os que possuam área doadora escassa e com menores custos hospitalares, iniciando-se então a pesquisa sobre o cultivo celular.

O cultivo celular pode ser definido como um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias; esse material pode ser obtido através de doadores humanos, animais ou vegetais.

A obtenção de células para realização de culturas é obtida através da desagregação mecânica e ou enzimática do tecido base, com colocação dessas células em meio previamente selecionado para o desenvolvimento da cultura pretendida.

O histórico das pesquisas tem relatos já a partir do século XIX, mas só no início do século XX, Carrel demonstra que as células podem crescer e se reproduzir fora do organismo. Os relatos que se seguem contam a cronologia dos mais importantes eventos relacionados a cultura celular.^{7,47,48,49,50,51}

Em 1885 o pesquisador ROUX, declara que as células embrionárias de galinha podem ser mantidas vivas em solução salina (fora do corpo do animal).

VON MANGOLDT (1895)- Relata que transplantes de células epiteliais, em matrizes apropriadas, demonstraram serem efetivos na cobertura de ulcerações de pele antes mesmo de 1895.⁴⁶

HARRISON (1907)- Descreve uma descoberta da neurobiologia, cada fibra nervosa é produto de uma única célula nervosa e não a fusão de muitas.

ROUX (1910) . Descobriu através de seu estudo um vírus RNA (vírus de sarcoma de Rous) , encontrado em células de galinha , que era capaz de induzir a formação de um tumor nessas aves.

BURRONS (1910) – Incorpora soro nos meios de cultura, ele é o primeiro a observar mitoses “ *in vitro* “.

CARREL (1913)– Prêmio Nobel de 1912 de Medicina. Descobre que células podem crescer por períodos longos em cultura, desde que sejam “alimentadas” regularmente, sob condições assépticas.

EARLE (1948) – Isola um única célula da linhagem das células L e mostra que elas formam clones de células em cultura de tecidos.

GEY (1952) – Apresenta uma linhagem contínua de células derivadas de um carcinoma cervical humano, que mais tarde se tornou bastante conhecida como linhagem de células HeLa.

LEVI-MONTALCINI (1954) – Descubrem que o factor de crescimento do nervo (NGF) estimula o crescimento dos axónios em cultura de tecidos.

PUCK (1956) – Selecionou células mutantes com requerimentos de crescimento, alterados a partir de cultura de células HeLa.

TEMIN e RUBIN (1958) Baseando-se na descoberta feita por ROUX, purificam o vírus descoberto e desenvolvem um ensaio quantitativo para infecção de células de galinha em cultura.

HAYFLICK e MOORHEAD (1961)–Declaram que fibroblastos humanos , podem permanecer se multiplicando em cultura durante um tempo finito e que após isso

morrem. Foram os primeiros a utilizar antibióticos em meios de cultura para evitar contaminação.

LITTLEFIELD (1964)– É o primeiro a desenvolver um meio específico para o crescimento selectivo de células somáticas híbridas o HAT. Juntamente com a técnica de fusão das células, tornando acessível a genética de células somáticas.

KATO e TAKEUCHI (1964)– Conseguem desenvolver uma planta completa de cenoura, em cultura de tecidos, a partir de uma única célula da raiz da cenoura.

HAM (1965) – Desenvolve um meio definido (HAM F -10), sem soro, capaz de suportar o crescimento clonal de certas células de mamíferos.

HARRIS E WATKINS (1967)– primeiros heterocarions híbridos resultantes de manipulação génetica de células de mamíferos, através da fusão de células humanas e de camundongo, induzida por vírus.

AUGUSTI-TOCCO e SATO (1968)– adaptam um tumor de célula nervosa de camundongo (neuroblastoma) à cultura de tecidos e isolam clones que são electricamente excitáveis e que estendem os prolongamentos nervosos.

KOHLER e MILSTEIN (1975)– Produzem a primeira linhagem de células de hibridoma secretoras de anticorpos monoclonais.

RHEINWALD Y GREEN (1975)–_Descrevem técnica para cultura de queratinócitos com crescimento em base de fibroblasto.

SATO (1976) – Publica a primeira série de trabalhos mostrando que diferentes linhagens de células necessitavam de diferentes misturas de hormonas e de factores de crescimento para crescerem em meio sem soro, indefinidamente.

MARTIN e EVANS (1986)– isolam e cultivam células embrionárias totipotenciais do rato estaminais.

TOMSON e GEARHART (1998) – isolam células embrionárias humanas e conseguem mantê-las viáveis fora do organismo .

Na década de cinquenta do século vinte, iniciaram-se os estudos, a fim de se encontrar um meio de cultura ideal para o cultivo de células; os primeiros continham plasma de galinha, extrato de embrião bovino e soro de cordão umbilical. Pela quantidade de materiais utilizados não se sabia especificamente quais as reais necessidades de nutrientes para o crescimento celular *in vitro* .

HARRY EAGLE (1959), descobriu uma formula com componentes essenciais para a reprodução de células humanas em laboratório; foi o pesquisador das -- células HeLa e células L. Seu meio de cultura apresentava mistura de sais, carboidratos, aminoácidos e vitaminas suplementadas com soro de proteínas. Esse meio é usado até hoje e graças a ele os cientistas foram capazes de cultivar uma variedade de células com condições basais definidas.⁴⁷

A cultura de células podem ser divididas em dois tipos:

1. Cultura primária: cultura preparada directamente de tecidos de um organismo, com ou sem passo inicial de fraccionamento das células.
2. Cultura secundária: as células cultivadas foram retiradas de uma cultura primária; elas podem ser repetidamente subcultivadas desta forma por semanas ou meses.

Uma das maiores vantagens da cultura celular é a possibilidade de isolamento de células, sem qualquer tipo de alteração genética. É formada uma população uniforme, que além de proporcionar uma análise bioquímica favorece um implante mais seguro.

O desenvolvimento das técnicas de cultivo celular tem seu início de forma real a partir da década de 70, através de vários pesquisadores, dentre eles, Martin Evans, que conseguiu isolar células de um teratoma e provou que, sob condições adequadas poderiam ser reproduzidas e modificadas; com base nessas descobertas observou-se que a maioria das células poderia ser isolada e cultivada desde que sob condições específicas para cada linhagem.

Na segunda metade do século XX, além do grande desenvolvimento de curativos e de técnicas cirúrgicas que passaram a possibilitar a realização de enxertos de pele de forma mais segura e eficaz, desenvolveu-se o interesse pela engenharia de tecidos.

A bioengenharia integra a Física, a Química e a Matemática com princípios de engenharia, direcionando-as para o estudo da Biologia, Medicina, Odontologia e Saúde de uma forma geral; ela aperfeiçoa conceitos fundamentais, traduz conceitos do nível molecular para o orgânico, e desenvolve e fabrica inovações biológicas, aperfeiçoando biomateriais, processos, implantes médicos e dentários para promover a saúde, prevenir doenças, criar e aperfeiçoar diagnósticos e tratamentos para melhorar a saúde de todas as pessoas (SLAVKIN *et al.*, 1999).⁵²

Aos poucos, com o desenvolvimento da biologia molecular e da engenharia de tecidos foi sendo observado que, para se obter tecidos complexos em laboratório, era necessário reproduzir *in vitro* condições encontradas *in vivo*.

Em relação aos queratinócitos sabe-se que formam quase 90% das células da epiderme e são os que a regeneram depois dos ferimentos; eles também realizam processos nas células endoteliais, que são as que restabelecem o fluxo do sangue na pele danificada.

A primeira descrição de cultura de queratinócitos foi feita por BILLINGHAM e REYNOLDS¹ (1952). Em 1975, PRUNIÉRAS (1975) publicou trabalho sobre técnicas de culturas de células de pele. Ainda em 1975, RHEINWALD e GREEN (1975) publicaram um dos primeiros trabalhos descrevendo uma técnica de cultura de queratinócitos levando à formação de um equivalente epidérmico rudimentar (queratinócitos em múltiplas camadas, com presença de queratinização discreta nas camadas superficiais).^{7,53,54,55}

RHEINWALD e GREEN (1979) levantaram a possibilidade do uso desse equivalente epidérmico obtido em laboratório a partir da cultura de queratinócitos isolados como enxerto *in vivo*.⁷

O primeiro método laboratorial que sugeriu recombinar elementos dérmicos e epidérmicos *in vitro* foi descrito por FREEMAN *et al.* (1976). Nesse método, pequenas amostras de pele humana eram cultivadas sobre pedaços de pele porcina morta. Esses pedaços de pele de porco eram retirados como enxertos finos de pele com um dermatômetro elétrico e, então, esterilizados por exposição a raios gama. Para iniciar uma cultura, uma amostra de pele porcina morta era cortada com uma tesoura e colocada sobre uma grelha metálica, com a epiderme voltada para baixo, de tal forma que a derme profunda (reticular) ficava exposta. Sobre essa derme, eram colocados pedaços de pele humana (enxertos finos) “viva”, de aproximadamente 2,0 X 2,0 mm. As grelhas contendo a pele porcina morta com

as amostras de pele humanas eram então colocadas em placas de Petri, com meio de cultura para crescimento celular suficiente para cobrir todas as grelhas e embeber a pele porcina, mantendo o sistema em interface ar-líquido. Com isso, as células epidérmicas humanas iniciavam seu crescimento ao redor das amostras de pele humana. Após cerca de 2 a 3 semanas, essas células epidérmicas cobriam totalmente a pele (derme) porcina morta e a pele humana inicialmente colocada sobre a pele porcina se destacava. Fibroblastos não se desenvolviam nesse tipo de cultura celular.

O sistema demonstrado por FREEMAN *et al.* (1976), embora bastante interessante, foi bastante criticado, uma vez que as células epidérmicas *in vivo* não crescem sobre a derme reticular (profunda) e não sofrem maturação (presença intracelular de grânulos de glicogênio) sem contato com a membrana basal.⁵⁶

Baseado nisso, RÉGNIER *et al.* (1981), modificaram e aperfeiçoaram o trabalho de FREEMAN *et al.* (1976), realizando culturas de queratinócitos humanos sobre uma derme porcina morta em que era mantida a lâmina basal. O cultivo, portanto, era realizado sobre a membrana basal presente na derme lamelar, simulando condições bem mais próximas àquelas encontradas *in vivo*. Com esse trabalho, RÉGNIER *et al.* (1981) conseguiram obter uma epiderme humana reconstruída *in vitro* com várias camadas, incluindo a camada córnea, e demonstraram a presença intracelular de glicogênio em queratinócitos nas camadas epidérmicas intermediárias (camadas espinhosa e granulosa). Demonstraram, também, que era fundamental manter as células em uma interface ar-líquido para que a síntese de queratinas fosse possível.^{55,56,57}

PRUNIÉRAS *et al.* (1983) descreveram um método de cultivo de queratinócitos humanos *in vitro*, expondo as células epidérmicas a uma interface ar-líquido, sobre um substituto dérmico que consideraram mais fisiológico que a derme lamelar de porcos. O

substituto escolhido foi uma derme humana morta desepidermizada (DED). Para a obtenção dessa DED, pequenos fragmentos de pele humana, retirados como enxertos finos de pele, eram colocados em soro fetal bovino por cerca de 10 dias e, então, com o uso de uma pequena espátula, a epiderme era raspada mecanicamente e totalmente separada da derme.⁵⁵

A DED era então colocada sobre grelhas metálicas e, sobre ela eram colocadas células epidérmicas (queratinócitos) em suspensão, previamente cultivadas, e o sistema era mantido em interface ar-líquido, como descrito no método descrito por FREEMAN *et al.* (1976). Assim, sobre essa DED, foi possível desenvolver uma epiderme humana perfeitamente diferenciada, com maturação celular (grânulos intracelulares de glicogênio), hemidesmosomos e filamentos extracelulares de adesão (“gap junctions”), ao contrário do observado no método de FREEMAN *et al.* (1976).^{55,56}

PRUNIÉRAS *et al.* (1983) relataram a importância da adição de cálcio aos meios de cultura, na concentração de 1.5 mM, para que ocorresse a formação de uma epiderme completamente diferenciada (múltiplas camadas). Mais tarde, estudos desenvolvidos por BESSOU *et al.* (1995) e HOELLER *et al.* (2001) reforçaram a importância da presença de íons cálcio nos meios de cultura para a formação da epiderme, além da exposição dessa epiderme ao ar (interface ar-líquido) durante a gênese tecidual, para que ocorresse a formação da camada córnea. SUPP *et al.* (1999) demonstraram que a restauração funcional da epiderme *in vitro* (queratinização, fornecendo função de barreira mecânica) é estimulada por exposição tecidual ao ar (interface ar-líquido), com incubação em condições de baixa umidade.^{55,58,59}

BESSOU *et al.* (1995) demonstraram a possibilidade de se obter uma epiderme humana reconstruída *ex vivo*, com queratinócitos e melanócitos, que colocados sobre uma DED (similar ao demonstrado por PRUNIÉRAS *et al.*, 1983), com uma razão de 1:20 entre

melanócitos e queratinócitos, formavam uma epiderme bem diferenciada, com melanócitos normais, que mantinham seu potencial de produzir melanina sob estimulação de radiação UVB.^{55,58}

RÉGNIER *et al.* (1997) introduziram células de Langerhans no modelo proposto por BESSOU *et al.* (1995), durante a formação da epiderme, obtendo, assim, uma epiderme humana reconstruída *in vitro* com função imunitária. Essas células de Langerhans foram obtidas através do isolamento de células progenitoras hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical, que depois eram induzidas a se diferenciarem em células dendríticas (Langerhans) por fator estimulante de colônias de macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Modelos de epiderme humana reconstruída *in vitro* contendo células de Langerhans também podem ser obtidos isolando-se essas células a partir de sangue periférico, conforme demonstraram RÉGNIER *et al.* (1998).^{58, 60,61}

BOLÍVAR-FLORES e KURI-HARCUCH (1999) obtiveram sucesso ao tratarem dez pacientes portadores de ulcerações crônicas de pele em membros inferiores, decorrentes de estase venosa ou diabete, com células epidérmicas humanas alogênicas congeladas, provenientes de culturas celulares. Segundo TERSKIKH e VASILIEV (1999), em muitos casos, aloenxertos de queratinócitos provenientes de culturas celulares promovem o fechamento de ulcerações de pele através de estimulação da epitelização autógena no leito da ferida pelas células alógenas.^{11,12}

RONFARD *et al.* (1991) utilizaram cola de fibrina como suporte biológico para enxerto de queratinócitos em 2 pacientes vítimas de queimaduras, resultando em epitelização das áreas afetadas, com formação de epidermes estratificadas e bem diferenciadas. HORCH *et al.* (1998), utilizando uma malha de cola de fibrina com

queratinócitos humanos cultivados em seu interior, compararam, em ratos, a integração e qualidade desse substituto de pele com enxertos de pele humana convencionais, demonstrando uma epitelização mais rápida do que com o uso de enxertos convencionais e com mesmo índice de contração do leito receptor.^{62,63}

COULOMB B,(1998), descreve que não existe a necessidade de grandes extensões de pele para que o cultivo dos queratinócitos seja realizada, prova que com amostras de pele sã entre meio e dois centímetros a velocidade de obtenção das células era a mesma que em amostras de 12 a 15 centímetros até então extraídas.⁴⁸

LAN *et als* (1999), descreve quatro técnicas para o cultivo de queratinócitos, três com base em pele artificial, cada uma com espessura e forma diferentes e apenas uma com bases em fibroblastos, chegando a conclusão que a última apresenta melhores resultados.⁶⁴

NAVARRO *et als*(2000),em seu estudo mostra que a colocação de queratinócitos em forma de *spray* em uma região que apresente dano tecidual, seja ele qual for, acelera o processo de cicatrização em relação a colocação das bases tissulares com queratinócitos e fibroblastos.^{49,50}

HORCH *et als.* (2001) aplicaram queratinócitos suspensos em cola de fibrina (Tisseel®) sobre úlceras crônicas de pele em dez pacientes, obtendo fechamento completo ou próximo disso em praticamente todos.⁶⁵

RONFARD *et als.* (2000) demonstraram que uma epiderme reconstruída a partir de células autólogas (queratinócitos) associadas a uma matriz de fibrina tem a capacidade de se renovar e se auto-reparar por anos.⁶⁶

O conceito de uma derme artificial foi introduzido por YANNAS *et al.* (1977), que idealizaram uma pele artificial de estrutura bilaminar, composta por um filme de

silicone denso e por uma esponja porosa de colágeno contendo condroitina-sulfato. O uso dessa pele artificial para aplicação clínica em defeitos de pele (feridas) foi inicialmente desenvolvido por YANNAS e BURKE (1980), YANNAS *et al.* (1980), DAGALAKIS *et al.* (1980) e por BURKE *et al.* (1981). Foi observado que a membrana densa de silicone agia como um obstáculo, prevenindo infecções bacterianas e controlando a perda de fluidos corporais, e que a esponja de colágeno e condroitina-sulfato era biodegradável e permitia o influxo de fibroblastos dérmicos a partir do leito da ferida (BURKE, 1983).^{70,71,72}

KIM *et al.* (1999) sintetizaram um substituto artificial de pele utilizando uma esponja de colágeno com duas superfícies de diferentes densidades e com poros de diferentes diâmetros. Na camada mais profunda da esponja foram injetados fibroblastos e na superfície foram semeados queratinócitos. O sistema foi então mantido em interface ar-líquido e aproximadamente cinco dias após havia cerca de 10 camadas de queratinócitos e os fibroblastos ocuparam todo o interior da esponja de colágeno.⁷³

KREMER *et al.* (2000) realizaram estudo demonstrando que um substituto dérmico constituído de colágeno bovino, condroitina-6-sulfato e uma membrana de silicone manufaturada (Integra®), com queratinócitos humanos semeados em sua superfície, induziu a formação de um substituto de pele que, quando enxertado em ratos, levou à formação de uma epiderme perfeitamente diferenciada, com pouca contração do enxerto. A aplicação do Integra®, previamente à realização de um enxerto de pele autógeno, para correção de contratura cervical anterior em pacientes vítimas de queimadura, induziu a formação de uma neoderme, com características histológicas e biomecânicas semelhantes às da derme humana normal, fornecendo resultados cosméticos superiores ao uso de enxertos autólogos isolados, segundo HUNT *et al.* (2000).^{74,75}

GALASSI *et al.* (2000), realizaram cultivo de fibroblastos *in vitro* dentro de uma matriz dérmica composta de benzil-éster de ácido hialurônico (HYAFF®) e, posteriormente, enxertaram esse substituto dérmico obtido em dois pacientes (um com uma ferida cirúrgica pós-ressecção de epiteloma em escalpo e outro com uma úlcera sacral de decúbito), com formação de nova derme e fechamento completo das feridas; no primeiro caso após enxertia de epiderme sobre a neoderme e no segundo caso por epitelização a partir das bordas da derme neoformada.⁷⁶

Enxertos finos de pele são vascularizados (após a enxertia) por uma combinação de processos, que incluem inoculação e neovascularização. Inoculação é a anastomose de capilares do leito da ferida do receptor aos diversos vasos terminais da derme do enxerto, e esse é tido como o mecanismo da vascularização precoce do enxerto (YOUNG *et al.*, 1996). A neovascularização é o crescimento de novos capilares do leito da ferida para dentro do enxerto de pele, e esse processo ocorre mais tardiamente; estudos indicam que células endoteliais do hospedeiro (receptor) não aparecem nos capilares dérmicos do enxerto antes de uma semana após a enxertia (YOUNG *et al.*, 1996).

A vascularização de substitutos de pele cultivados em laboratório, quando enxertados *in vivo*, ocorre somente através do processo de neovascularização, e isso contribui muito para a perda desses substitutos, uma vez que há aumento do tempo para re-perfusão, isquemia mais prolongada e conseqüente privação de nutrientes e oxigênio para as células enxertadas (BOYCE *et al.*, 1996).

SUPP *et al.* (2000), modificaram geneticamente queratinócitos cultivados *in vitro*, através da utilização de um retrovírus (citomegalovírus) que promoveu a produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelo ácido ribonucléico (RNAm) desses queratinócitos. O VEGF é expresso pelos queratinócitos normais durante o fechamento de

uma ferida, ao longo do período de neovascularização da pele (FRANK *et al.*, 1995). Como o VEGF secretado pelos queratinócitos epidérmicos tem um efeito mitogênico nas células endoteliais da microvasculatura dérmica (DETMAR *et al.*, 1995), a modulação dos níveis de VEGF na epiderme pode acelerar e potencializar a vascularização da pele. Baseados nesses conhecimentos, SUPP *et al.* (2000), idealizaram um substituto dérmico composto de fibroblastos e queratinócitos modificados, capazes de expressar VEGF, que quando enxertado em ratos atímicos, exibiu um grande número de vasos dérmicos (neovascularização) em curto período de tempo (três dias) quando comparado com controles com queratinócitos não modificados geneticamente (10 a 14 dias).^{77,78,79,80,81}

O dermatan sulfato proteoglicano II (DSPG II) e sua proteína central, decorina, presentes na derme humana, foram identificados por MUIR *et al.* (1997) e por STEWART *et al.* (2001), como diretamente envolvidos na inibição da proliferação dos fibroblastos em ferimentos em cicatrização, prevenindo, assim, a formação de tecidos de granulação ou cicatrizes hipertróficas.

EL-SHEEMY *et al.* (2001) demonstraram que uma matriz de colágeno mantida em meio de cultura, com fibroblastos humanos em seu interior, sofre uma contração (causada pelo crescimento e multiplicação dos fibroblastos em seu interior) acentuadamente menor quando exposta a um extrato da derme a partir da qual esses fibroblastos foram originalmente obtidos; reforçaram, assim, a teoria de haver na própria derme humana substâncias que regulam não só a multiplicação e crescimento dos fibroblastos, mas também sua inibição.^{82,83,84}

MA *et al.* (2001), em trabalho utilizando fibroblastos fetais humanos, concluíram que, em engenharia de tecidos, materiais utilizando condroitina-sulfato, associada a uma membrana de silicone densa apresentam vantagem sobre materiais

utilizando somente colágeno quando se visa reconstrução de pele *in vitro*, uma vez que o colágeno sozinho permite maior contração de sua matriz pelos fibroblastos.⁸⁵

Segundo JOHNEN *et al.* (2001), o uso de membranas biodegradáveis é o tópico mais atual envolvendo sistemas para proliferação celular *in vitro* e a transferência dessas células para um determinado ferimento; o crescimento de queratinócitos e fibroblastos *in vitro*, originários de um mesmo espécime, apresenta vantagens para ambos os tipos celulares.⁸⁶

Embora os mecanismos de ação de um tecido (pele) obtido por bioengenharia e colocado sobre um ferimento não sejam perfeitamente claros, foi levantada a hipótese de que as células vivas dentro de substitutos artificiais de pele sejam “inteligentes” em termos de bioengenharia. Este conceito sugere que as células são capazes de distinguir e se adaptarem ao meio ambiente em que se encontram, e de agirem apropriadamente em relação ao reparo do tecido em que se encontram, regulando a dose e a seqüência de mediadores (interleucinas) produzidos, e o momento exato de liberação de citocinas e fatores de crescimento celulares, como sugerido por trabalhos de FALANGA *et al.* (1998), PHILLIPS (1998) e FALANGA (2000). FALANGA *et al.* (2002), utilizando um substituto dérmico (HBSS, Organogenesis, Canton, MA, USA; licenciada pela Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ, USA) contendo componentes dérmicos (fibroblastos) dentro de uma membrana de colágeno compacta sob uma epiderme corneificada, demonstraram que um substituto dérmico contendo células vivas é capaz de expressar respostas celulares e moleculares após lesões teciduais *in vitro*, comparáveis às respostas observadas *in vivo*, e sugerem que a cicatrização acelerada observada em ferimentos *in vivo*, nos quais são utilizados substitutos de pele contendo células vivas, se deva à

habilidade desses substitutos em produzir citocinas e fatores de crescimento celulares.^{87,88,89,90}

Ainda em 1999, RADHIKA *et al.*, utilizando diferentes tipos de matrizes de colágeno bovino, demonstraram que as células (queratinócitos e fibroblastos) que foram cultivadas no interior dessas matrizes não apresentavam alterações morfológicas e de suas propriedades bioquímicas e funcionais.⁹¹

STOCK e VACANTI (2001), em um trabalho de revisão sobre engenharia de tecidos, confirmaram que a abordagem mais atual e com melhores perspectivas para se obter tecidos complexos em laboratórios é o uso de matrizes biodegradáveis para servirem de “moldes” para direcionarem o crescimento celular. Estas matrizes são normalmente preenchidas com células vivas, derivadas de biópsias ou de células pluripotentes, que se proliferam, organizam e produzem matrizes celular e extracelular. Durante a formação das matrizes celular e extracelular pelas células, a matriz artificial inicial (“molde”) é degradada, absorvida ou metabolizada.⁹²

PONEC *et al.* (2001), concluíram que para que um equivalente de pele humana seja utilizado para propósitos científicos, entre os pré-requisitos básicos encontram-se⁹³

- A formação, na epiderme, de um estrato córneo *in vitro*, constituindo uma barreira mecânica semelhante àquela encontrada *in vivo*;
- A produção de corpúsculos lamelares de glicogênio intracelulares, que devem estar presentes na camada granulosa da epiderme;
- Aspecto lamelar (cuticular) da epiderme.

WELSS *et al.* (2004), em trabalho de revisão, relataram que o parâmetro mais utilizado para se testar a toxicidade de substâncias aplicadas em equivalentes de pele *in*

in vitro é a medida da viabilidade celular e da integridade das membranas celulares. Entretanto, observaram que o “European Center for the Validation of Alternative Methods”, órgão europeu responsável pelo desenvolvimento de novos métodos para testes de substâncias, concluiu que a citotoxicidade *in vitro*, isoladamente, não demonstra a real toxicidade de uma substância, e que, testes mais específicos, com dosagens de biomarcadores (citocinas, por exemplo), devem ser realizados. Entre esses testes, verificaram que as dosagens de interleucinas 1, 6, 8 e 10, de fator de necrose tumoral (TNF), e de metabólitos do ácido aracdônico, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, representam excelentes opções.

Segundo WELSS *et al.* (2004), a dermatite de contato, com manifestações clínicas que variam desde eritema local até dor e edema generalizado, é um dos efeitos adversos à exposição de substâncias tóxicas mais observados em humanos. Em virtude disso, novos produtos químicos, de uso tópico, são inicialmente avaliados quanto aos seus potenciais alergênicos, através da aplicação em animais. Ainda, segundo os mesmos autores (WELSS *et al.*, 2004), como esses testes em animais podem causar-lhes desconforto e dor, tem sido cada vez mais freqüente a proibição de pesquisas envolvendo seres vivos, o que tem estimulado muito o uso de equivalentes de pele *in vitro* para a realização destes testes.⁹⁴

POUMAY *et al.* (2004), descreveram um método para obtenção de uma epiderme humana reconstruída *in vitro*, a partir da cultura de queratinócitos de diferentes doadores sobre uma membrana de policarbonato, sem a presença de substitutos e/ou elementos dérmicos. Relataram a utilização dessa epiderme, constituída somente de queratinócitos, para estudos *in vitro* da toxicologia de duas substâncias, uma irritante (benzalcônio cloridrato) e outra sensibilizante (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A toxicidade

dessas substâncias foi medida através da viabilidade celular e da dosagem de interleucinas 1 e 8 (ELISA) após a aplicação dessas substâncias, na camada córnea da epiderme.⁹⁵

EHRlich (2004) relatou bons resultados no fechamento de ferimentos de pele em ratos, utilizando uma matriz de colágeno com fibroblastos cultivados em seu interior e queratinócitos depositados sobre essa matriz. Concluiu haver grande facilidade na integração do equivalente de pele enxertado no leito receptor em ratos, o que não é observado em humanos, mas não conseguiu elucidar o porquê dessa diferença⁹⁶

MARGULIS *et al.* (2004) descreveram método para obtenção de um equivalente de pele que apresentou arquitetura tecidual semelhante à observada *in vivo*; relataram como realizar culturas isoladas de queratinócitos e fibroblastos e como formar um equivalente de pele a partir da cultura simultânea de fibroblastos dentro de um gel de colágeno e de queratinócitos sobre esse gel.

Em 2004, NAVSARIA *et al.* publicaram descrição de uma técnica de reepitelização completa, com formação de folículos pilosos, utilizada em um paciente com queimadura de escalpo. Tal técnica baseou-se na colocação de uma matriz de colágeno (Integra®) sobre o leito da queimadura, e posterior enxertia de folículos pilosos sobre a neoderme formada, 12 dias após, utilizando-se técnica de micro-enxertos para folículos pilosos. A epitelização completa de metade do escalpo ocorreu 28 dias após a queimadura. Os autores acreditam que a epitelização ocorreu a partir das células pluripotentes presentes nos folículos pilosos, resultando em um epitélio que expressou citoqueratinas 1 e 10 (marcadores para epiderme maturada presentes em pele normal) e não expressou citoqueratinas 6 e 16 (marcadores para hiperproliferação epitelial presentes em ferimentos mas não na pele normal) após 1 ano de enxertia (NAVSARIA *et al.*, 2004).^{97,98}

REHDER *et als* (2004), demonstram que é possível obter uma epiderme humana reconstruída *in vitro* completamente diferenciada a partir da cultura de queratinócitos e melanócitos sobre uma derme humana morta desepidermizada.⁵¹

GRAGNANI *et als* (2007), descreve uma técnica de preparo do cultivo de queratinócitos, que compara o uso da tripsina e da termolisina. Comparado ao método convencional, os experimentos mostraram que no grupo da termolisina mostrou facilidade para a separação entre a epiderme e derme, não houve contaminação por fibroblastos e produziu um maior número de colônias formadas, com diferença estatística significativa.⁹⁹

Sabe-se que, em se tratando de doença venosa crônica, em estágios avançados, como quando existe presença de úlceras, o simples fechamento dessa lesão, não traz a cura ao doente.

Inúmeras são as pesquisas para a solução desse quadro, ou seja, tratar a insuficiência venosa crônica.

Os mais recentes trabalhos, vêm comprovando através de seus estudos clínicos, que a incompetência das válvulas venosas causadas pelo processo inflamatório crônico levando a distúrbios do padrão do fluxo venoso, são importantes agentes na patogênese dessa doença. Tais observações, motivaram a uma possível intervenção farmacológica para se tentar prevenir e mesmo tratar essa afecção.

BERGAN *et als* (2006), descrevem em seu estudo que a incompetência valvular venosa, é uma das principais causas da hipertensão venosa crônica; sendo que, essa lesão da válvula venosa se deve a um processo inflamatório precoce, onde a presença dos leucócitos

junto aos folhetos valvares desencadeia a liberação de enzimas proteolíticas, o que resulta em danos estruturais a válvula.^{100, 101}

KISTNER *et als* (1996), descreve que a disfunção da válvula venosa, além de propiciar o refluxo sanguíneo, causa também alterações no fluxo de sangue ao redor do seio valvar o que dificulta a oxigenação do mesmo, causando alterações hemodinâmicas, que induzem a reações inflamatórias locais.¹⁰²

BERGAN E GEERT, *et als* (2006)em seu estudo conseguiu confirmar que o uso da Diosmina450 mg + Hesperidina 50 mg Micronizada conseguiu reduzir de forma significativa marcadores da reação inflamatória, como a quantidade de granulócitos e macrófagos, além da infiltração por linfócitos T; diminuindo o dano as válvulas, dificultando a progressão da doença.^{102,103,104,105,106}

A doença venosa crônica prolongada, gera danos na microcirculação, causando extravasamento de líquidos, proteínas e glóbulos vermelhos para o espaço intersticial, levando ao edema e ao processo inflamatório.

Em indivíduos saudáveis os leucócitos circulam livremente pelos capilares sanguíneos; nos portadores de doença venosa crônica, moléculas de adesão leucocitária são expressas em maior quantidade. Isso ocorre, pelo processo inflamatório crônico. Esse quadro leva a degranulação leucocitária, o que piora a inflamação e leva a danos da micro circulação

RAMELET , BOISSEAU , ALLEGRA, NICOLAIDES, CAMEROTA *et als* (2008), relatam o uso de drogas que auxiliam no tratamento da doença venosa.

Os medicamentos ditos venoativos, compõe um grupo heterogêneo de drogas, na sua maioria de origem vegetal – flavonóides.. O seu uso vem sendo comprovado por inúmeros estudos duplo cego onde a redução da dor e do edema é comprovado.

O mecanismo de ação dessas drogas consiste em agir na parede das válvulas, diminuindo a agregação leucocitária e o processo inflamatório.

Os flavonóides, aqui citando a diosmina hesperidina micronizada, têm como ação principal inibir as moléculas de adesão leucocitária, evitando assim, a degranulação e o conseqüente dano á microcirculação, como é micronizada em sua totalidade, ou seja, suas partículas são inferiores a dois micrometros o que possibilita sua total absorção, melhorando a eficácia e a proteção venosa, oferecendo melhores benefícios clínicos ao doente. ^{107,108,109,110,111,112}

A aplicação do enxerto de queratinócitos autólogos, associado ou não, ao uso da Diosmina Hesperidina micronizada, necessitava de uma avaliação para quantificação da melhora dos pacientes de forma mais palpável, principalmente quanto ao critério de dor, devido a isso, aos dois grupos foi aplicado um instrumento para avaliar esse critério.

O questionário INVENTÁRIO DE DOR DE WISCONSIN, com o qual tenta-se avaliar e quantificar a dor dos doentes, foi realizado em duas partes, sendo a primeira composta de perguntas que avaliam especificamente a dor e a segunda a maneira como a dor influencia na vida do doente. ¹¹³

A aplicação destes questionários em momentos diferentes da vida ou do acompanhamento clínico dos doentes possibilitou a avaliação e quantificação da qualidade de vida. GONZALEZ, 1995. ¹¹⁴

9. Casuística e Método

9. Casuística e Método

9.1 Casuística

Foram selecionados para esse estudo 25 doentes todos eles portadores de hipertensão venosa crônica, varizes primárias, com classificação clínica CEAP 6, sendo esta, uma classificação de graduação da doença venosa dos membros inferiores onde (C), refere-se a clínica, (E) etiologia, (A) anatomia e (P) patologia. No estudo, o CEAP 6 classificou doentes com úlcera varicosa aberta.

Para o estudo os doentes foram avaliados por noventa dias.

Todos os doentes eram portadores de úlcera há vários anos, submetidos a tratamentos convencionais com curativos, bota de Unna, elastocompressão sem melhora clínica significativa.

Em sua totalidade os doentes eram acompanhados no ambulatório de Cirurgia Vascular Periférica da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Desta forma, por via direta, ou seja, os doentes que se adequavam ao perfil foram convidados a participar do estudo, durante suas consultas ambulatoriais, sendo que os mesmos foram esclarecidos do propósito da convocação, contemplando os critérios do Comitê de Ética em Pesquisa, resoluções n.º 196/96 e 251/97, que falam sobre a experimentação em "*Anima Nobile*", e todos foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido sobre o procedimento proposto.

Os doentes portadores de infecções sistêmicas, doenças imunossupressoras e ou infectocontagiosas, não foram incluídos no estudo. Dos doentes envolvidos no estudo quatro eram do sexo masculino e 21 do sexo feminino, com média de idade de 68.36 anos (42 e 93). Conforme demonstrado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Distribuição dos doentes quanto ao sexo e idade - Grupo I

DOENTES	SEXO	IDADE
1	F	68
2	F	45
3	M	58
4	F	75
5	F	75
6	F	74
7	F	80
8	F	64
9	F	75
10	F	75
11	F	75

Tabela 2: Distribuição dos doentes quanto ao sexo e idade - Grupo II

DOENTES	SEXO	IDADE
1	F	66
2	F	58
3	F	75
4	F	71
5	F	78
6	F	65
7	F	54
8	F	93
9	F	80
10	M	58
11	F	78
12	M	42
13	M	47
14	F	80

9.1.1 Grupos

Os doentes foram divididos através de sorteio entre dois grupos distintos.

Grupo I

Onze doentes formaram esse grupo, dez mulheres e um homem, todos portadores de hipertensão venosa crônica com úlceras de estase. A eles foi orientado repouso relativo, entendendo-se por isso funções que não levem perigo ao enxerto, mas que permitam deixá-los com a vida o mais próxima do normal. Na primeira semana o doente será liberado para levantar a cada duas horas cerca de dez minutos, na segunda semana, levantar a cada duas horas cerca de vinte minutos, sendo após a segunda semana o repouso de vinte minutos a cada duas horas.

Grupo II

Quatorze doentes formaram esse grupo, 11 mulheres e 3 homens, todos portadores de hipertensão venosa crônica com úlceras de estase, a eles foi orientado repouso relativo, entendendo-se por isso funções que não levem perigo ao enxerto, mas que permitam deixá-los com a vida o mais próxima do normal. Na primeira semana o doente será liberado para levantar a cada duas horas cerca de dez minutos, na segunda semana, levantar a cada duas horas cerca de vinte minutos, sendo após a segunda semana o repouso de vinte minutos a cada duas horas.

A este grupo também foi acrescentada a diosmina 450 mg e hesperidina 50mg, micronizada a cada 12 horas .

9.2 Método

9.2.1 – Critérios de inclusão e exclusão

Para a inclusão nesse estudo, o doente deveria ser maior de dezoito anos, concordar com o termo de consentimento livre e esclarecido, comprometer-se a colaborar com o estudo, não provendo situações que pudessem alterar o resultado final, tais como, ingerir medicações por conta própria ou aplicá-las sobre o leito das úlceras; comparecer às consultas agendadas ou avisar do motivo da falta, não ser portador de doenças infectocontagiosas e ou imunossupressoras, nem estar participando de algum outro estudo clínico que pudesse alterar resultados em ambos.

9.2.2 - Anamnese

Procedeu-se a avaliação clínica do doente vascular através de anamnese dirigida, com o registro de eventuais fatores de risco para a doença venosa, como antecedentes pessoais, familiares , hábitos, exame físico geral e físico vascular completo - tendo sempre o cuidado de ser realizado pelo mesmo examinador.

Na anamnese dirigida, foi dada especial atenção aos sintomas da doença venosa como ,dores em peso, cansaço, prurido e edema . Com relação aos antecedentes pessoais, inquiriu-se sobre diabetes mellitus, hipertensão, obesidade , cardiopatias e reicidiva das úlceras. Aos doentes também foi perguntado sobre os mesmos antecedentes em familiares de primeiro grau.

Em relação aos antecedentes pessoais: sete doentes (28 %) apresentavam diabetes mellitus do tipo II; 11 (44 %) hipertensão arterial sistêmica; quatro (16%) cardiopatia , 18 (72%) obesidade e 25(100%) reicidiva de úlceras. A classificação de obesidade foi feita com base no cálculo do índice de massa corpórea (IMC) dos

doentes, onde foi considerado o IMC acima de 30. Os dados obtidos estão demonstrados a seguir nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Distribuição dos doentes quanto aos antecedentes pessoais- Grupo I

Doentes	DM	HAS	CARDIOPATIA	OBESIDADE	ÚLCERAS
1		+		+	+
2				+	+
3					+
4	+	+		+	+
5	+	+	+	+	+
6			+		+
7				+	+
8	+	+			+
9		+			+
10				+	+
11		+		+	+

Tabela 4: Distribuição dos doentes quanto aos antecedentes pessoais - Grupo II

Doentes	DM	HAS	CARDIOPATIA	OBESIDADE	ÚLCERAS
1				+	+
2	+	+		+	+
3				+	+
4				+	+
5		+	+	+	+
6			+	+	+
7				+	+
8	+	+			+
9	+	+		+	+
10					+
11				+	+
12				+	+
13					+
14	+	+		+	+

9.2.3 – Exame Físico

Com relação ao exame físico, inicialmente os doentes foram submetidos a exame físico completo, pesados e sua altura medida. Foram pesquisadas as alterações vasculares arteriais, venosas e linfáticas dos membros superiores e inferiores da região cervical e abdominal. Para tanto lançou-se mão do exame clínico geral e especializado com inspeção, palpação e ausculta, valorizando-se dilatações, alterações de pulsatilidade, frêmitos e sopros, alterações de trofismo de pele, presença de úlceras e ou outras lesões tróficas, alterações de coloração e anexos.

Em sua totalidade, os doentes, foram submetidos a ecocolor Doppler para avaliação dos sistemas venosos superficial e profundo, sendo que todos apresentaram apenas varizes primárias, ou seja, a avaliação do sistema venoso profundo mostrou-se sem alterações, como refluxo ou obstruções.

Cumpridos os critérios de elegibilidade dos doentes, os mesmos foram submetidos à coleta de amostra de pele e sangue, a fim de possibilitar a cultura celular de queratinócitos e a confecção da cola de fibrina.

9.2.4 – Coleta de Amostras

Sob técnicas assépticas todos os 25 doentes foram submetidos a coleta de amostra de pele e sangue.

A região inguino crural foi a escolhida, para exereses da pele, pelo fato dessa área, apresentar pele frouxa com facilidade de cicatrização.

O doente foi então colocado em decúbito dorsal horizontal, tendo a sua região inguino- crural , exposta, degermada com solução tópica de clorexidina 2 %, e coberta por campo estéril, como demonstrado pelas figuras a baixo 1 e 2

Figura 1- Área Doadora



Figura 2 – Coleta da Amostra



Seguiu-se a anestesia local da região com Xylocaína a 1% sem vasoconstritor na dose de 2 ml, (20 mg).através de uma incisão que variou entre 0,5 e 1 cm de extensão. A amostra de pele obtida, foi colocada em solução salina 0.9% e a ferida suturada com pontos separados através de fio monofilamentar de nylon 5.0; realizado, em seguida, curativo oclusivo na área .

Todos os doentes foram submetidos à retirada de 40 mililitros de sangue total, através de punção de veia periférica com cateter *butterfly* número 20, a fim de viabilizar o preparo da cola de fibrina autóloga.

O procedimento descrito foi realizado em sala limpa do ambulatório de Cirurgia Vasculiar Periférica da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Após a coleta, o material foi levado ao Laboratório de Cultura de Células da Pele e Epiderme Reconstruída (LCCP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP – Campinas, São Paulo, Brasil). O qual possui sala de cultura com sistema de controle ambiental, área limpa CLASSE ISO 7 (ISO 14644-1) ou CLASSE 10.000 conforme Federal Standard 209e.

Os fragmentos de pele, de aproximadamente 0,5 a 1,0 cm, após serem coletados, foram acondicionados em frasco estéril e conservados em soro fisiológico 0,9% a 4oC, não ultrapassando 12 horas até sua manipulação.

Os fragmentos foram separados do tecido adiposo e colocados em frascos com solução de Hanks (Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA, cat. 14025-092) + antibiótico e antimicótico (penicilina G sódica, estreptomicina e anfotericina B – GIBCO cat. 15240-062). Cortou-se a pele em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm.

Colocaram-se os fragmentos de pele em placas de Petri com tripsina 0,25% (Trypsin EDTA – GIBCO cat. 25200-056) e foram mantidos em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO₂, por 4 horas, separando-se, então, a derme da epiderme.

Neutralizou-se a tripsina com soro fetal bovino (GIBCO cat. 10437-028). O sobrenadante (contendo as células dérmicas e epidérmicas) foi recuperado, passado em filtro de nylon (Falcon) de 40 µm e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos.

O precipitado (células) foi lavado com solução de Hanks + antibiótico e antimicótico, e novamente centrifugado.

Retirou-se uma alíquota para contagem manual das células em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com azul de trypan .

9.2.5 - Culturas Celulares

Após a contagem, as células foram distribuídas em frascos de cultura, com 1,0 X 10⁵ células por cm² e, então, incubadas a 37°C, com tensão de 5% de CO₂, em meios de crescimento específico para queratinócitos.

9.2.6 - Cultura de Queratinócitos

Utilizou-se meio de cultura para queratinócitos (GIBCO cat. 10785-012), suplementado com L-Glutamina 2 mM/ml, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml (GIBCO cat. 10378-016) e soro fetal bovino 10%

Os frascos foram colocados em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO₂. Trocaram-se os meios de cultura 3 vezes por semana. Quando as células estavam confluentes, realizou-se a passagem.

9.2.7 - Passagem Celular

Realizou-se a sucção dos meios de cultura dos frascos. Adicionou-se tripsina 0,25% (Trypsin EDTA) em cada frasco de cultura. Colocou-se em incubadora, a 37°C, com tensão de CO₂ de 5%, por 10 minutos.

A tripsina foi neutralizada com soro fetal bovino e colocou-se o líquido dos frascos com as células em tubo cônico de 50 ml (Falcon) para centrifugar por 10 minutos, a 1200 rpm. O meio foi aspirado e ressuspenderam-se as células na concentração desejada, no meio de cultura específico. Colocaram-se as células nos frascos de cultura, em incubadora, a 37°C, com tensão de CO₂ de 5%.

Em média, foram necessários 14 dias para se obterem quantidades suficientes de células (maior que 2,0 X 10⁶) Em cerca de 21 dias obteve-se uma quantidade de queratinócitos superior a 10,0 X 10⁶ necessária para enxerto. O restante dessas células foi congelado e outra parte permanecia em cultura para nova expansão na necessidade de novo enxerto, como observado na figura 3, a seguir.

As células podem ser congeladas em soro fetal bovino, com 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO – Sigma), em nitrogênio líquido, e mantidas assim por tempo indeterminado. Ao serem descongeladas, apresentam viabilidade entre 70 e 80%.

9.2.8- Preparação da Cola de Fibrina

Em 1972, foi descrito o sucesso do selante de fibrina, como um agente adesivo para o reparo de um nervo periférico. Desde então, muitos trabalhos vêm sendo descritos e o uso do selante tem se estendido a várias áreas da medicina, tanto por ser um agente hemostático tópico quanto por representar um sistema de liberação de drogas (Milne, 2004;

Moraes *et al.*, 1998). O selante de fibrina tem mostrado ser um excelente suporte para a cultura *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos, e pode melhorar a mobilidade celular em úlceras cutâneas, servindo como uma cobertura/curativo para o enxerto cutâneo em pacientes ulcerados (RADOSEVICH *et al.*; 1997).^{115,116,117}

Em cicatrização por segunda intenção, a cola de fibrina age na fase inicial do processo cicatricial, facilitando a progressão para as fases subseqüentes (Moraes *et al.*, 1998) e ainda, segundo RADOSEVICH e cols. (1997), a fibrina parece promover a angiogênese, crescimento de tecido local e reparo.^{116,117}

Um fator limitante para o uso de cola de fibrina é seu custo, uma vez que os produtos comercialmente disponíveis têm preços elevados.

Desta forma, outra vantagem da cola de fibrina autóloga é seu baixo custo, embora o paciente tenha que ir ao hospital para a coleta do sangue (MORAES *et al.*, 1998). Ao contrário dos adesivos sintéticos, o selante de fibrina derivado do plasma tem a vantagem significativa de ser biocompatível e biodegradável, sem induzir reações adversas ao tecido, como inflamação, reações de corpo estranho, necrose tecidual ou fibrose extensiva (RADOSEVICH *et al.*, 1997).^{116,117}

Foi coletado o volume de 40 ml de sangue total do próprio paciente em tubo de ensaio contendo citrato de sódio (3,8%) na proporção 9:1. Para a separação do plasma, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos.

Foi utilizada a técnica de precipitação com glicina para purificação do fibrinogênio, conforme padronizado no Laboratório de Cultura Celular da FCM-UNICAMP.

Quanto à trombina de origem humana (300-600 NIH-U/mL), diluiu-se na proporção 1:1 em cloreto de cálcio (TISSEEL VH-KIT / Baxter). Dilui-se uma parte desta solução para 9 de cloreto de cálcio a 30mM (FALANGA *et al.*, 2007).¹¹⁸

Alcançada a quantidade de células desejada, o doente era convocado, sua ulcera avaliada, a fim de se descartar presença de infecção local e ou sistêmica. Se livre de contaminação a área era então preparada, limpa com grande quantidade de solução salina.

Os queratinócitos autólogos, após seu descongelamento e preparo; juntamente com a cola de fibrina autóloga eram aspergidos sobre o leito da úlcera, sob técnicas assépticas, em regime ambulatorial, a forma do implante e ilustrada na figura 4.

O implante era protegido por um arcabouço plástico, a fim de evitar o contato direto do curativo com agentes que pudessem retirar o enxerto e possibilitar a limpeza da área e sua visualização diária. Figura 5

Figura 3 - Queratinócitos



Figura 4 - Implante



Figura 5 – Arcabouço



Após a aplicação do enxerto os doentes permaneciam em repouso por uma hora e em seguida eram liberados para casa; orientados a retornar semanalmente para avaliação da úlcera e seu registro, ou antes, em caso de necessidade e ou dúvida.

No dia do implante, como forma de acompanhamento mensurável da dor, os doentes eram avaliados quanto a dor através da aplicação do questionário o *Inventário de dor de Wisconsin*; instrumento utilizado para esse objetivo.

O mesmo questionário foi aplicado no final do tratamento, para se avaliar a melhora ou não desse sintoma. O questionário pode ser observado através do quadro 1, na seqüência.¹¹³

Quadro 1 - Inventário de dor de Wisconsim

Nome _____ Grupo I () Grupo ()		
Durante a vida, a maioria das pessoas apresenta dor de vez em quando (cefaléia , dor de dente). Você teve hoje alguma dor diferente dessas.		
1. sim 2. Não		
Marque sobre o diagrama , com um X , as áreas onde você sente dor e onde a dor é mais intensa .		
Partes do corpo	região (anterior , posterior ...)	
Cabeça -		
Pescoço		
Tronco		
Braços		
Pernas		
Circule o número que melhor descreve a pior dor que você sentiu nas últimas 24 horas		
Sem dor	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Pior dor imaginável
Circule o número que melhor descreve a dor mais fraca que você sentiu nas últimas 24 Hs		
Sem dor	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Pior dor imaginável
Circule o número que melhor descreve a média de sua dor		
Sem dor	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Pior dor imaginável
Circule o número que mostra quanta dor ocorre agora		
Sem dor	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Pior dor imaginável
Que tratamento ou medicações você está recebendo para dor?		
_____ Nas últimas 24hs , qual foi o grau de melhora proporcionado pelos tratamentos ou medicações.		
Circule a porcentagem que melhor mostra o alívio que você obteve.		
Sem alívio 0% 10% 20% 30% 40% 50% 60% 70% 80% 90% 100% alívio completo		
Circule o número que descreve como , nas últimas 24hs , a dor interferiu na sua		
Atividade geral		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Humor		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Habilidade de caminhar		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Trabalho		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Relacionamento com outras pessoas		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Sono		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente
Apreciar a vida		
Não interferiu	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Interferiu totalmente

A avaliação das úlceras era feita semanalmente durante um período de três meses, ou até sua cicatrização, quando ela se dava em período menor, com fotografias obtidas através de câmera fotográfica digital *Olimpus Camidea*.

Todas as úlceras foram medidas semanalmente, para avaliar sua evolução. Essa mensuração foi obtida através do programa *Dicom Works*, que consegue avaliar a área.

O reimplante de células dependeu da observação clínica e de possíveis perdas do enxerto inicial.

Realizado após 40 dias do inicial e repetido a cada 40 dias se necessário. Esse período foi escolhido, devido ao menor tempo de cicatrização da ulcera observado nesse estudo.

9.2.9. Avaliação Estatística

Foram utilizadas tabelas de frequências para as variáveis categóricas (Hipertensão, Hipertensão +Diabetes), estatísticas descritivas para as variáveis contínuas (Idade, IMC, etc...) por grupo.

Na comparação da variável porcentagem de echamento com relação aos fatores grupo e dias foi utilizado a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas, com transformação Rank, devido a não existência de normalidade dos dados, para diminuir a assimetria e variabilidade dos dados. Quando a diferença entre os fatores é significativa realiza-se testes de comparação múltipla (Teste de Tukey e Contraste) para identificar as diferenças. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p\text{-valor} \leq 0.05$.^{119,120}

10. RESULTADOS

10. RESULTADOS

Dos 25 doentes analisados quatro eram homens (16% do total) e 21 mulheres (84 % do total). Esse resultado era esperado, visto que a insuficiência venosa é uma doença que acomete uma quantidade maior de indivíduos do sexo feminino em relação ao masculino.

A doença é mais prevalente após a quarta década de vida, faixa etária essa, encontrada na totalidade dos doentes acompanhados, sendo que existe uma prevalência maior ainda em mulheres após a sexta década. É importante salientar também que essa faixa etária corresponde a um número elevado de recidivas de úlceras. A tabela 5 abaixo ilustra as medidas iniciais e finais obtidas no estudo.

Tabela 5 – Valores absolutos e percentuais iniciais e finais do estudo

GRUPO	ÚLCERA	Tamanho em cm ²													
		IMPLANTE 15 DIAS	% FECH/C30 DIAS	% FECH/C45 DIAS	% FECH/C60 DIAS	% FECH/C75 DIAS	% FECH/C90 DIAS	% FECH/O							
2	1	44,05	30,76	30,17	24,78	43,74	25,84	41,39	24,78	43,74	21,39	51,44	15,45	65	
2	2	5,57	4,89	12,2	3,85	30,87	3,38	39,31	2,14	61,57	1,65	70,37	1,99	64,3	
2	3	34,68	26,6	23,29	25,17	27,42	17,79	48,7	15,36	55,7	9,63	72,23	7,53	78,28	
2	4	20,05	18,88	5,83	17,93	10,57	14,87	25,83	10,35	48,37	7,32	63,49	6,97	65,2	
2	5	45,97	39,98	13,3	32,89	28,45	24,2	47,35	19,08	58,49	15,25	66,76	11,4	76	
2	6	16,83	14,87	11,64	10,17	39,57	8,59	48,96	4,52	73,14	3,87	77	0	100	
2	7	3,7	3,09	16,48	2,91	21,35	1,87	49,45	1,43	61,35	0,68	81,62	0,25	93,2	
2	8	16,2	15,96	1,48	13,72	15,3	9,69	40,18	5,67	65	1,89	88,33	0,67	95,8	
2	9	4,95	4,09	17,37	3,12	36,96	2,87	42,02	2	59,59	1,73	65,05	0,65	86,8	
2	10	1,5	1,23	18	1,01	32,66	0	0	0	0	0	0	0	100	
2	11	2,68	1,87	30,22	0,65	75,74	0	0	0	0	0	0	0	100	
2	12	2,11	1,99	5,68	0,55	72,36	0,24	87,93	0	0	0	0	0	100	
2	13	7,78	4,87	37,4	2,19	71,85	0	0	0	0	0	0	0	100	
2	14	4,32	2,89	33,1	0,76	82,32	0	0	0	0	0	0	0	100	
1	1	133,3	117,89	11,56	100,74	24,42	90,32	32,24	86,62	35,01	85,78	35,64	74,1	44,4	
1	2	84,11	79,22	5,81	75,87	9,79	68,83	18,16	64,63	23,16	61,05	27,41	55,62	33,87	
1	3	59,05	57,65	2,37	56,78	3,84	55,14	6,62	52,34	11,36	49,97	15,37	48,33	18,15	
1	4	7,66	7,23	5,61	6,98	8,87	5,99	21,8	4,87	36,42	3,45	54,49	2,56C	66,5	
1	5	2	1,54	23	1,39	30,5	0,61	69,5	0,43	78,5	0,23	88,5	0	100	
1	6	4,49	4	10,91	3,45	23,16	2,82	37,19	2,09	53,45	1,65	63,25	1,11	75,27	
1	7	26,92	23,89	11,25	20,98	22,06	18,92	29,71	16,65	38,15	14,67	49,27	9,85	63,4	
1	8	3,05	2,9	4,91	2,7	11,47	1,78	41,63	1,25	59,01	0,45	85,24	0	100	
1	9	4,07	4,05	0,49	3,98	2,21	2,87	29,48	1,63	59,95	0,75	81,57	0	100	
1	10	10,87	7,98	26,58	5,56	48,85	4,06	62,64	0	0	0	0	0	100	
1	11	2,1	1,88	10,47	0,92	56,19	0,42	80	0	0	0	0	0	100	

A análise estatística que avaliou as comorbidades como obesidade, hipertensão e diabetes, dos doentes analisados e não mostrou evidência de alterações no resultado final da cicatrização das úlceras.

Esses dados foram obtidos após a aplicação do Teste Exato de Fisher onde não se observaram alterações estatísticas significativas, como é mostrado a seguir através dos gráficos e do p-valor encontrado. Esses resultados são mostrados na tabela 6 a seguir

Tabela 6. Estatísticas descritivas das variáveis contínuas por grupo

GRUPO	N	Variável	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor (*)
1=s/medicação	11	IDADE	69.45	10.23	45.00	75.00	80.00	0.8902
		IMC	31.91	5.22	26.00	31.00	44.00	0.5249
		IMPLANTE	30.69	43.50	2.00	7.66	133.30	0.7843
2=c/medicação	14	IDADE	67.50	14.39	42.00	68.50	93.00	
		IMC	32.86	4.70	28.00	30.00	44.00	
		IMPLANTE	15.03	15.70	1.50	6.68	45.97	

(*) Teste de Mann-Whitney
medicação – Diosmina- 450mg + Hesperidina – 50 mg micronizada

Tabela 7 - Avaliação geral –Características gerais dos 25 pacientes

SEXO	21 MULHERES (84%)	4 HOMENS (16%)	
Hipertensão 11	Diabetes Mellitus 7	Hipertensão+ Diabetes 7	
VARIÁVEIS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MEDIANA
IDADE	68.36	12.52	74
IMPLANTE (ÚLCERA) CM²	21.92	31.38	7.66
IMC	32.44	4.86	31.00

Os resultados apontados nas tabelas acima (6 e 7), demonstram as variáveis encontradas durante o estudo, que poderiam influenciar nos dados obtidos.

A Hipertensão e o Diabetes Mellitus tipo II, presentes em indivíduos dos dois grupos não apresentaram qualquer influência nos resultados obtidos.

O Índice de Massa Corpórea (IMC), que avalia o grau de obesidade em cada indivíduo, variou entre os dois grupos e também não influenciou no resultado da cicatrização, como é possível observar nas tabelas 6.

Em relação à idade pode-se dizer que os grupos são homogêneos, ou seja, os doentes foram mesclados e então apresentavam idades variadas e semelhantes nos dois grupos. Para essa avaliação foi utilizado o Teste de Mann-Whitney, através do qual foi possível calcular a média em relação à idade e observar alguma diferença estatística. Esse teste retira as influências das medidas dispare para que os grupos possam ser comparáveis.

Estatisticamente foi determinado um valor para se classificar as úlceras entre pequenas e grandes, sendo esse número chamado de ponto de corte que foi de 7.66 cm², que é a mediana dos valores obtidos, ou seja, acima desse valor as úlceras eram classificadas como grandes e abaixo pequenas. Tabela 8

Tabela 8. Estatísticas descritivas da variável úlcera

N	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
25	21.92	31.38	1.50	7.66	133.30

O uso da mediana é considerado mais realista porque independente do tamanho da úlcera, considerando-se a porcentagem de fechamento, medida mais real porque independe do tamanho da úlcera, como é possível visualizar na tabela 9.

Tabela 9 . Estatísticas descritivas da variável porcentagem de fechamento, por dias

GRUPO	N	Dias	Média	D.P.	Mínimo	Mediana	Máximo
1- s medicação 11		FECH15	10.27	8.12	0.49	10.47	26.58
		FECH30	21.94	17.67	2.21	22.06	56.19
		FECH45	39.00	22.76	6.62	32.24	80.00
		FECH60	54.09	29.30	11.36	53.45	100.00
		FECH75	63.70	29.61	15.37	63.25	100.00
		FECH90	72.87	30.24	18.15	75.27	100.00
2- c/medicação 14		FECH15	18.30	11.09	1.48	16.93	37.40
		FECH30	42.08	23.77	10.57	34.81	82.32
		FECH45	62.22	28.13	25.83	48.83	100.00
		FECH60	73.35	21.71	43.74	63.29	100.00
		FECH75	81.16	16.88	51.44	79.31	100.00
		FECH90	87.47	14.67	64.30	94.50	100.00

Na comparação entre a porcentagem de fechamento em cada grupo, relativa aos períodos estudados (15, 30, 45, 60, 75, e 90 dias), foi utilizada a análise de variância (ANOVA), utilizada para avaliar medidas repetidas, como as realizadas em vários dias, ou seja, o mesmo indivíduo em vários momentos. A transformação Rank, foi realizada devido a não existência de normalidade dos dados, para diminuir a assimetria e variabilidade dos mesmos. Quando a diferença entre os fatores é significativa realizam-se testes de comparação múltipla (Teste de Tukey e Contraste) para identificar as diferenças. Tabela 10

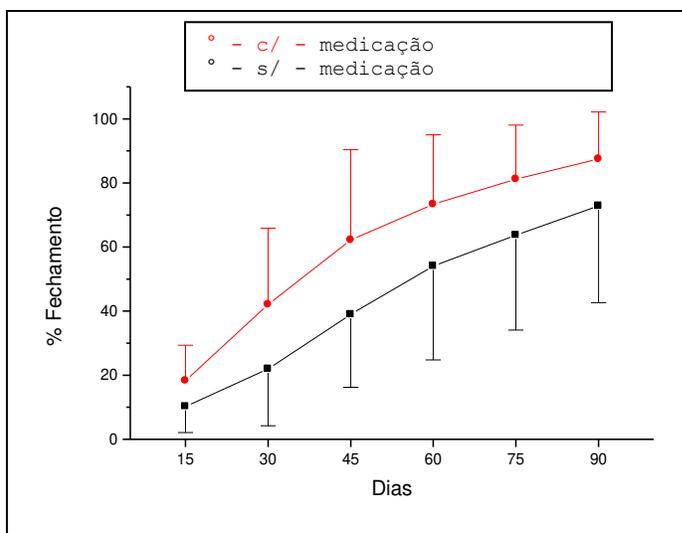
Tabela 10. Resultado da Anova para medidas repetidas (nos ranks) da variável porcentagem de fechamento

Fonte de Variação	p-valor
Grupo	0.0274
Dias	0.0001
Grupo*Dias	0.3596

A tabela acima mostra que os grupos são diferentes, que os dias de mensuração são diferentes e que não existe nenhuma interação entre eles.

Foi possível observar que ambos os grupos se comportam de maneira igual ao longo do estudo, sendo que o grupo com a medicação apresenta em todos os dias avaliados uma porcentagem maior de fechamento, como apresenta o gráfico 1, abaixo.

Gráfico1. Média e desvio padrão da variável porcentagem de fechamento por grupo e dias de acompanhamento.



◦ - c/ - medicação – Diosmina- 450mg + Hesperidina – 50 mg micronizada

◦ - s/ - medicação – Diosmina- 450mg + Hesperidina – 50 mg micronizada

Pode-se observar ao longo do estudo que a taxa de fechamento das úlceras foi influenciada pelo seu tamanho, ou seja, as menores fecharam em um tempo menor do que as maiores.

É possível afirmar ainda que, houve diferença entre os grupos quanto à velocidade de fechamento, observando que o grupo com a medicação, em todas as mensurações se comportou melhor em relação à porcentagem de fechamento. É possível avaliar esses dados através da tabela 11 abaixo.

Tabela 11 . Resultado da Anova para medidas repetidas (nos ranks) da variável porcentagem de fechamento

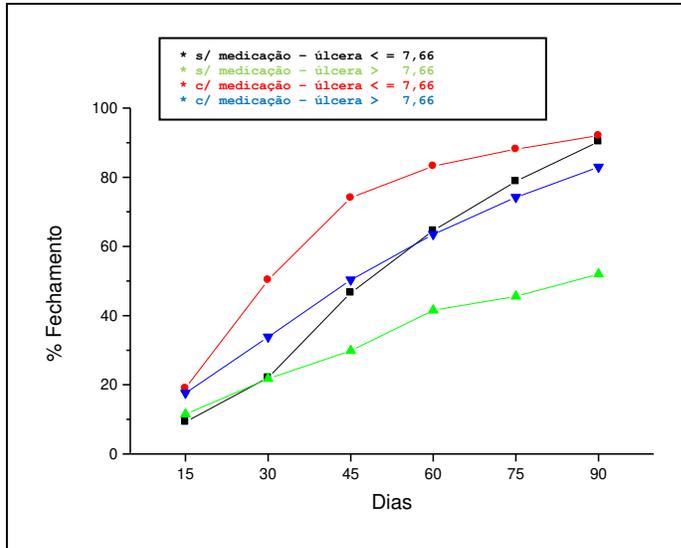
Fonte de Variação	p-valor
Hiper. ou diab.	0.4537
Implante >7.66	0.0309
Grupo	0.0240
Dias	0.0001
Dias*HiperDM	0.1837
Dias*Implante	0.0292
Dias*Grupo	0.3722

Salienta-se que a média da porcentagem de fechamento no grupo sem a medicação foi de 72, 87%, já no grupo onde foi dado o medicamento a porcentagem é de 87,47%, apresentando um diferencial de 14.6% entre os grupos.

O gráfico 2 a seguir demonstra a evolução das úlceras quanto ao seu tamanho. Os dois grupos estudados mostraram: úlceras pequenas (< 7.66 com a medicação; úlceras grandes (>7.66) com medicação, além de úlceras pequenas sem medicação e úlceras grandes sem medicação.

Esse gráfico demonstra que os grupos apresentam diferenciação desde o início tornando-se mais evidente a partir dos 45 dias.

Gráfico 2 – Evolução do fechamento das úlceras no período



* medicação – Diosmina- 450mg + Hesperidina – 50 mg micronizada

As tabelas 12 e 13, a seguir demonstram a média e o desvio padrão em relação à porcentagem de fechamento por grupo durante os dias de acompanhamento.

Tabela 12 - Teste de Tukey – Apresenta o comportamento dos gupos nos dias do estudo

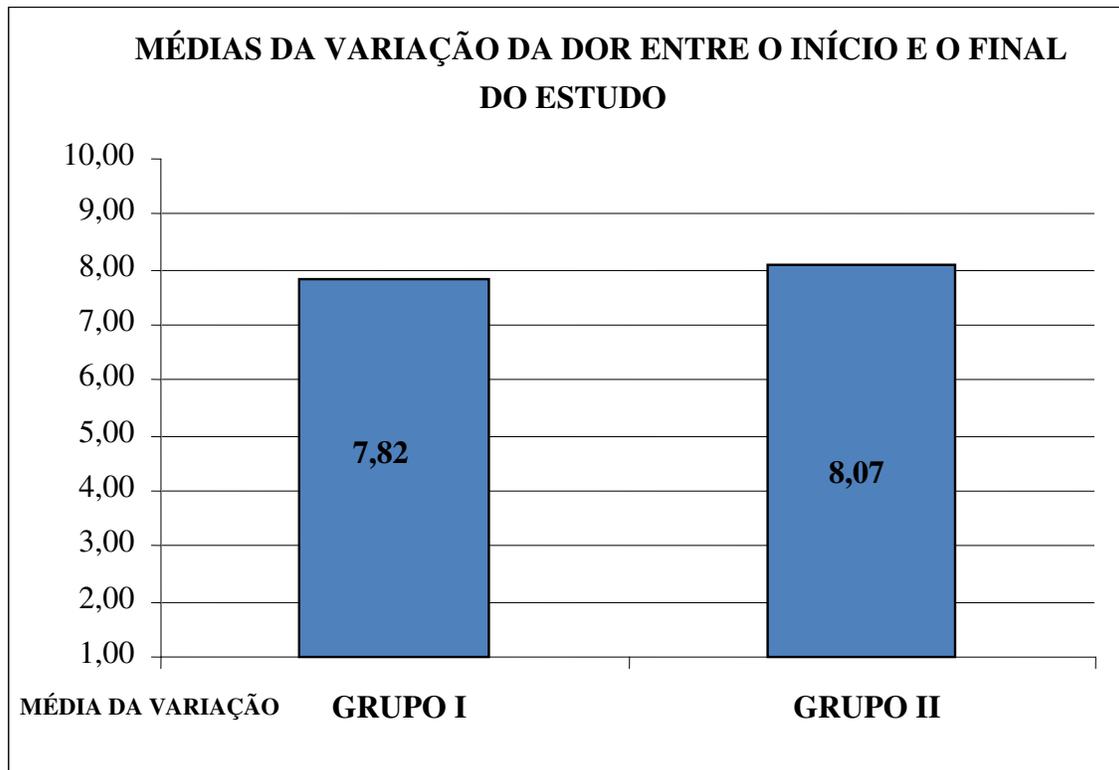
Comparação do Implante	Teste de Tukey (p <0.05)
Dia15	=
Dia30	=
Dia45	≠
Dia60	≠
Dia75	≠
Dia90	≠

Tabela 13- Teste de Contraste – comparação do fechamento entre os grupos

Comparação dos dias Teste de contraste	Implante <=7.66	Implante > 7.66
15 vs 30	0.0023	0.0080
15 vs 45	0.0001	0.0003
15 vs 60	0.0001	0.0003
15 vs 75	0.0001	0.0001
15 vs 90	0.0001	0.0001
30 vs 45	0.0005	0.0008
30 vs 60	0.0001	0.0004
30 vs 75	0.0001	0.0002
30 vs 90	0.0001	0.0001
45 vs 60	0.0004	0.0091
45 vs 75	0.0003	0.0012
45 vs 90	0.0003	0.0003
60 vs 75	0.0059	0.0031
60 vs 90	0.0029	0.0006
75 vs 90	0.0035	0.0185

Em relação à aplicação do Inventário de dor de Wisconsin foi observado que todos os pacientes apresentaram regressão semelhante na avaliação da dor, não existindo diferencial estatístico entre os grupos, p valor = 0,4718, apresentado no gráfico 3 a seguir.

Gráfico 3 – Médias da variação da dor entre o início e o final do estudo



As fotos a seguir demonstram alguns exemplos do acompanhamento e fechamento das úlceras venosas nos dois grupos avaliados.

Figuras 6 e 7 – Exemplos de cicatrização em pacientes do grupo sem o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada

Figura 6- Fotos Grupo 1

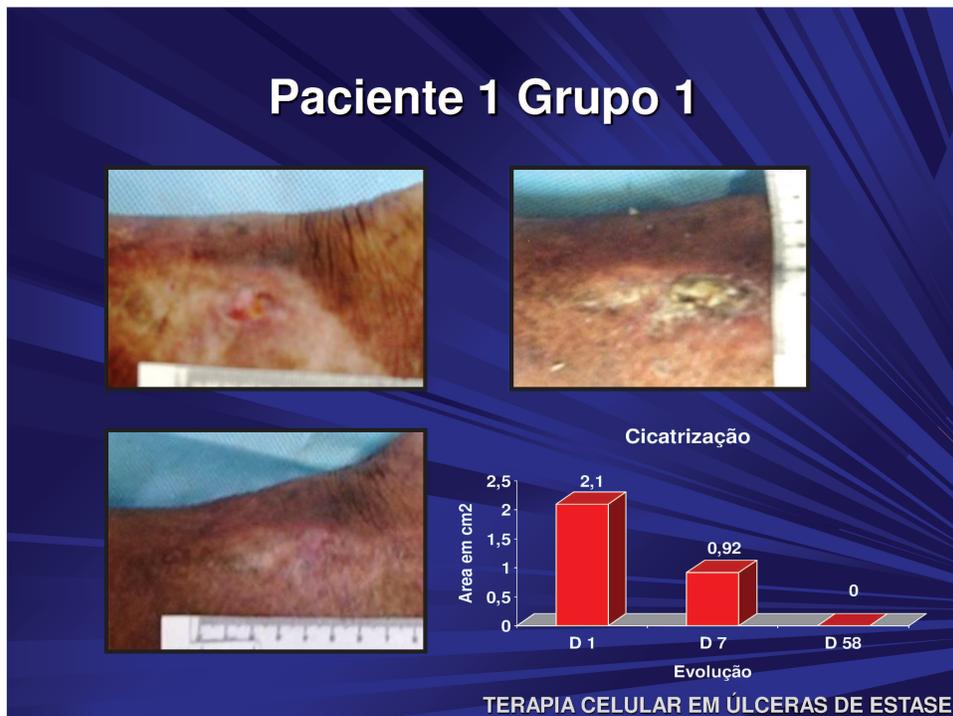


Figura 7 –Fotos Grupo 1



Figuras 8-9-10 e 11– Exemplos de cicatrização em paciente do grupo com o uso da Diosmina Hesperidina Micronizada

Figura 8- Fotos Grupo 2



Figura 9- Fotos Grupo 2



Figura 10- Fotos Grupo 2



Figura 11- Fotos Grupo 2



11. DISCUSSÃO

11.DISSCUSSÃO

O fechamento das úlceras venosas vem sendo um desafio constante para médicos e pacientes. Observamos que os vários tratamentos não são totalmente eficazes.

O investimento na busca de novas terapias para úlceras de perna crônicas, como terapias celulares, justifica-se no fato do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP- ser caracterizado como hospital de referência terciária, atendendo a população não só da região metropolitana de Campinas, mas de todo o estado de São Paulo e não raro do País. Torna-se relevante relatar que são atendidos aproximadamente 120 casos semanais de doentes vasculares em nosso ambulatório e que cerca de 20 % deles são casos de doença venosa.

Além disso, considerando os satisfatórios resultados clínicos iniciais obtidos com a terapia de queratinócitos na aceleração da cicatrização das úlceras cutâneas crônicas, significando um importante avanço em terapia celular, tanto na eficácia de sua utilização quanto na segurança, por se tratar de uma tecnologia totalmente autóloga em relação aos tipos celulares e também ao substrato de adesão celular (cola de fibrina), além do resgate da auto-estima desses pacientes.

Desde a antiguidade, inúmeras coberturas foram desenvolvidas para isolar o leito das úlceras, a fim de protegê-lo e abreviar o tempo de cicatrização. Nos dias de hoje, claro, que com materiais específicos, a idéia é a mesma. Devido a isso, uma quantidade enorme de curativos foram desenvolvidos, cada um com sua particularidade e especificação que visa nada mais, do que a breve cicatrização das lesões.

Curativos como o filme de poliuretano, são utilizados em úlceras e lesões superficiais, com pouca exsudação e necessitam de pele íntegra ao redor para sua aderência.

Os curativos com hidrocolóides são coberturas utilizadas em feridas que facilitam a angiogênese, estimulam o colágeno e o crescimento celular, dificultam o crescimento bacteriano e podem ser usados em feridas com mais exsudação, mas necessitam de trocas freqüentes, o que encarece o custo; do contrário podem macerar a pele ao redor da úlcera e levar a piora do quadro.^{21,25}

Os hidrogéis são ideais para áreas superficiais, que sofreram abrasão, como áreas doadoras de pele e ou queimaduras, mas não podem ser usados em feridas secretantes.

O carvão ativado associado à prata é excelente para úlceras contaminadas com grande quantidade de secreção, mas não pode ser utilizado para o tratamento de úlceras secas. O alginato, polissacarídeo derivado do ácido algínico e da alga laminaria, é não aderente, apresenta propriedades hemostáticas e pode ser moldado à úlcera, além de ser caro e pode piorar a lesão se retirado antes que sature completamente.^{21,25}

A descoberta de soluções antissépticas, a partir dos séculos XVIII e XIX e dos antibióticos no século XX e a introdução de técnicas limpas para o manejo das úlceras, diminuíram as complicações infecciosas que podiam levar portadores dessa afecção a amputações e mesmo morte.^{24,29,30}

Uma opção que não pode ser esquecida é o uso da pele cadavérica fresca ou armazenada e a pele animal. Elas tem seu uso quando se necessita de cobertura de grandes extensões agudamente. Além do risco de contaminação, que apesar de todos os esforços pode ocorrer, o problema é que a forte reação imunológica desenvolvida pelo receptor faz com que sejam descartadas rapidamente. É importante salientar o risco que essa reação pode provocar no receptor muitas vezes debilitado, principalmente quando nos referimos aos queimados.⁴⁵

Outra modalidade de cobertura do leito das úlceras são os enxertos.

Os enxertos de pele são utilizados com o objetivo de abreviar o tempo de cicatrização de úlceras limpas, já com tecido de granulação. Sabe-se que as melhores respostas se dão nos enxertos de pele parcial, por terem uma espessura menor e uma facilidade maior de aderência mas normalmente, dependem de uma área doadora extensa, o que pode expor o paciente a dor, desconforto e principalmente a um risco elevado de infecção.

Os resultados obtidos são, na maioria dos casos, bons com regressão da área cruenta da úlcera^{36,37,38,39,40,41}

Deve-se salientar, entretanto, que para a realização dos enxertos é necessária, quase sempre, internação hospitalar e serviço de anestesiologia, ocupando, as já escassas vagas hospitalares e de centro cirúrgico.

Devido a essas dificuldades, uma modalidade nova de fechamento para as úlceras vem sendo o emprego da bioengenharia tecidual, através da terapia celular. Seus primeiros passos foram dados no tratamento de queimados e a extrapolação para as úlceras de estase que vem apresentando bons resultados.

Buscou-se em nosso estudo o desenvolvimento de técnicas de cultivos celulares que possibilitam o tratamento ambulatorial, sendo que nos pacientes estudados, a área doadora de pele foi mínima, a coleta foi feita em sala limpa do ambulatório de Moléstias Vasculares Periféricas do HC – UNICAMP e os doentes liberados após a coleta.

É importante ressaltar, que são necessários também, cuidados extremos com a ferida, a fim de se evitar possíveis contaminações, o que, faria com que o enxerto fosse perdido, assim como todo o gasto empregado na sua confecção. Dentre esses cuidados podemos citar os serviços de enfermagem e o uso de antibioticoterapia.

Da mesma forma, em nosso estudo, no ato do implante, os doentes foram atendidos em regime ambulatorial; após a aplicação do auto-enxertos de queratinócitos, foram liberados, com orientações de manipulação doméstica do curativo, não necessitando em momento algum de internação.

Pode-se definir a terapia celular como algo que tenta restaurar a função de um órgão ou tecido, transplantando novas células para substituir as células perdidas pela doença, ou substituir células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético.

A cultura de células, uma das modalidades da terapia celular, pode ser definida como um conjunto de técnicas que permite cultivar ou manter células isoladas fora do organismo onde existem, mantendo as características próprias.

RHEINWALD E GREEN, em 1975 descobriram um método de cultivo de queratinócitos humanos sobre uma base de fibroblastos; desde então essa técnica vem sendo aprimorada oferecendo a oportunidade de tratamento de várias lesões de pele.⁷

As primeiras tentativas de se replicar os queratinócitos feitas por FREEMAN *et al.* (1976), esbarravam no suporte para o seu desenvolvimento; o uso de pele de porco sem a membrana basal, foi a opção encontrada que demonstrou ser uma escolha equivocada, pois as células epidérmicas não conseguiam a adesão necessária. 56 Em nosso estudo a base de aplicação feita com selante de fibrina mostrou-se adequada como leito para a migração dos queratinócitos.

O uso dos queratinócitos para a cicatrização de lesões vem sendo relatado a alguns anos. Existem relatos do seu uso para o tratamento de pacientes queimados e em portadores de hanseníase.

DETMAR *et al.*, 1995; relatam que a ação dos queratinócitos epidérmicos é a de promover um efeito mitogênico nas células endoteliais da microvasculatura dérmica através do VEGF secretado por eles . A modulação dos níveis de VEGF na epiderme pode acelerar e potencializar a vascularização da pele.⁸¹

Os primeiros relatos do uso de queratinócitos para o tratamento de úlceras vasculares datam da década de oitenta. O cultivo ainda novo feito a partir de doadores homólogos, apresentava baixa eficácia, com um custo alto e com risco de contaminações e rejeições, visto que eram células de outros indivíduos.

O desenvolvimento dos chamados equivalentes cutâneos que imitam a pele humana, são feitos através da combinação de uma matriz extracelular e sobre uma base de fibroblastos onde são colocados os queratinócitos de doadores sãos. Para o desenvolvimento dessa cultura é colocado soro bovino, o que aumenta as chances de contaminação, além disso, o custo para a confecção desse produto é muito elevado e os resultados não são tão brilhantes como o proposto.

É freqüente a presença de reações alérgicas aos chamados equivalentes cutâneos, quando aplicados em humanos e as dificuldades para se testar novas possibilidades vem sendo cada vez maiores, por necessitarem de modelo animal, o que torna o seu uso cada vez mais restrito.

O estudo realizado por POUMAY *et al.* e WELSS *et al.* (2004) comprovam essa versão, onde além das reações alérgicas o resultado final esperado não foi bom.^{94, 95}

Em nosso estudo foram utilizados queratinócitos do próprio paciente, o que aponta para um diferencial em relação a literatura consultada, pois o risco de rejeição e o/ou transmissão de doenças é nulo, fato esse que é citado pelos autores OBENG *et al.* e STHEFENSON *et al.*^{43,45}

Apesar dos estudos apresentados por KREMER *et al* e HUNT *et al* (2000), mostrarem que a aplicação dos equivalentes cutâneos apresentavam melhores resultados cosméticos que o enxerto puro de queratinócitos autólogos, em nosso estudo o resultado cosmético foi bastante satisfatório, não sendo observadas retrações ou hipertrofias cicatriciais.^{74,75}

YANNAS e BURKE (1980), YANNAS *et al.* (1980), DAGALAKIS *et al.* (1980) e BURKE *et al.* (1981), que idealizaram um equivalente dérmico composto por um filme de silicone denso e por uma esponja de colágeno, observaram que o silicone agia como uma barreira contra infecções. Em nosso trabalho, foram observados dois casos de infecção nos grupos estudados, mas que não representou alteração significativa ao estudo.^{70,71,72}

A aplicação do enxerto de queratinócitos foi feita em forma de spray, como o apresentado por NAVARRO *at als.* Esse processo facilita a colocação das células em todo o leito da úlcera, o que não ocorre com a colocação das bases tissulares de fibroblastos e queratinócitos, ou seja, áreas com relevos diferentes podem ser prejudicadas na aplicação.^{49,50}

Em relação ao uso do selante de fibrina, como relatado por HORCH *at als.* 65, observamos ser ideal para a aplicação do enxerto, pois serve de estrutura para a migração de mais queratinócitos da borda para o centro da ferida

Hoje, já se sabe que há permanência e/ ou integração do implante e ao longo do tempo a liberação das citocinas produzidas pelas células implantadas induzem a migração das células do hospedeiro.^{87,88,89,90}

O mecanismo de reparo observado, principalmente em nossos doentes (> 80 %) foi através do fechamento da ferida a partir das bordas para o centro, fato também observado pela maioria dos autores.

O custo do nosso implante não é desprezível, mas bem mais baixo que os equivalentes industrializados com matriz degradável, que necessitam substituição com frequência. Outra vantagem é que nossos queratinócitos são autólogos, isto é, provenientes do próprio paciente, fato não observado nos curativos, que são feitos com células de vários doadores. Além disso, nossas culturas celulares podem ser congeladas podendo ser utilizadas para nova aplicação, não necessitando, portanto, de nova doação da pele do paciente

No nosso estudo, retiramos dos pacientes fragmentos de pele de 0,5 a 1,0 cm. e em cerca de 2 semanas tínhamos quantidades de queratinócitos ao redor de $2,0 \times 10^6$. Em 3 semanas, tínhamos quantidades de queratinócitos por volta de 10×10^6 . Portanto, o método aqui apresentado fornece, através da replicação das culturas celulares convencionais, a possibilidade de se obter uma quantidade de queratinócitos, suficiente para a cobertura de úlceras muito maiores do que a área doadora inicial.

A literatura não cita, a maneira de evolução das úlceras, mas na observação clínica dos doentes foi constatado, que as úlceras que apresentavam crostas mais precoces eram as que respondiam melhor ao tratamento, fato esse devido a diminuição da fase inflamatória onde existe um aumento das citocinas que degradam os fatores de crescimento e dificultam a cicatrização.

Em relação aos dados de literatura o que podemos afirmar é que nossa técnica além de segura, pois não observamos nenhuma reação adversa em nossos pacientes,

permite a mobilidade do indivíduo, não necessita de internação hospitalar e a observação da evolução do tratamento da úlcera.

Em relação à aplicação do questionário de Wisconsin sabemos que se divide em duas partes. A primeira está relacionada à dor e a segunda à maneira como a dor influi na vida do paciente. A aplicação desse questionário no início e no final do acompanhamento demonstrou, independentemente do grupo a que o doente pertencia, que houve melhora significativa, em relação a dor e melhora da vida do paciente não existindo diferencial estatístico entre os dois grupos.

A Diosmina Hesperidina micronizada é um flebotônico largamente empregado no tratamento de doenças venosas desde as suas primeiras manifestações clínicas. Trabalhos feitos por BERGAN et al., NICOLAIDES et al., demonstram que seu uso diário na dose de 500 miligramas a cada doze horas diminuiu sensivelmente os sintomas, como a dor e o edema, além de proteger o endotélio venoso da lesão provocada pela degranulação leucocitária. Em nosso estudo foi possível observar essa melhora nos doentes usuários da droga.^{100,101,104}

O uso da Diosmina Hesperidina micronizada permitiu uma cicatrização das úlceras em tempo menor. Tal fato, deve-se a diminuição do processo inflamatório no leito venoso e melhora do mecanismo valvular, gênese da hipertensão venosa crônica, conseguindo assim auxiliar a cicatrização das úlceras.

A referência entre o que chamamos de úlceras grandes e pequenas, foi feita com base no cálculo da mediana, pois a referência sobre o tamanho da úlcera do que é considerado grande e o que é considerado pequeno não consta em literatura, ou seja, o que é considerado grande para alguns, para outros pode ser médio ou pequeno, tudo é feito a partir dos dados do observador.

No estudo é observado que as úlceras grandes e pequenas até o trigésimo dia de acompanhamento se comportam da mesma forma nos dois grupos, ou seja, a porcentagem de fechamento cresce nos dois grupos, mas observa-se que o grupo com a medicação sempre apresenta uma porcentagem de fechamento maior.

A partir do quadragésimo quinto dia é observada uma alteração na velocidade de fechamento das úlceras. As úlceras ditas menores começam a fechar mais rapidamente que as ditas maiores, independente do grupo observado. Entre as menores é vista velocidade maior de fechamento no grupo usuário de medicação.

As úlceras grandes são as que apresentam maior dificuldade no fechamento independente do grupo, mas é possível observar que esse é menor no grupo sem a medicação.

As úlceras que melhor responderam foram as pequenas com medicação, onde é possível observar diferencial estatístico.

Foi possível observar em ambos os grupos a regressão completa da dor após a aplicação do autoenxerto.

A necessidade de re aplicação ocorreu em casos isolados, sem diferencial estatístico. Foi realizado esse procedimento, nos casos onde houve perda do enxerto por descuido do doente o que ocorreu em um caso de cada grupo ou quando o tempo de cicatrização ou regressão do leito da úlcera ultrapassou o tempo de cicatrização da primeira ulcera do grupo, fato esse que ocorreu de forma semelhante nos dois grupos não havendo diferencial estatístico.

As dificuldades encontradas no estudo não podem ser esquecidas, as maiores dizem respeito ao próprio paciente. Lidamos com uma população de baixo nível sócio econômico/cultural e isso proporcionou algumas dificuldades principalmente no que diz

respeito ao próprio manejo do exerto; como a dificuldade de higienização local, a colocação de pomadas e unguentos; outro fato diz respeito a falta de meios para vir a consultas com a regularidade devida, tais relatos demonstram como a pesquisa clínica prospectiva é difícil em nosso país

12. CONCLUSÕES

12.CONCLUSÕES

Com base nas observações realizadas durante todo o acompanhamento dos doentes, foi possível extrair algumas conclusões.

1. Os implantes de culturas de queratinócitos autólogos mostraram ser uma boa opção terapêutica na cicatrização das úlceras venosas.
2. A aplicação dessa técnica, para cicatrização de úlceras venosas, não necessitou em nenhum momento de internação hospitalar, ao contrário do observado com os enxertos tradicionais. Como foi realizada em regime ambulatorial, nenhum dos doentes necessitou ser afastado do trabalho, durante o tempo de acompanhamento.
3. Em nenhum dos doentes foi observada rejeição, ao enxerto, ou qualquer reação adversa.
4. A adição da Diosmina 450mg + Hesperidina 50mg Micronizada, auxilia a diminuir o tempo de cicatrização final.
5. O grupo que utilizou a Diosmina 450mg + Hesperidina 50mg Micronizada, apresentou menor tempo de cicatrização independente do tamanho das úlceras.
6. As úlceras consideradas maiores sem o uso da Diosmina 450mg + Hesperidina 50mg Micronizada foram as que apresentaram resultados piores em relação as demais. As úlceras venosas consideradas menores, em uso da medicação foram as que apresentaram melhores resultados quanto á cicatrização.
7. A terapia celular com os queratinócitos autólogos mais o uso de Diosmina 450mg + Hesperidina 50mg Micronizada para a cicatrização das úlceras mostrou-se eficaz.

13.Abstract

13.Abstract

TREATMENT OF VENOUS STASIS ULCER, THROUGH CELL THERAPY WITH KERATINOCYTE AUTOGRAFT IN PATIENTS USERS OF MICRONIZED DIOSMIN AND HESPERIDIN.

Prospective randomization open clinical analysis to treatment of venous stasis ulcer, through cell therapy with keratinocyte autograft, compared in two, groups users or not of micronized diosmin and hesperidin.

Introduction: The venous stasis ulcer is the most severe complication of chronic venous insufficiency, affecting adults and keeping them away from work and from normal social life. **Objective:** To demonstrate a new therapeutic method for accelerating healing.

Methods: Twenty-five (25) patients with venous stasis ulcers, CEAP VI, who have not healed with conventional treatments were selected from the Clinic of Peripheral Vascular Diseases, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP – were treated with autograft keratinocytes, grown in the skin cell culture laboratory, CIPED-FCM – UNICAMP. They were divided into two groups, Group I-11 patients, 10 female and 1 male, Group II-14 patients, 11 female and 3 male. Both groups were treated with autograft keratinocytes on the clean ulcer bed, and group II, was also given a dose of micronized diosmin hesperidin every 12 hours. All the patients were asked to take a 30-minute rest in the Trendelenburg position for two hours of usual activity. **Results:** After the evaluation of data with statistics methods no parametric Healing and/or improvement of the ulcers with significant reduction of the bed in both groups were observed, with Group II obtaining precocious results.

Conclusion This method proves to be a good therapeutic option to help in the healing of stasis ulcers

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FERREIRA CS, SALES EA, GARRIDO MBM. Patologia e diagnóstico das varizes dos membros inferiores. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA, editores. Doenças vasculares periféricas. Rio de Janeiro: Medsi; 1995. p. 951-974.
2. GARRIDO M. Varizes tronculares primárias dos membros inferiores: considerações anatômicas. Cir Vasc Angiol 1996;12 (4 supl):5-8.
3. MAFFEI, F.H.A.; LASTÓRIA, S.; YOSHIDA, W.B.; ROLLO, H.A.; GIANINI, M.; MOURA, R. Insuficiência Venosa Crônica Diagnóstico e Tratamento Clínico. (cap.129). In: Silva, M.C. Doenças Vasculares Periféricas. 4ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2008. p.1804 – 1814.
4. Managed Care and Chronic Wounds .December 2009 - Volume 22 - Issue 12pp: 542-584
5. MAYER W, JOCHMANN W, PARTSCH H . Varicoseulcer :healing in conservative therapy. A prospective study. Wien-Med Wochenschr.1994 ; 144 : 250-252
6. FIGUEIREDO M. Úlceras varicosas. In: Pitta GBB, Castro AA, Burihan E, editores. Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA; 2003.

7. RHEINWALD J, GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-344.
8. FONT J, BRAUT-BOUCHER F, PICHON J, NOEL-HUDSON MS, MURIEL MP, BONNET M et al. A new three-dimensional culture of human keratinocytes: optimization of differentiation. *Cell Biol Toxicol* 1994; 10: 353-9.
9. ABBADE LPF, LASTÓRIA S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol*. 2006;81(6):509-22.
10. BOSS W. K.; USAL H.; FODOR P. B.; CHERNOFF G. Autologous cultured fibroblasts: a protein repair system. *Ann Plast Surg*, 44(5): 536-42, 2000.
11. BOLÍVAR- FLORES Y. J.; KURI-HARCUCH W. Frozen allogeneic epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. *Dermatol Surg*, 25(8): 610-7, 1999.
12. TERSKIKH V. V.; VASILIEV A. V. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int Rev Cytol*, 188: 41-72, 1999.
13. AUGER F. A.; ROUABHIA M.; GOULET F.; BERTHOD F.; MOULIN V.; GERMAIN L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Med Biol Eng Comput*, 36(6): 801-12, 1998.

14.MOLL I.; HOUDEK P.; SCHMIDT H.; MOLL R. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 111: 251-8, 1998.

15.COULOMB B.; LEBRETON C.; DUBERTRET L. Influence of dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol*, 92: 122-5, 1989.

16. BORANIC M.; JAKIC-RAZUMOVIC J.; STANOVIC S.; KLJENAK A.; FATTORINI I. Skin cell culture: utilization in plastic surgery and laboratory studies. *Lijec Vjesn*, 121(4-5): 137-43, 1999.

17.TAUBE M. B.;TAÏBE A. Lipid metabolism in cultured keratinocytes.*An Bras Dermatol*, 75(1): 75-84, 2000.

18.WATT F. M. The epidermal keratinocyte. *Bioessays*, 8(5): 163-7, 1988.

19.ECKERT R. L.; CRISH J. F.; ROBINSON N. A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol Rev*, 77: 397-424, 1997.

20. JANSSON K.; Haegerstrand A.; Kratz G. A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human in vivo wound healing. *Scand J Plast Reconstr Hand Surg*, 35(4): 369-75, 2001

21. BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004.
22. CESARETTI I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. *Pelle Sana* 1998;2:10-2.
23. SCARBOROUGH J. On medications for burns in classical antiquity. *Clin Plast Surg*, 10(4): 603-10, 1983.
24. ARTZ C. P. História das Queimaduras. In: Artz C. P.; Moncrief J. A.; Pruitt JR B. A. *Queimaduras*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1980. p.1-13.
25. ANDRADE MNB, SEWARD R, MELO JRC. Curativos. *Rev Méd Minas Gerais* 1992;2(4):228-36.
26. AMBROISE PARÉ, *Anatomie Universelle du Corps Humain*
27. HOMANS J. The operative treatment of varicose veins and ulcers, based upon a classification of these lesions. *Surg Gynecol Obstet* 1916 ; 22 : 143-58
28. LUCCAS GC, Tratamento da ulcera de estase dos membros inferiores com bota de unna domiciliar. Seguimento de pacientes. *Cir Vasc Angiol* 1990; 6:23-5.
29. CHOEN, F.N. *Scientific American* 250, 1984, 128-137.

30. STINNETT, S. Women in Statistics: Sesquicennial The American Statistician, Activities, 44 (2) (1990), 74 -80.
31. MAYER W, JOCHMANN W, PARTSCH H. Varicose ulcer: healing in conservative therapy: a prospective study. Wien-Med Wochenschr 1994;144(10-11):250-2.
32. VOWDEN K, VOWDEN P. Anatomy, physiology and venous ulceration. J Wound Care 1998;7(7Suppl):suppl 1-5.
33. LODOVICI O. Fatores locais que interferem sobre a cicatrização. In: Netto AC. Clínica cirúrgica. São Paulo: Sarvier; 1994. p. 139-44.
34. YAMADA BFA. Terapia tópica de feridas: limpeza e desbridamento. Rev Esc Enf USP, 1999;33:133-40.
35. AHCPR - Agency for Health Care Policy and Research - Clinical practice Guideline No 3 Pressure ulcers in adults: prediction and prevention -U.S. Department of Health and Human Services. Publication no. 92-0047, May, 1992.
36. YAMADA BFA. Úlceras venosas. In: Jorge SA, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu; 2003. p.247-59.

37. TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA T. Wound biology and healing. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2008;41 (3): 259-64.
38. NELSON EA, BELL-SYER SEM, CULLUM NA. Compression for preventing recurrence of venous ulcers. *Cochrane Library*.2003;1.
39. BOWSZYC J, SILNY W, BROWSZYC-DMOCHOSKA M, KAZMIEROWSKI M, BEN-AMER HM, GARBOWSKA T, HARDING E. Comparison of two dressings in the treatment of venous leg ulcer. *J Wound Care* 1995; 4(3):106-10.27. Evaluation of dermal irritancy potential of Carboxymethyl-chitosan hydrogel and poly-(acrylic acid) chitin hydrogel. *J Med Assoc Thai*;90(4):724-9, 2007 Apr.
40. Clinical performance of a hydrogel dressing in chronic wounds: a prospective observational study *J Wound Care*;16(3):133-6, 2007 Mar. 0969-0700
41. Treatment of chronic skin ulcers in the elderly. Descriptive study on the use of a hydrocellular dressing, *Rev Enferm*;21(244):51-60, 1998 Dec
42. YAMAGUSHI Y, HOSOKAWA K, KAWAI K, INOUE K, MIZUNO K, TAKAGI S, et al. Involvement of Keratinocyte activation phase in cutaneous graft healing: Comparison of fullthickness and split-thickness skin Grafts. *Dermatol Surg*. 2000;26:463-8.
43. STEPHENSON AJ, GRIFFITHS WR, LA HAUSSE-BROWN TP. Patterns of contraction in human full thickness skin grafts. *Br J Plast Surg*. 2000;53:397-402

44. RUSZCZAK Z, SCHWARTZ RA. Modern aspects of wound healing: an update. *Dermatol Surg.* 2000;26:219-29.
45. OBENG MD, MCCAULEY RL, BARNETT JR, HEGGERS JP, SHERIDAN K, SCHUTZLER SS. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. *Burns.* 2001;27:267-71.
46. VON MANGOLDT F. apud HORCH R. E.; BANNASCH H.; KOPP J.; ANDREE C.; STARK G. B. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplantation*, 7(3): 309-17, 1998.
47. EAGLE H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130:432-37. 1959.
48. COULOMB, B., LEBRETON, C AND DUBERTRET, L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J. Invest. Dermatol.* 92:122-125,
49. ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WATSON, JD (1997). *Biologia Molecular da Célula.* 3ª ed. Porto Alegre/RS: Editora Artes Médicas.
50. TOM STRACHAN, ANDREW P. READ HUMAN: Molecular Genetics; BIOS Scientific Publishers Limited; 1996; USA

51. REHDER, J; SOUTO, LUÍS R M; ISSA, C M B M; PUZZI, M B. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis SAo Paulo med. j;122(1):22-25, Jan.-Feb. 2004. ilus.
52. SLAVKIN H.C.; PANAGIS J.S.; KOUSVELARI E. Future opportunities for bioengineering research at the National Institutes of Health. *Clin Orthop*, 367:S17-30, 1999
53. BILLINGHAM R. E.; REYNOLDS J. apud HERSON M. R.; MATHOR M. B.; ALTRAN S.; CAPELOZI V. L.; FERREIRA M. C. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. *Artif Organs*, 25(11): 901-6, 2001.
54. PRUNIÉRAS M. To reconstitute skin: theme and variations. *Matrix*, 11: 302-5, 1991. SCHULTHEISS D.; BLOOM D. A.; WEFER J.; JONAS U. Tissue engineering from Adam to the zygote: historical reflections. *World J Urol*, 18(1): 84-90, 2000.
55. PRUNIÉRAS M.; RÉGNIER M.; WOODLEY D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*, 81(1 Suppl): 28s-33s, 1983.
56. FREEMAN A. E.; IGEL U. J.; HERMANN B. J.; KLEINFELD K. L. Growth and Characterization of human skin epithelial cell cultures. *In Vitro*, 12: 352-62, 1976.
57. RÉGNIER M.; PRUNIÉRAS M.; WOODLEY D. Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. *Front Matrix Biol*, 9: 4-35, 1981.

58. BESSOU S.; SURLÈVE-BAZEILLE J. E.; SORBIER E.; TAÏEB A. Ex vivo reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. *Pigment Cell Res*, 8(5): 241-9, 1995.

59. HOELLER D.; HUPPERTZ B.; ROOS T. C.; GUTIÉRREZ P. P.; MERK H. F.; FRANK J. et al. An improved and rapid method to reconstruct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. *Exp Dermatol*, 10(4): 264-71, 2001.

60. RÉGNIER M.; STAQUET M. J.; SCHMIDT D.; SCHMIDT R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. *J Invest Dermatol*, 109: 510-2, 1997.

61. RÉGNIER M., PATWARDHAN A.; SCHEYNIUS A.; SCHMIDT R. Human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med Biol Eng Comput*, 36(6): 821-4, 1998.

62. RONFARD V.; BROLY H.; MITCHELL V.; GALIZIA J.P.; HOCHART D.; CHAMBON E. et al. Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns*, 17(3): 181-4, 1991.

63. HORCH R. E.; BANNASCH H.; KOPP J.; ANDREE C.; STARK G. B. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant*, 7(3): 309-17, 1998.

64.LAM, P.K.; CHAN, E.S.; YEN, R.S.; LAU, H.C.; KING, W.W. A new system for cultivation of Keratinocytes on acellular human dermis with the use of fibrin glue and 3T3 feeder cells. *J Burn care Rehabil* 21(1 Pt 1): 1-4, 2000

65. HORCH R. E.; BANNASCH H.; STARK G. B. Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. *Transplant Proc*, 33(1-2): 642-4, 2001.

66.RONFARD V.; RIVES J. M.; NEVEUX Y.; CARSON H.; BARRANDON Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation*, 70(11): 1588-98, 2000.

67. YANNAS I. V.; BURKE J. F.; GORDON P. L.; HUANG C. Collagen like membranes for synthetic skin. *Ger Offen*, 263: 1909, 1977.

68.YANNAS I. V.; BURKE J. F. Design of an artificial skin: I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res*, 14(1): 65-81, 1980.

69.YANNAS I. V.; BURKE J. F.; GORDON P. L.; HUANG C.; RUBENSTEIN R. H. Design of an artificial skin: II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res*, 14(2): 107-32, 1980.

70. DAGALAKIS N.; FLINK J.; STASIKELIS P.; BURKE J. F.; YANNAS I. V. Design of an artificial skin: III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res*, 14(4): 511-28, 1980.

71. BURKE J. F.; YANNAS I. V.; QUINBY W. C. Jr., BONDOC C. C.; JUNG W. K.. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, 194(4): 413-28, 1981.

72. BURKE J. F. Observation on the development of artificial skin. *J Trauma*, 23: 543-51, 1983.

73. KIM B. M.; SUZUKI S.; NISHIMURA Y.; UM S. C.; MOROTA K.; MARUGUCHI T. et al. Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. *Br J Plast Surg*, 52(7): 573-8, 1999.

74. KREMER M.; LANG E.; BERGER A. C. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents (composite-skin) of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra™ Artificial Skin). *Br J Plast Surg*, 53(6): 459-65, 2000.

75. HUNT J. A.; MOISIDIS E.; HAERTSCH P. Initial experience of Integra in the treatment of post-burn anterior cervical neck contracture. *Br J Plast Surg*, 53(8): 652-8, 2000.

76. GALASSI G.; BRUN P.; RADICE M.; CORTIVO R.; ZANON G. F.; GENOVESE P. et al. Degradation studies of the HA-based supporting scaffold. *Biomaterials*, 21: 2183-91, 2000.
77. YOUNG D. M.; GREULICH K. M.; WEIER H. G. Species-specific in situ hybridization with fluorochrome-labeled DNA probes to study vascularization of human skin grafts on athymic mice. *J Burn Care Rehabil*, 17: 305-10, 1996.
78. BOYCE S. T. Cultured skin substitutes: a review. *Tissue Eng*, 2: 255-66, 1996.
79. SUPP A. P.; WICKETT R. R.; SWOPE V. B.; HARRIGER M. D.; HOATH S. B.; BOYCE S. T. Incubation of cultured skin substitute in reduced humidity promotes cornification in vitro and stable engraftment in athymic mice. *Wound Repair Regent*, 7(4): 226-37, 1999.
80. FRANK S.; HÜBNER G.; BREIER G.; LONGAKER M. T.; GREENHALGH D. G.; WERNER S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 270: 12607-613, 1995.
81. DETMAR M.; YEO K. T.; NAGY J. A.; VAN DE WATER L.; BROWN L. F.; BERSE B. et al. Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, 105: 44-50, 1995.

82. STEWART J. E.; WHEATLEY D. N.; HOLMES J. D.; MUIR I. F. Purification and identification of a human dermal extract component inhibitory to fibroblast proliferation. *Cell Biol Internat*, 25: 607-12, 2001.

83. MA J.; WANG H.; HE B.; CHEN J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neofetal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 22: 331-36, 2001.

84. EL-SHEEMY M. A.; MUIR I. F.; WHEATLEY D. N.; EREMIN O. Inhibition of the contraction of collagen gels by extracts from human dermis. *Cell Biol Int*, 25(7): 635-42, 2001.

85. MA J.; WANG H.; HE B.; CHEN J. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neofetal dermal fibroblasts. *Biomaterials*, 22: 331-36, 2001.

86. JOHNNEN C.; KAGE A.; OECHEL A.; NEUHAUS P.; GERLACH J. C. Investigation on reconstruction of skin for autologous transplantation. *Transplant Proceed*, 33: 618-9, 2001.

87. FALANGA V.; MARGOLIS D.; ALVAREZ O.; AULETTA M.; MAGGIACOMO F.; ALTMAN M. et al. Healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. *Arch Dermatol*, 134: 293-300, 1998.

88. PHILLIPS T. J. New skin for old; developments in biological skin substitutes. *Arch Dermatol*, 134: 344-9, 1998.
89. FALANGA V. Tissue engineering in wound repair. *Adv Skin Wound Care*, 13: 15-29, 2000.
90. FALANGA V.; ISAACS C.; PAQUETTE D.; DOWNING G.; KOUTTAB N.; BUTMARC J. et al. Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. *J Invest Dermatol*, 119(3): 653-60, 2002.
91. RADHIKA M.; BABU M.; SEHGAL P. K. Cellular proliferation on desamidated collagen matrices. *Comp Biochem Physiol*, 124(C): 131-9, 1999.
92. STOCK U. A.; VACANTI J. P. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*, 52: 443-51, 2001.
93. PONEC M.; GIBBS S.; PILGRAM G.; BOELSMA E.; KOERTEN H.; BOUWSTRA J. et al. Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 14 (Suppl 1): 63-71, 2001.
94. WELSS T., BASKETTER D. A.; SCHRÖDER K. R. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol in vitro*. 18(3): 231-43, 2004.

95. POUMAY Y.; DUPONT F.; MARCOUX S.; LECLERCQ-SMEKENS M.; HERIN M.; COQUETTE A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res*, 296(5): 203-11, 2004.
96. EHRLICH H. P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. *Am J Surg*, 187(5A): 29s-33s, 2004.
97. MARGULIS A.; ZHANG W.; GARLICK J. A. In vitro fabrication of engineered human skin. *Methods Mol Biol*, 289: 61-70, 2004.
98. NAVSARIA H. A.; OJEH N. O.; MOIEMEN N.; GRIFFITHS M. A.; FRAME J. D. Reepithelialization of a full-thickness burn from stem cells of hair follicles micrografted into a tissue-engineered dermal template (Integra). *Plast Reconstr Surg*, 113(3): 978-81, 2004.
99. GRAGNANI, A., SOBRAL, CS. e FERREIRA, LM. Termolisina no isolamento de queratinócitos cultivados humanos. *Braz. J. Biol.*, fev. 2007, vol.67,no.1,p.105-109.
100. BERGAN, JJ., GEERT W. SCHMID, S., PHILIP D. COLERIDGE S., D.M., ANDREW N. NICOLAIDES, M.S., MICHEL R., EKLOF B. *Chronic Venous Disease V.* 355, p. 488-498, n. 5, 2006

101. NICOLAIDES A, ALLEGRA C, BERGAN J, et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol.* 2008;27: 1-59.

102. KISTNER, R.L. Eklof B, Masuda EM. Forum Diagnosis of chronic venous disease of the lower extremities: the CEAP classification. *Mayo Clin Proc* 1996;71(4):338-45

103. BRAND FN, DANNENBERG AL, ABBOTT RD, KANNEL WB. The epidemiology of varicose veins: the Framingham Study. *Am J Prev Med.* 1988;4:96-101.

104. NICOLAIDES A, ALLEGRA C, BERGAN J, et al. Management of chronic venous disorders of the lower limbs. Guidelines according to scientific evidence. *Int Angiol.* 2008;27: 1-59.

105. Wright DDI, Franks PJ, Blair SD, Backhouse CM, Moffatt C, McCollum CN. Oxerutins in the prevention of recurrence in chronic venous ulceration: randomised controlled trial. *Br J Surg.* 1991;78:1269-1270.

106. RAMELET AA, BOISSEAU MR, ALLEGRA C, ET AL. Veno-active drugs in the management of chronic venous disease. An international consensus statement: current medical position, prospective views and final resolution. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2005;33:309- 319.

107. COLERIDGE-SMITH P, LOK C, RAMELET AA. Venous leg ulcer: a meta-analysis of adjunctive therapy with micronized purified flavonoid fraction. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2005;30:198-208

108. LABS KH, DEGISCHER S, GAMBA G, JAEGER KA. Effectiveness and safety of calcium dobesilate in treating chronic venous insufficiency: randomized, doubleblind, placebo-controlled trial. Phlebology. 2004;19:123-130.

109. MASUDA EM, KISTNER RL. Long-term results of venous valve reconstruction: a four to twenty-one year follow-up. J Vasc Surg. 1994;19:391-403.

110. NICOLAIDE, AN. From symptoms to leg edema: Efficacy of PMFF 500mg. Angiology 54(1).33-34,2003.

111. LYSENG WILLIARNSON, KA; PERRY C.M. Fraccion flavonóica purificada micronizada. Revision de su uso em la insuficiencia venosa cronica, las ulceras venosas y las hemorroides . Drugs 2003;63:71-100

112. GUILHOU JJ, DEREURE O, MARZIN L, OUVRY P, ZUCCARELLI F, DEBURE C, et al. Efficacy of Daflon 500 mg in venous leg ulcer healing: a double-blind, randomized, controlled versus placebo trial in 107 patients. Angiology. 1997;48:77-85.

113. INVENTÁRIO DE DOR WISCONSIN. In: PAIN, v.17, p. - . , 1983.

114. GONZÁLEZ, M.N. Apreciación crítica de un artículo relacionado con un índice o cuestionario utilizado para medir la calidad de vida / Critical appreciation of the related article with a index or available questionnaire for measurement of quality of life. Arch. Reumatol., v. 6, p. 13-16, 1995.

115. MILNE, A.A. Clinical impact of fibrin sealants. Vox Sanguinis, v.87, suppl.2, p.S29-S30, 2004.

116. MORAES, A.M.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J.M.; ROSSI, A.B.R. Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery: application of skin graft and second intention healing. Revista Paulista de Medicina, v.116, n.4, p.1747-1752, 1998.

117. RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H.A.; BURNOUF, T. Fibrin Sealant: Scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. Vox Sanguinis, v.72, p.133-143, 1997.

118. FALANGA, V.; IWAMOTO, S. ET AL. Autologous Bone Marrow-Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds. Tissue Engineering, v.13, n.6, p. 1299- 1312, 2007.

119. Milliken, George A. (1984), Analysis of Messy Data. New York: Van Nostrand Reinhold Company. Total de páginas: 473.

120. Montgomery, D. C. (1991), *Design and Analysis of Experiments*. New York: John Wiley & Sons, 3rd ed. Total de páginas: 649. Anova nos ranks pag 127