

**MARCELO MATTOS E DINATO**

**TERAPIA CELULAR COM IMPLANTES AUTÓLOGOS DE  
CÉLULAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS EM  
ÚLCERAS CUTÂNEAS DE PACIENTES DIABÉTICOS**

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2010**

**MARCELO MATTOS E DINATO**

**TERAPIA CELULAR COM IMPLANTES AUTÓLOGOS DE  
CÉLULAS DÉRMICAS E EPIDÉRMICAS EM  
ÚLCERAS CUTÂNEAS DE PACIENTES DIABÉTICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, na área de concentração Dermatologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi

**CAMPINAS**

**Unicamp**

**2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Rosana Evangelista Poderoso - CRB-8ª / 6652

D61t      Dinato, Marcelo Mattos e  
Terapia celular com implantes autólogos de células dérmicas e epidérmicas em úlceras cutâneas de pacientes diabéticos / Marcelo Mattos e Dinato. Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Maria Beatriz Puzzi  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Diabetes Mellitus*. 2. Pé diabético. 3. Células - Cultura e meios de cultura. I. Puzzi, Maria Beatriz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Tissue therapy with epidermal and dermal culture cells for diabetic foot ulcers**

**Keywords:** • *Diabetes Mellitus*

- Diabetic foot
- Cells-Culture and culture media

**Titulação: Mestre em Clínica Médica**

**Área de Concentração: Dermatologia**

**Banca examinadora:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Beatriz Puzzi**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Engelbretch Zantut**

**Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Marco Andrey Cipriani Frade**

**Data da defesa: 18-11-2010**

---

# Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Marcelo Mattos e Dinato

---

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Puzzi

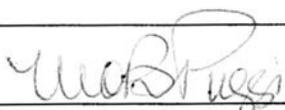
---

---

## Membros:

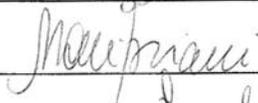
---

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Puzzi



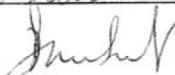
---

2. Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade



---

3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 18/11/2010

---

## DEDICATÓRIA

---

Aos meus Pais,  
razão maior desta obra.

À Roseli,  
minha esposa,  
amor da minha vida.

À Monique,  
minha vida!

## AGRADECIMENTOS

---

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Meu reconhecimento especial:

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Beatriz Puzzi, minha exímia orientadora, exemplo de dedicação e coragem, por toda a acolhida durante estes anos em que tive o privilégio de compartilhar momentos únicos em uma das maiores universidades do Brasil e do Mundo, a UNICAMP.

À Dra. Jussara Rehder, que desprendeu de seu tempo pessoal em prol de minha pesquisa, com Excelência em seu trabalho.

À Dra. Fabiana Regina Xavier Batista, engenheira, pelo apoio e oportunas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Ney Romiti, o qual conduziu toda a minha formação profissional, exemplo de conduta e dignidade, que muitas vezes extrapolou o magnífico professor que é para atuar com afetividade paterna. Meu reconhecimento e agradecimento.

À Fundação Lusíada, através do magnífico Senhor Reitor Dr. Nelson Teixeira, pela confiança depositada desde o início de minha formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Mauro César Dinato, chefe do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Guilherme Álvaro e Coordenador do Curso de Medicina da UNILUS, pelo amor infinito como Pai e Professor renomado.

Ao Instituto de Análises Clínicas de Santos, na pessoa do Prof. Dr. Luis Antonio da Silva, por abrir as portas de seu laboratório para a pesquisa sem fins lucrativos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lopes Mattos e Dinato, Chefe do Departamento de Clínica Médica do Centro Universitário Lusíada, por ser ao mesmo tempo Parte e Todo deste trabalho, sempre presente.

Ao Prof. Dr. Alberto de Macedo Soares, por elucidar mecanismos para que o sonho deste projeto se tornasse realidade.

Aos infectologistas Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Rocha Veiga, pelos sábios e certos ensinamentos sobre resistência bacteriana.

À Dr<sup>a</sup>. Roseli de Oliva Dinato, por caminhar lado a lado comigo, na busca incessante da excelência na medicina.

À Márcia de Freitas, pelo imprescindível auxílio na realização desta obra.

À Suzana Vieira e à Maria do Socorro, pela prestimosa ajuda durante esta pesquisa.

Ao meu irmão Ricardo, pela contribuição intelectual nas suas diversas áreas de conhecimento.

Ao Antonio Ignácio Júnior, pela sua incansável cooperação na assessoria computacional.

Ao Prof. Mestre Fernando Kauffmann Barbosa, pela sua imprescindível contribuição na análise estatística.

À Rose Margareth Silvestre, exemplo de ser humano, minha gratidão.

Aos funcionários da subfrota do HGA pela disponibilidade e ajuda no transporte do material biológico para Campinas.

Aos pacientes, objetivo principal deste estudo, pela confiança, respeito, amizade e, sobretudo, por terem acreditado no tratamento e na cura.

*"A razão da existência é  
o exercício da função útil,  
no ponto que o meio precisa."*

*"O trabalho é tudo.  
É tudo no relativo e  
é tudo no Absoluto".*

Dr. Celso Charuri

# RESUMO

Grande parte das úlceras diabéticas em extremidades inferiores tem difícil cicatrização, representando a causa mais comum de amputação não traumática no mundo. Para pacientes sem resposta à terapêutica clássica como desbridamentos, curativos e antibioticoterapia sistêmica, pode ser excelente indicação a terapia celular. O propósito deste estudo foi avaliar a eficácia de implantes autólogos de células da pele (fibroblastos e queratinócitos) cultivadas "in vitro" e aplicadas com cola de fibrina autóloga em úlceras cutâneas crônicas de 5 pacientes diabéticos (4 DM2 e 1 DM1) com diagnóstico variando de 9 a 34 anos. Foram tratadas 6 úlceras de 4,0 a 36,62 cm<sup>2</sup> de tamanho com duração de 4 meses a 20 anos, localizadas em membros inferiores, sem resposta a diversos tratamentos convencionais. Observou-se cicatrização completa em 5 úlceras (83,3%) entre 21 e 120 dias, sendo que a média dos Índices de Cicatrização das Úlceras (ICU) foi de 62%, 75%, 78% e 83%, no 30º; 60º; 90º e 120º dias de evolução, respectivamente. Existe uma correlação entre a velocidade de cicatrização, o tamanho da úlcera e o seu tempo de duração. Não ocorreram reações adversas decorrentes do tratamento. Concluiu-se que, a terapia celular (queratinócitos-fibroblastos) associada à cola de fibrina autóloga mostrou-se uma opção terapêutica eficaz, autóloga, de realização ambulatorial minimamente invasiva que acelerou significativamente o processo de cicatrização das úlceras diabéticas crônicas.

**Palavras-chave:** *Diabetes Mellitus*. Pé diabético. Terapia celular autóloga. Cultura de células.

# **ABSTRACT**

A great part of diabetic ulcers on the lower extremities have difficult healing and represent the most common cause of amputation worldwide. For patients unresponsive to the classical therapy with debridement, dressings and systemic antibiotic therapy, cell therapy may be an excellent indication. The objective of this study was to assess the efficacy of autologous skin cell (fibroblasts and keratinocytes) implants cultivated in vitro and applied with autologous fibrin glue to chronic skin ulcers of 5 diabetic patients (4 DM2 and 1 DM1) who had been diagnosed between 9 and 34 years before. There were 6 ulcers from 4.0 to 36.62 cm<sup>2</sup> in size, with onset between 4 months and 20 years before, located on the lower limbs and unresponsive to several conventional treatments. Complete healing was observed in 5 ulcers (83.3%), after 21 to 120 days and the average of ulcer healing indices (UHI) were 62%, 75%, 78% and 83%, on the 30th, 60th, 90th and 120th days, respectively. There is a correlation between healing time, ulcer size and duration. No adverse reactions derived from the treatment occurred. It was concluded that cell therapy (keratinocytes, fibroblasts) associated with autologous fibrin glue proved to be an effective therapeutic option, minimally invasive and performed on an outpatient basis, that has significantly accelerated the healing of chronic diabetic ulcers.

**Key words:** *Diabetes Mellitus*. Diabetic foot. Autologous tissue therapy. Cell culture.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

<b>DM</b>	Diabetes melito
<b>DM1</b>	Diabetes melito tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes melito tipo 2
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>LASER</b>	luz amplificada e estimulada por emissão da radiação
<b><i>in vitro</i></b>	em vidro
<b><i>in vivo</i></b>	dentro do vivo
<b>et al</b>	e outros
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>n°</b>	número
<b>HGA</b>	Hospital Guilherme Álvaro
<b>Fig(s).</b>	Figura(s)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás carbônico
<b>HAS</b>	Hipertensão arterial sistêmica

## LISTA DE NOTAÇÕES

---

<b>%</b>	porcentagem
<b>≥</b>	maior ou igual
<b>mg/dl</b>	miligrama(s) por decilitro
<b>g</b>	grama(s)
<b>≤</b>	menor ou igual
<b>&lt;</b>	menor
<b>mmHg</b>	milímetro(s) de mercúrio
<b>®</b>	marca registrada
<b>XX</b>	vinte
<b>cm<sup>2</sup></b>	centímetro(s) quadrado(s)
<b>&amp;</b>	e
<b>cm</b>	centímetro(s)
<b>°C</b>	grau(s) Celsius
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>h</b>	hora(s)
<b>min</b>	minuto(s)
<b>mM</b>	milimolar

<b>UI</b>	unidades internacionais
<b>mL</b>	mililitro(s)
<b>mg</b>	miligrama(s)
<b>mg/d</b>	miligrama(s) por dia
<b>UI/d</b>	unidades internacionais por dia
<b>±</b>	mais ou menos

## LISTA DE FIGURAS

---

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Esquema do implante autólogo.....	73
<b>Figura 2</b>	Técnica de separação dermo-epidérmica.....	74
<b>Figura 3</b>	Esquema de cultura de células dérmicas e epidérmicas.....	74
<b>Figura 4</b>	Esquema de cultura de queratinócitos.....	75
<b>Figura 5</b>	Esquema de cultura de fibroblastos.....	76
<b>Figura 6</b>	Viabilidade celular.....	76
<b>Figura 7</b>	Esquema de enxertia.....	77
<b>Figura 8</b>	Técnica do curativo.....	78
<b>Figura 9</b>	Ilustração.....	79
<b>Figura 10</b>	Cultura primária.....	83
<b>Figura 11</b>	Cultura de queratinócitos.....	84
<b>Figura 12</b>	Cultura de fibroblastos.....	85
<b>Figura 13</b>	Após 30 minutos do implante.....	86
<b>Figura 14</b>	Intensa exsudação e neovascularização.....	86
<b>Figura 15 A</b>	Caso 1: pré- tratamento.....	88
<b>Figura 15 B</b>	Caso 1: dia 15.....	88

<b>Figura 15 C</b>	Caso 1: dia 30.....	89
<b>Figura 15 D</b>	Caso 1: dia 45.....	89
<b>Figura 15 E</b>	Caso 1: dia 60.....	90
<b>Figura 16 A</b>	Caso 2: pré-tratamento.....	92
<b>Figura 16 B</b>	Caso 2: dia 30.....	92
<b>Figura 16 C</b>	Caso 2: dia 60.....	93
<b>Figura 16 D</b>	Caso 2: dia 90.....	93
<b>Figura 16 E</b>	Caso 2: dia 120.....	94
<b>Figura 17 A</b>	Caso 3: pré-tratamento.....	96
<b>Figura 17 B</b>	Caso 3: dia 7.....	96
<b>Figura 17 C</b>	Caso 3: dia 21.....	97
<b>Figura 17 D</b>	Caso 3: dia 40.....	97
<b>Figura 18 A</b>	Caso 4: pré-tratamento.....	99
<b>Figura 18 B</b>	Caso 4: dia 7.....	99
<b>Figura 18 C</b>	Caso 4: dia 20.....	100
<b>Figura 18 D</b>	Caso 4: dia 50.....	100
<b>Figura 18 E</b>	Caso 4: dia 90.....	101
<b>Figura 18 F</b>	Caso 4: dia 120.....	101
<b>Figura 19 A</b>	Caso 5: pré-tratamento.....	103

<b>Figura 19 B</b>	Caso 5: dia 40.....	103
<b>Figura 19 C</b>	Caso 5: dia 60.....	104
<b>Figura 19 D</b>	Caso 5: dia 80.....	104
<b>Figura 19 E</b>	Caso 5: dia 98.....	105

## LISTA DE QUADROS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1</b> Características clínicas dos 5 casos estudados.....	107
<b>Quadro 2</b> Características das úlceras dos 5 casos estudados.....	108
<b>Quadro 3</b> Contaminação bacteriana das úlceras diabéticas dos 5 casos estudados.....	109

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1</b> Resultados em cm <sup>2</sup> do tamanho das úlceras nos tempos 0 (no dia do implante) e 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias (após o dia do implante), nos casos 1, 2, 3 e 4 .....	112

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xix
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	45
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	59
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	65
<b>3.1- Objetivo geral</b> .....	67
<b>3.2- Objetivo específico</b> .....	67
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	69
<b>4.1- Aspectos éticos</b> .....	71
<b>4.2- Casuística</b> .....	71
<b>4.3- Critérios de inclusão</b> .....	71
<b>4.4- Critérios de exclusão</b> .....	71
<b>4.5- Critérios diagnósticos e laboratoriais</b> .....	72
<b>4.6- Coleta do material (área doadora)</b> .....	72
<b>4.7- Técnica de preparação do material no laboratório</b> .....	73
<b>4.8- Enxertia (área receptora)</b> .....	77
<b>4.9- Curativo</b> .....	78

<b>4.10- Relação entre o tamanho e o tempo de cicatrização das úlceras.....</b>	<b>79</b>
<b>4.11- Análise estatística.....</b>	<b>80</b>
<b>5- RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
<b>5.1- Técnicas laboratoriais.....</b>	<b>83</b>
5.1.1- Preparação do concentrado celular.....	83
5.1.2- Cultura para queratinócitos.....	84
5.1.3- Cultura para fibroblastos.....	84
<b>5.2- Procedimento cirúrgico na área doadora.....</b>	<b>85</b>
<b>5.3- Procedimento nas áreas receptoras.....</b>	<b>85</b>
<b>5.4- Identificação e história clínica.....</b>	<b>87</b>
5.4.1- Idade.....	109
5.4.2- Sexo.....	109
5.4.3- Tempo de duração do DM.....	109
5.4.4- Tempo de duração das úlceras.....	110
5.4.5- Comorbidades.....	110
5.4.6- Hábitos.....	110
5.4.7- Localização das úlceras.....	110
5.4.8- Tamanho das úlceras.....	110

5.4.9- Contaminação bacteriana das úlceras.....	111
5.4.10- Tempo e índice de cicatrização das úlceras.....	111
5.4.11- Relação entre o tamanho e o tempo de cicatrização das úlceras.....	111
<b>6- DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>7- CONCLUSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>9- ANEXOS.....</b>	<b>133</b>
9.1- Anexo 1- Aprovação do comitê de ética.....	135
9.2- Anexo 2- Declaração sobre os procedimentos do estudo.....	137
9.3- Anexo 3- Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos..	139
9.4- Anexo 4- Termo de consentimento livre e esclarecido.....	141
<b>10- APÊNDICES.....</b>	<b>143</b>
10.1- Apêndice 1- Ficha controle.....	145
10.2- Apêndice 2- Orientações.....	147

# 1- INTRODUÇÃO

Diabetes melito (DM) é importante problema de saúde pública mundial, afetando 5 a 10% da população e diminuindo a qualidade de vida dos indivíduos afetados, devido às significativas complicações micro e macroangiopáticas que acarreta<sup>1,2,3,4</sup>.

Trata-se de doença metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação de insulina ou ambos<sup>5</sup>. Em 1997<sup>6</sup>, a associação americana de diabetes publicou novos critérios para diagnóstico e classificação da doença, que serão listados abaixo. Em 2003<sup>7</sup>, adicionou o conceito de glicemia de jejum alterada e em 2010<sup>8</sup>, a hemoglobina glicada (Hb1Ac) foi acrescentada como um dos parâmetros para o diagnóstico do diabetes.

#### **Classificação do diabetes melito<sup>5,6,7,8,9</sup>:**

- 1- Diabetes melito tipo 1 (DM1):** resultante da destruição da célula beta pancreática, que usualmente leva a deficiência absoluta de insulina.
  
- 2- Diabetes melito tipo 2 (DM2):** resultante de um defeito secretório de insulina progressivo e resistência à insulina em tecidos periféricos.
  
- 3- Outros tipos específicos de diabetes** devido a outras causas, como defeitos genéticos na função da célula beta, defeitos genéticos na função da insulina, doença do pâncreas exócrino (como fibrose cística) e induzido por drogas (como no tratamento de AIDS ou após transplantes de órgãos).
  
- 4- Diabetes melito gestacional** (diabetes diagnosticado durante a gravidez).

É importante referir que 90 a 95% de todos os diabéticos são classificados como tipo 2<sup>5</sup>.

A patogênese do DM2 é complexa e envolve a interação de fatores genéticos e ambientais. Dos fatores ambientais se destacam a obesidade e estilo de vida sedentário. Do ponto de vista fisiopatológico, indivíduos com este tipo de diabetes apresentam, de um modo geral, 3 anormalidades fundamentais: resistência a ação da insulina em tecidos periféricos como músculo, gordura e fígado; defeito na secreção de insulina, particularmente em resposta ao estímulo com glicose e aumento da produção hepática de glicose<sup>10</sup>.

O DM1 é doença crônica, caracterizada pela destruição imunomediada progressiva das células beta das ilhotas pancreáticas, o que provoca secreção insuficiente de insulina. Os fatores imunogenéticos e ambientais associados ao DM1 ainda não foram completamente esclarecidos<sup>11</sup>.

#### **Critérios diagnósticos do diabetes melito<sup>5,6,7,8,9</sup>:**

- 1- Glicemia plasmática de jejum  $\geq 126$ mg/dl (confirmada em uma segunda coleta em outro dia); ou
- 2- Sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso) e uma glicemia plasmática casual (colhida a qualquer hora do dia sem relação com as refeições)  $\geq 200$ mg/dl; ou
- 3- Glicemia plasmática 2 horas após sobrecarga de glicose (75g de glicose dissolvida em água via oral)  $\geq 200$ mg/dl;
- 4- Hb1Ac  $> 6,5\%$ .

A curva glicêmica não é recomendada de rotina; deverá ser utilizada para avaliar pacientes com fatores de risco para diabetes, que apresentem glicemia plasmática de jejum normal ou alterada (pré-diabetes)<sup>5,9</sup>.

Durante a evolução desta endocrinopatia, podem surgir complicações crônicas, as quais são caracterizadas por alterações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença coronariana, doença oclusiva arterial periférica e doença oclusiva arterial cerebral)<sup>9,12,13</sup>.

O diagnóstico do DM1 é estabelecido imediatamente após o início da hiperglicemia e são necessários muitos anos de descompensação metabólica para ocorrerem tais complicações. Já o DM2, em geral, não é identificado precocemente na população diabética (em média levam de 5 a 7 anos entre a instalação e o diagnóstico da doença), o que induz ao aumento da ocorrência das graves manifestações descritas. Estas complicações estão associadas ao estilo de vida (sedentarismo, consumo de álcool e cigarro), outras doenças de natureza metabólica (dislipidemia e obesidade) e hemodinâmica (hipertensão arterial)<sup>10</sup>.

O atual Consenso Americano recomenda a manutenção da hemoglobina glicada  $\leq 7,0\%$  como alvo terapêutico para a maior parte dos portadores de diabetes<sup>8,9</sup>.

Devido ao fato da hemoglobina glicada refletir a média da glicemia dos últimos 3 meses, ela tem um valor preditivo elevado para as complicações do diabetes. Condições que afetam o eritrócito (hemólise, perda sanguínea) e variantes da hemoglobina devem ser levadas em consideração, principalmente quando os valores da hemoglobina glicada não se correlacionam com a situação clínica<sup>5,9</sup>.

De acordo com os membros do “The Advanced Collaborative Group”<sup>14</sup>, o tratamento intensivo do DM2, mantendo a hemoglobina glicada a valores de 6,5%, promoveu redução relativa no evento combinado macro e microvascular, principalmente devido à nefropatia.

Por outro lado, Saydah et al.<sup>12</sup> revelaram que somente 37% dos adultos com diabetes atingem níveis de hemoglobina glicada  $< 7\%$ , somente 36% apresentam pressão arterial  $< 130/80\text{mmHg}$  e apenas 48% têm colesterol total

<200mg/dl. Mais preocupante é que somente 7,3% dos doentes diabéticos atingem as 3 metas de tratamento.

Entre todas as complicações do DM destaca-se o pé diabético<sup>10,15,16</sup>, cuja definição<sup>16</sup> utilizada pelo Grupo de Trabalho Internacional do Pé Diabético e adotada pela Organização Mundial de Saúde é: “O pé diabético é situação de infecção, ulceração ou também destruição dos tecidos profundos dos pés, associada a anormalidades neurológicas e vários graus de doença vascular periférica nos membros inferiores”.

Em 5 a 15% dos pacientes diabéticos desenvolvem-se úlceras cutâneas nas extremidades inferiores, particularmente nos pés, as quais são complicações importantes causadas por alterações vasculares e neurológicas, em combinação com infecções oportunistas persistentes e cicatrização deficiente<sup>2,4,15,17</sup>. Estudos mostram que 1% deles já foram submetidos à amputação<sup>10</sup>.

O risco de amputação é 15 a 46 vezes maior nos diabéticos do que nos não diabéticos; e que representam a causa mais comum de amputação de extremidade inferior não traumática no mundo industrializado<sup>18</sup>.

Assim, os portadores da doença devem ser orientados quanto aos cuidados diários necessários com esta região do seu corpo, visando à prevenção destas complicações. Também, obrigatória é a realização de um exame médico minucioso dos pés, para eventual identificação de fatores de risco para a ocorrência de ulcerações, ou até mesmo, amputação<sup>9</sup>.

Destacam-se os seguintes fatores de risco<sup>9</sup>:

- Amputação prévia,
- Antecedente de úlcera no pé,
- Neuropatia periférica,
- Deformidades dos pés,
- Doença vascular periférica,
- Alterações visuais,

- Nefropatia diabética (principalmente pacientes em diálise),
- Mau controle glicêmico,
- Fumantes.

Em relação à neuropatia, devem ser ressaltadas as alterações sensitivas, motoras e autonômicas<sup>13,15</sup>:

- 1- Neuropatia sensitiva:** perda da sensibilidade tátil, térmica, dolorosa e proprioceptiva. A úlcera surge por falta de percepção aos pequenos traumas ou queimaduras.
- 2- Neuropatia motora:** atrofia e fraqueza da musculatura intrínseca do pé, causando flexão e deformação dos dedos, interfere na deambulação. Com isto, ocorre aumento da pressão em determinadas áreas, como nos metatarsos e dedos, favorecendo a formação de calos e perfurações.
- 3- Neuropatia autonômica:** diminuição da sudorese, ressecamento e fissuras na pele. A perda do reflexo simpático provoca dilatação pré-capilar com aumento do fluxo sanguíneo nas comunicações arteriovenosas, seguida pelo aumento da pressão venosa e diminuição do fluxo capilar na pele, com consequente edema. Esta sequência de eventos aumenta o risco de infecção e isquemia.

Por outro lado, a vasculopatia em geral está associada à neuropatia<sup>13,15</sup>.

A maior parte das úlceras que ocorrem em diabéticos são neuropáticas ou neuroisquêmicas. Porém, algumas vezes, na doença vascular periférica poderá surgir úlcera dolorosa puramente isquêmica (menos de 15% dos casos), devido à redução do fluxo sanguíneo. Apesar da neuropatia e isquemia serem os principais agentes causais da ulceração e amputação em diabéticos, geralmente ocorre a atuação de um fator ambiental desencadeante, como sapatos apertados, traumas ou queimaduras.

O espessamento da membrana basal e o edema do endotélio capilar causados pela microangiopatia diabética, quando associados a traumas poderão resultar em oclusão total das artérias (macroangiopatia diabética), resultando em gangrena da extremidade.

Já as infecções no pé diabético podem ser de origem polimicrobiana (fúngicas e bacterianas)<sup>13,15</sup>.

Nas infecções superficiais predominam os germes Gram positivos (*S. aureus* e *S. epidermidis*), enquanto nas lesões mais profundas, os Gram negativos (*E. coli*, *Proteus* e *Pseudomonas*) e os anaeróbicos. Devido às alterações vasculares locais, a resposta inflamatória pode estar comprometida; além disso, muitas vezes, as lesões não são identificadas pelos pacientes por longos períodos, evoluindo para comprometimento de tecidos profundos chegando a osteomielite, gangrena e necessidade de amputação.

Para classificar as úlceras de membros inferiores em pacientes diabéticos, foram desenvolvidos alguns sistemas como as Classificações de Wagner e a da Universidade do Texas<sup>13</sup>.

## Sistemas de classificação de úlceras diabéticas

### Classificação de Wagner

<b>Grau</b>	<b>Características</b>
<b>0</b>	Sem lesão. Pé de alto risco (deformidades, calos e insensibilidade).
<b>1</b>	Úlcera superficial, sem envolvimento de tecidos adjacentes.
<b>2</b>	Úlcera mais profunda, com envolvimento de tendões.
<b>3</b>	Úlcera profunda, com comprometimento ósseo (osteomielite).
<b>4</b>	Gangrena localizada (dedos, calcanhar).
<b>5</b>	Gangrena de todo o pé.

### Classificação da Universidade do Texas

<b>Estágio</b>	<b>Grau 0</b>	<b>Grau1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Grau 3</b>
<b>A</b>	Pele íntegra	Úlcera superficial	Úlcera profunda com acometimento de tendão e cápsula	Úlcera profunda com acometimento ósseo ou articular
<b>B</b>	+ Infecção	+ Infecção	+ Infecção	+ Infecção
<b>C</b>	+ Isquemia	+ Isquemia	+ Isquemia	+ Isquemia
<b>D</b>	+ Infecção e Isquemia	+ Infecção e Isquemia	+ Infecção e Isquemia	+ Infecção e Isquemia

Estratégias urgentes devem ser instituídas para melhor controle do pé diabético. Alguns autores são da opinião que a criação de equipes multidisciplinares com capacitação de profissionais da área médica é de grande relevância, pois muitos doentes não têm informações adequadas ao autocuidado e poucos têm os seus pés examinados nas consultas<sup>4</sup>. Ressalta-se que seu tratamento exige significativo custo financeiro para a sociedade e, além disso, diabéticos com úlceras nos pés têm duas vezes mais mortalidade do que aqueles com pés saudáveis<sup>3,4</sup>.

Assim, é necessário o controle clínico-laboratorial rigoroso dos níveis glicêmicos e dos pés diabéticos, sendo que uma terapêutica mais efetiva para as úlceras diabéticas é imperativa<sup>3</sup>. Classicamente, indicam-se antibióticos tópicos para o controle da infecção e desbridamento para a remoção de tecidos necróticos, além de curativos oclusivos. Também, são citados o uso de carvão ativado e prata, sulfadiazina de prata, fitoterápicos, fatores de crescimento exógeno, biopolímeros do látex da seringueira, oxigênio hiperbárico, estimulação elétrica e irradiação (LASER)<sup>3,17,19,20</sup>.

Porém, diante da resposta insatisfatória dos procedimentos rotineiros ou convencionais, estratégias avançadas advindas do progresso da biotecnologia de materiais e culturas de células, como o uso de enxertos de pele e implantes de células, podem ser excelente opção para o diabetólogo<sup>17,18,21,22</sup>.

Sabe-se que, a pele lesada se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescentes<sup>23</sup>. A cicatrização das úlceras consiste de uma sequência de eventos celulares e moleculares, como inflamação, proliferação e remodelação<sup>1,20,24</sup>.

A inflamação depende de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos) e da fibronectina (sintetizada por fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais). Esta adere simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando como cola<sup>24</sup>.

A proliferação se inicia pela reepitelização, na qual ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas da úlcera. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio. Em seguida ocorre a fibroplasia, importante na formação do tecido de granulação, o qual depende do fibroblasto que produz colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico. Por último, a angiogênese, essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização<sup>1,20,24</sup>.

Na sequência surge a contração da ferida, que é o movimento centrípeto de suas bordas<sup>24</sup>.

Finalmente, há a remodelação que é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz, do eritema e da neovasculatura<sup>20,24</sup>.

No entanto, muitos fatores podem interferir neste complexo processo, tanto os de ordem local quanto geral, como o DM<sup>24</sup>.

Por outro lado, com o desenvolvimento da biologia molecular e da engenharia de tecidos, observou-se que, para se obter tecidos complexos em laboratório, visando ajudar na cicatrização, era necessário reproduzir “*in vitro*” condições encontradas “*in vivo*”<sup>25</sup>.

KIM et al. (1999) sintetizaram um substituto artificial de pele utilizando uma esponja de colágeno, na qual foram injetados fibroblastos e semeados queratinócitos. O sistema foi mantido em interface ar-líquido. Após 5 dias, haviam cerca de 10 camadas de queratinócitos e os fibroblastos ocuparam todo o interior da esponja<sup>26</sup>.

Stock e Vacanti (2001) confirmaram que as melhores perspectivas para a obtenção de tecidos complexos em laboratórios é o uso de matrizes biodegradáveis que serviriam 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<sup>27</sup>.

Assim, já existem alguns substitutos dérmicos utilizados para cobertura de áreas cutâneas ulceradas, como por exemplo: Biobrane<sup>®</sup>, Dermagraft<sup>®</sup>, Alloderm<sup>®</sup>, Integra<sup>®</sup>, MySkin<sup>®</sup>, que consistem em biomateriais como colágeno, ácido hialurônico, silicone, derme cadavérica, etc., onde podem ser semeadas culturas de queratinócitos ou fibroblastos. Também são encontrados equivalentes de epidermes como EpiSkin<sup>®</sup> e EpiDerm<sup>®</sup>, e equivalentes de pele humana (derme e epiderme) como EpiDerm FT<sup>®</sup>, utilizado principalmente para testar drogas e cosméticos, e Apligraf<sup>®</sup> (dupla membrana consistindo de matriz de colágeno bovino com fibroblastos neonatal e epitélio estratificado contendo queratinócitos), utilizado no tratamento de úlceras cutâneas<sup>21,25,28</sup>.

Rehder et al (2004) demonstraram um método de obtenção de epiderme humana reconstruída “*in vitro*”, equivalente histologicamente à epiderme “*in vivo*”, utilizando queratinócitos e melanócitos cultivados sobre uma derme humana morta desepidermizada. Este estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Células da Pele da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas<sup>29</sup>.

Ainda no referido laboratório, SOUTO et al (2006) descreveram um modelo de pele humana reconstruída “*in vitro*”, composta de derme e epiderme associadas, histologicamente semelhante à pele humana “*in vivo*”. Com a utilização de matriz de colágeno, foi possível reproduzir a partir da cultura de fibroblastos humanos, uma derme humana reconstruída “*in vitro*”. Sobre essa derme, através de cultura de queratinócitos e melanócitos humanos, forma-se uma epiderme diferenciada, o que leva à formação de uma pele humana reconstruída “*in vitro*”. Este modelo difere dos equivalentes de pele acima descritos, pois contém melanócitos na epiderme e derme humana reconstruída com os próprios fibroblastos produzindo o colágeno, possibilitando enxertos autólogos<sup>25</sup>.

Assim, diante da gravidade das úlceras cutâneas crônicas na população diabética, das dificuldades terapêuticas encontradas e, considerando os novos avanços na área da biotecnologia aplicada à cicatrização, torna-se interessante avaliar a eficácia clínica da terapia celular autóloga (queratinócitos e fibroblastos) associado à cola de fibrina nessas lesões de membros inferiores.

## **2- REVISÃO DA LITERATURA**

Na segunda metade do século XX, além do grande desenvolvimento de curativos e de técnicas cirúrgicas que possibilitaram a realização de enxertos de pele de forma mais segura e eficaz, aumentou de forma espetacular, o interesse pela engenharia de tecidos<sup>25</sup>.

Embora os mecanismos de ação de um tecido obtido em laboratório e colocado sobre um ferimento não sejam perfeitamente claros, sugere-se que as células vivas dentro de substitutos artificiais de pele sejam “inteligentes” em termos de bioengenharia. As células seriam capazes de distinguir e se adaptarem ao meio ambiente encontrado, agindo apropriadamente em relação ao reparo do tecido<sup>25</sup>.

Destaca-se o estudo de Margulis et al. (2004), os quais descreveram método para obtenção de um equivalente de pele que apresentou arquitetura tecidual semelhante a 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<sup>30</sup>.

Na literatura, são descritos estudos com terapia celular, para o tratamento de úlceras crônicas de pernas, de diversas etiologias<sup>31,32</sup>, inclusive em pés diabéticos<sup>2,17,18,21,22,28,33,34,35,36</sup>.

Harvima IT et al. (1999) concluíram que ambos, queratinócitos e fibroblastos, são igualmente eficazes no processo de cicatrização. Um total de 26 úlceras diabéticas e 25 úlceras não diabéticas foram tratadas com culturas alogênicas de epitélios de queratinócitos e/ou esponjas gelatinosas de fibroblastos, uma vez por semana até a completa cicatrização. A duração das úlceras diabéticas foi 10,3 a 15,8 meses e o tamanho foi 3,1 a 6,6cm<sup>2</sup>. A duração das úlceras não diabéticas foi 6,8 a 6,0 meses e o tamanho 10,5 a 11,8cm<sup>2</sup>. O tempo necessário para cicatrização das úlceras diabéticas não foi significativamente diferente das úlceras não diabéticas<sup>35</sup>.

Hanft JR & Surprenant MS (2002) concluíram que a derme derivada de fibroblasto humano (Dermagraft) é um tratamento seguro e eficaz para úlceras crônicas de pés, com mais de 6 semanas de duração, em 28 pacientes diabéticos (14 com Dermagraft e 14 do grupo controle). Estes resultados foram da avaliação feita em seu centro de pesquisa, que participou de estudo prospectivo multicêntrico randomizado controlado de 12 semanas. Na semana 12, houve cicatrização estatisticamente significante maior nos pacientes com o material do estudo do que no grupo controle (71,4% para 14,3%)<sup>34</sup>.

Lobmann R et al (2003) investigaram a aplicação de queratinócitos humanos autólogos cultivados em membranas compostas de benzil ester de ácido hialurônico (Laserskin autograft) em úlceras de pés diabéticos. Estudaram 14 pacientes com diabetes tipo 2 com úlceras de mais de 6 meses de duração ou com úlceras sem aparente cicatrização por 12 semanas. Entre 6 e 64 dias após o transplante (dependendo do tamanho da ulceração), 11/14 lesões tiveram cicatrização completa. O transplante de queratinócitos autólogos pode ajudar na cicatrização mais rápida das úlceras dos pés diabéticos e, conseqüentemente, reduzir o tempo de hospitalização. Este método pode ser uma opção para o diabetólogo<sup>18</sup>.

Han SK et al. (2004) concluíram que o uso de enxertos de fibroblastos alogênicos humanos frescos é um tratamento eficaz e seguro para úlceras de pés diabéticos. Os autores trataram 8 pacientes (4 homens e 4 mulheres) com idade variando entre 50 e 67 anos, com úlceras de 6 a 17 semanas de evolução e 2,0 a 6,0cm<sup>2</sup> de tamanho; sendo 3 pacientes com exposição óssea. Fizeram cultivo de fibroblastos dérmicos humanos de adolescentes saudáveis, em meio Eagle modificado por Dulbecco. As células cultivadas foram aplicadas sobre as úlceras imediatamente após desbridamento; fibrina foi usada como uma célula carreadora. Foram feitos curativos a cada 3 dias com Tegaderm até a cura; sendo observada cicatrização completa em todos os pacientes. Foram necessários 11 a 21 dias para a completa reepitelização das úlceras<sup>22</sup>.

Moustafa M et al. (2004) avaliaram uma nova célula carreadora de superfície (TranCell) para o transporte de queratinócitos autólogos, visando a cicatrização de úlceras de pés neuropáticas crônicas resistentes aos tratamentos convencionais. Foram tratados 6 pacientes com idade entre 42 e 65 anos, e diabetes há 12 a 30 anos, apresentando 9 úlceras com duração de 4 semanas a 4 anos. Observaram cicatrização completa em 6 úlceras, redução no tamanho da úlcera em 1, ausência de resposta em 1 e descontinuação do tratamento em 1. A cicatrização levou de 6 a 17 aplicações semanais, no decurso de 6 a 20 semanas. Concluíram ser um estudo promissor, bem aceito pelos pacientes, pois conseguiram obter queratinócitos suficientes para o tratamento em um curto tempo (2 semanas) e a partir de uma pequena biópsia de pele<sup>17</sup>.

Bayram Y et al. (2005) investigaram a eficácia do curativo celular com queratinócitos alogênicos vivos no tratamento de úlceras de pés diabéticos. Foram incluídos no estudo 40 pacientes. No grupo tratado (20) foi encontrado 92% de redução da úlcera após 30 dias de tratamento; enquanto no grupo-controle (20) apenas 32%. Os curativos foram feitos a cada 3 dias até a cura completa; portanto, 10 curativos no período referido. Afirmam que este tipo de terapêutica pode trazer contribuições importantes para cicatrização de úlceras em pés diabéticos. Este é o primeiro trabalho controlado, para tratamento de úlceras diabéticas, com curativos baseados em queratinócitos<sup>21</sup>.

Vojtassák et al. (2006) estudaram um paciente branco, de 77 anos de idade, com úlcera de pé diabético de 25 anos de duração. Observaram melhora na cicatrização com diminuição do tamanho da úlcera e aumento na vascularização e no espessamento da derme, já após 29 dias de tratamento, com uma nova e eficaz técnica, utilizando enxertos compostos de fibroblastos autólogos obtidos por biópsia de pele e cultivados em membrana colágena biodegradável (Coladerm) em combinação com células mesenquimais derivadas da medula óssea do paciente. O aspirado de medula óssea do paciente com pé diabético foi aplicado diretamente na úlcera, injetado dentro das bordas da úlcera, finalmente coberta com o enxerto autólogo preparado. O paciente recebeu 2 tratamentos adicionais, nos dias 7 e 17<sup>2</sup>.

Hu S et al. (2006) trataram, com sucesso, 10 pacientes com Apligraf, Apligraf derme somente (sem epiderme) e um filme de poliuretano, não havendo diferença com as 3 modalidades terapêuticas. Tratavam-se de úlceras do mesmo tamanho, profundidade e localização anatômica. Apligraf é um produto produzido através da bioengenharia, constituído de matriz de colágeno bovino com fibroblastos neonatais recoberto por um epitélio estratificado contendo queratinócitos vivos<sup>28</sup>.

Cavallini (2007) estudou 10 pacientes diabéticos (6 homens e 4 mulheres, com idade entre 45 e 76 anos) com grandes e profundas úlceras em pernas ou pés, sem melhora com tratamentos clássicos, nas quais aplicou misturas de fibroblastos autólogos expandidos “*in vitro*” que foram semeados em benzil ester de ácido hialurônico (HYAFF). Previamente foram realizados desbridamento cirúrgico e cultura com antibiograma da úlcera, além de biópsia de pele para a obtenção dos fibroblastos. Observou cicatrização completa em 7 pacientes após 8, 12, 12, 14, 16, 18, 20 semanas da primeira aplicação do enxerto. Dois pacientes tiveram mais do que 70% de cicatrização após 20 e 28 semanas. Um paciente foi a óbito por infarto do miocárdio. É de opinião que esta é uma opção terapêutica satisfatória para grandes úlceras de pernas, em particular nas diabéticas<sup>33</sup>.

Assim, a revisão da literatura mostra claramente que a terapia celular é um campo bastante promissor, na tentativa de beneficiar doentes com úlceras crônicas. Porém, ainda há necessidade de grandes investimentos em estudos e pesquisas nesta área da medicina.

Em nosso estudo destaca-se a primazia da utilização da cola de fibrina autóloga, assim como da associação de células autólogas (queratinócitos e fibroblastos) cultivadas “*in vitro*”. Na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho com a utilização associada destas técnicas.

## **3- OBJETIVOS**

## **2.1- Objetivo geral**

Apresentar uma nova proposta terapêutica cirúrgica para o tratamento do pé diabético refratário às condutas usuais.

## **2.2- Objetivo específico**

Avaliar a terapia celular com implantes autólogos de células da pele cultivadas “*in vitro*” e aplicadas com cola de fibrina autóloga em úlceras cutâneas de membros inferiores em pacientes diabéticos tipo 1 e 2, considerando os índices de cicatrização das úlceras, tempo de fechamento e efeitos adversos.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1- Aspectos éticos**

Estudo aprovado no Comitê de Ética do Hospital Guilherme Álvaro/ Fundação Lusíada - Santos - SP (Parecer nº 236/ 2006) (Anexos 1, 2 e 3).

Todos os indivíduos do estudo receberam ficha de informação sobre o projeto e referendaram o termo de consentimento (Anexo 4).

#### **4.2- Casuística**

Foram selecionados 5 indivíduos diabéticos, adultos, portadores de úlceras crônicas de membros inferiores.

Os doentes foram estudados no Hospital Guilherme Álvaro (HGA) e na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no período de outubro de 2007 a abril de 2009.

#### **4.3- Critérios de inclusão**

Foram incluídos os doentes com úlceras diabéticas de mais de 4cm<sup>2</sup>, que não haviam apresentado resposta aos diversos tratamentos convencionais pelo prazo mínimo de 4 meses. Não houve distinção de etnia e sexo; sendo elegíveis aqueles com idade igual ou superior a 18 anos (Apêndice 1).

#### **4.4- Critérios de exclusão**

Foram excluídos pacientes com doença oclusiva periférica, osteomielite, gestantes e os que não preencheram os critérios de inclusão.

#### **4.5- Critérios diagnósticos e laboratoriais**

O diagnóstico da úlcera diabética foi feito pelo exame físico: inspeção (verificação de deformidades), aplicação de testes de sensibilidade (térmica, dolorosa e tátil) e palpação dos pulsos distais.

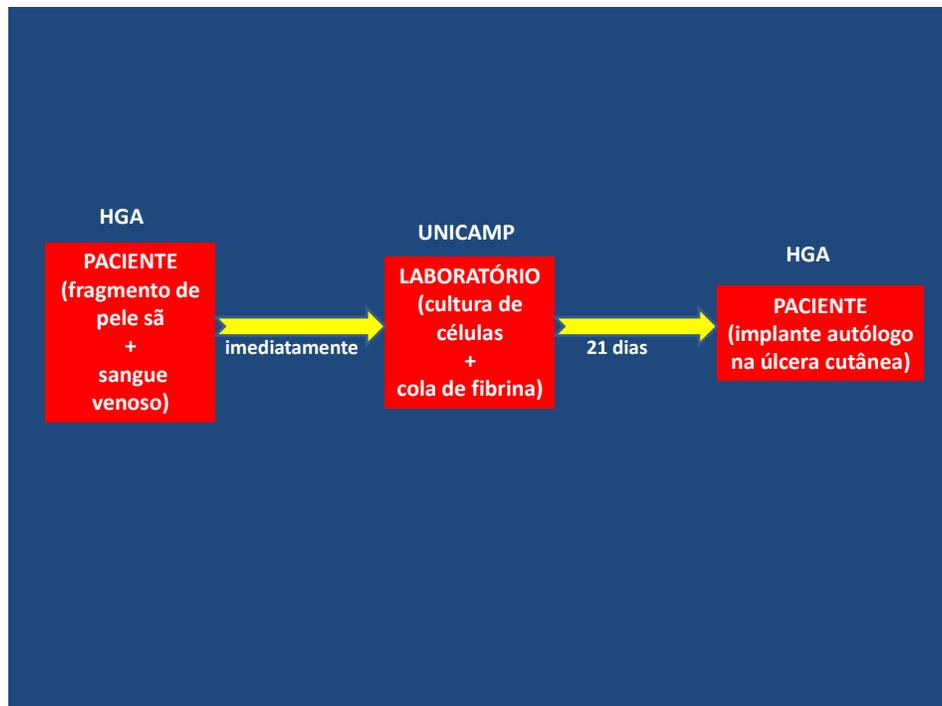
Foram utilizadas as classificações de Wagner e a da Universidade do Texas para a caracterização das úlceras.

Avaliaram-se: hemograma completo, glicemia de jejum, hemoglobina glicada, raio-X e ultrassonografia com doppler de membros inferiores, bacterioscopia e cultura com antibiograma da lesão.

#### **4.6- Coleta do material (área doadora)**

Todos os doentes foram submetidos à biópsias de pele normal de área não lesionada (região inguinal), sendo colhidos fragmentos de aproximadamente 1,0 por 1,0cm; acondicionados em soro fisiológico 0,9% e mantidos a temperatura de 4°C. Nesta ocasião também foi colhido sangue venoso de cada paciente e colocados em tubos individuais, contendo 3,8% de citrato de sódio (9:1). Precedendo a exérese cirúrgica, foi realizada assepsia da área doadora com iodo-povidine. Utilizou-se anestésico local, a lidocaina 2% sem vasoconstritor. A sutura simples foi feita com fio mononylon 5.0 e a retirada dos pontos no 14º dia. Curativos diários com água e sabão foram orientados durante o período.

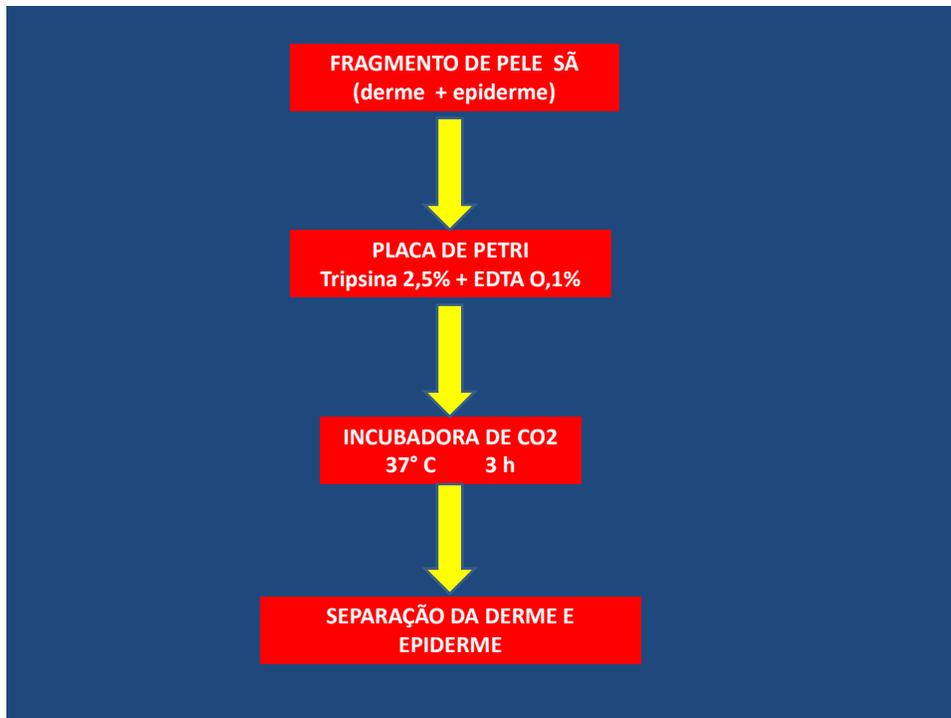
Estes materiais foram coletados no HGA e enviados a UNICAMP, não ultrapassando 12 horas até a sua manipulação no laboratório de cultura de células da pele (Figura 1).



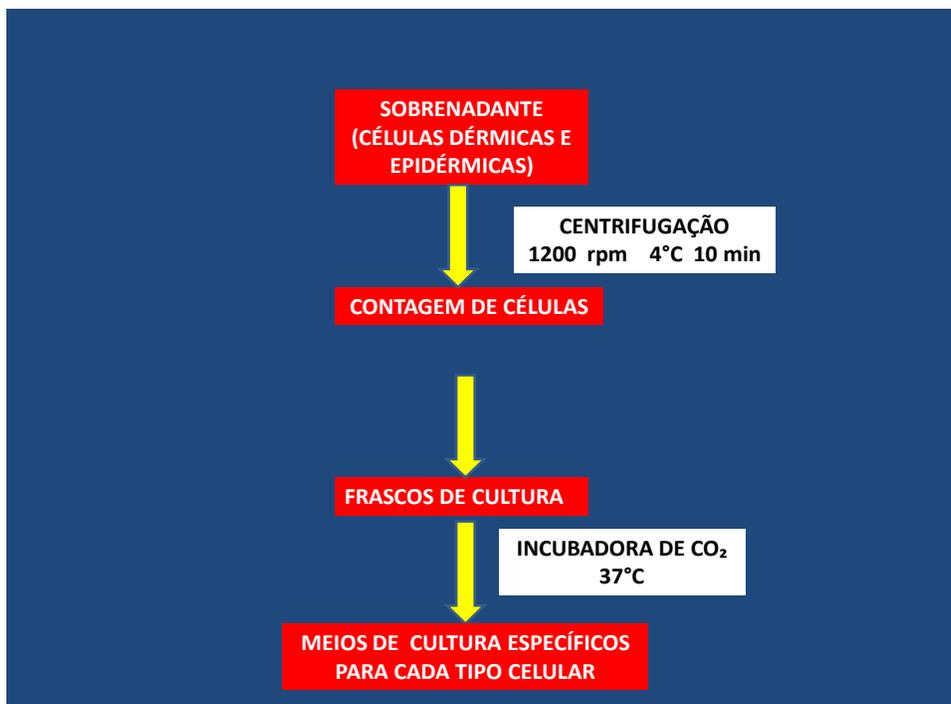
**Figura 1-** Esquema do implante autólogo

#### **4.7- Técnica de preparação do material no laboratório**

Os fragmentos de pele foram colocados em placas de Petri com tripsina 2,5% + EDTA 0,1% e mantidos em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>, por 3 horas, separando-se, então, a derme da epiderme (Figura 2). O sobrenadante (contendo as células dérmicas e epidérmicas) foi recuperado e centrifugado a 1200rpm por 10 minutos. Após a contagem, as células foram distribuídas em frascos de cultura, com  $1,0 \times 10^5$  células por cm<sup>2</sup> e, então, incubadas a 37°C, com tensão de 5% de CO<sub>2</sub>, em meios de crescimento específicos para cada tipo celular (queratinócitos e fibroblastos) (Figura 3).



**Figura 2-** Técnica de separação dermo-epidérmica

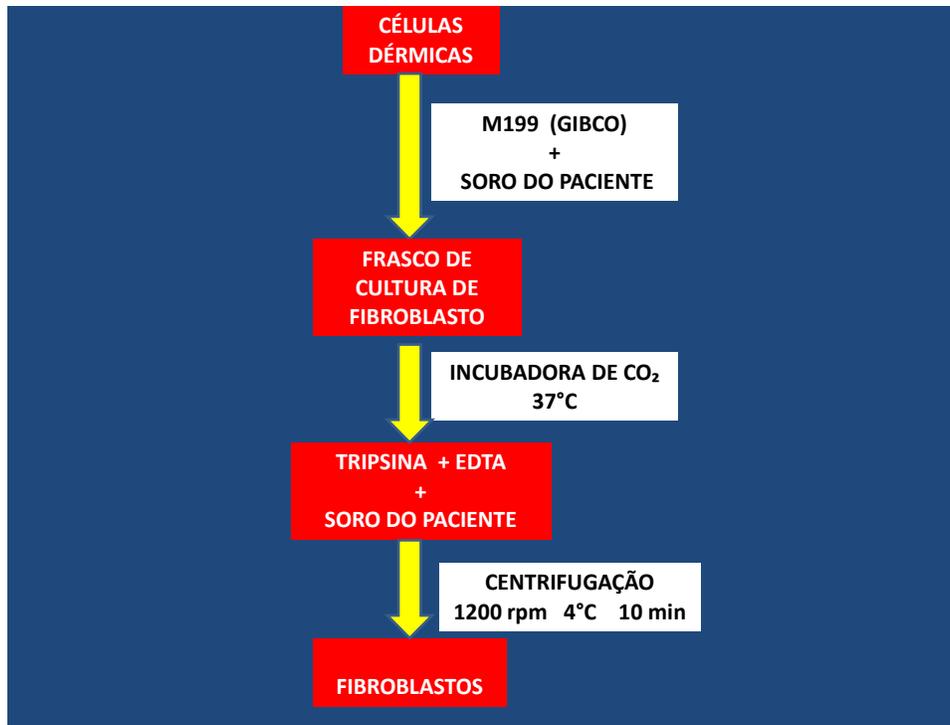


**Figura 3-** Esquema de cultura de células dérmicas e epidérmicas

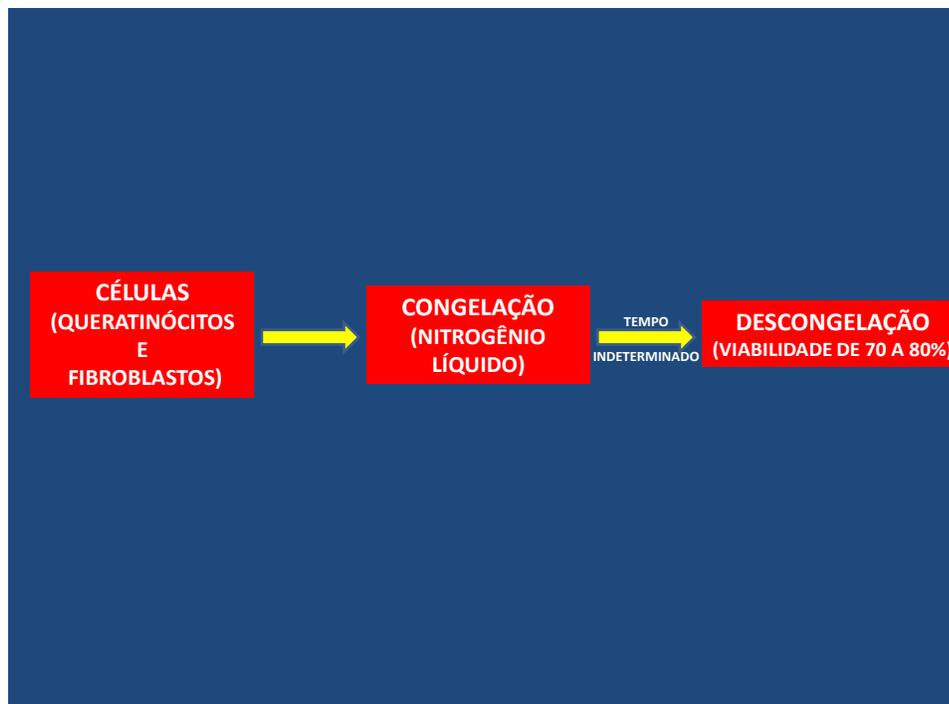
Para tanto, foram utilizados meios de cultura específicos para queratinócitos DKSFM (GIBCO) (Figura 4) e para fibroblastos M199 (GIBCO) (Figura 5), suplementados com 10% de soro do próprio paciente. Os frascos foram colocados em incubadora, a 37°C, com 5% de tensão de CO<sub>2</sub>. Os meios de cultura foram trocados 3 vezes por semana. Quando as células confluíram, realizou-se a passagem celular. Esta consiste em: sucção dos meios de cultura dos frascos, adicionando-se Tripsina + EDTA em cada frasco de cultura. Colocados em incubadora, a 37°C, com tensão de CO<sub>2</sub> de 5%, por 10 minutos, a tripsina foi neutralizada com soro do paciente. As células foram suspensas na concentração desejada, já nos meios de cultura específicos. Em média, foram necessários 14 dias para se obter quantidades suficientes de células (maior que 2,0 X 10<sup>6</sup>) em cada linhagem. Em cerca de 21 dias obteve-se uma quantidade de queratinócitos ao redor de 5,0 X 10<sup>6</sup> e de 10 X 10<sup>6</sup> de fibroblastos. As células puderam ser congeladas em soro, com 10% de dimetil-sulfóxido em nitrogênio líquido, e mantidas assim por tempo indeterminado. Ao serem descongeladas, apresentam viabilidade entre 70 e 80% (Figura 6).



**Figura 4-** Esquema de cultura de queratinócitos



**Figura 5-** Esquema de cultura de fibroblastos



**Figura 6-** Viabilidade celular

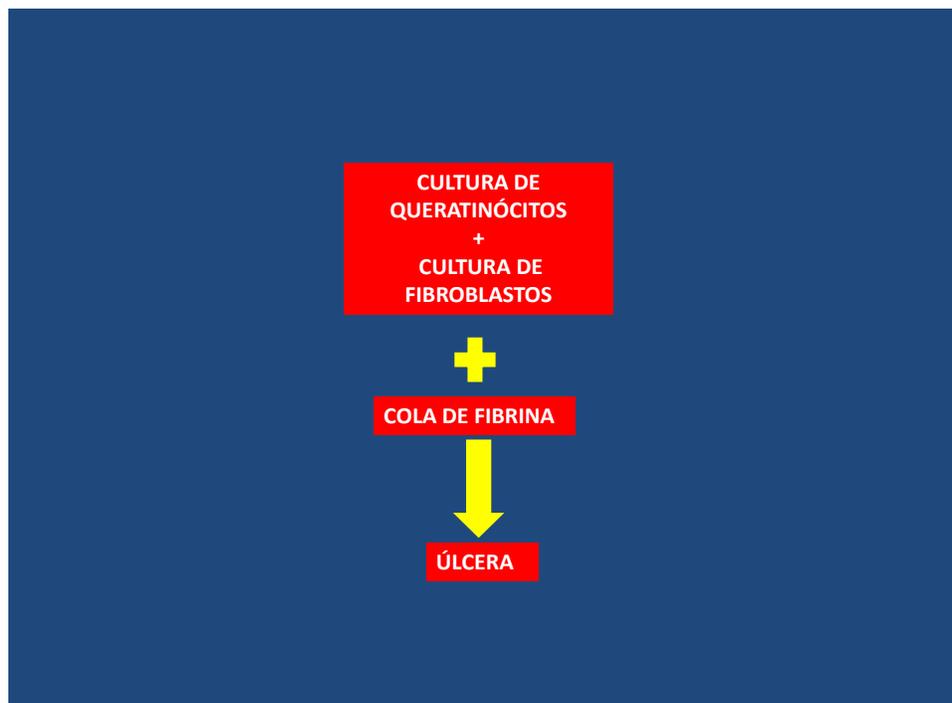
Já a técnica para obtenção de cola de fibrina autóloga foi feita de acordo com Moraes et al. (1998); sendo utilizado o sangue venoso de cada paciente. Após sua centrifugação por 10 minutos a 3000rpm, foi obtido o plasma. O fibrinogênio plasmático foi purificado usando técnica de precipitação de glicina.

#### 4.8- Enxertia (área receptora)

Após cerca de 21 dias (tempo da realização da cultura de células), foi realizada a enxertia.

A fibrina autóloga, o cloreto de cálcio 40mM e a trombina autóloga (300UI) (acondicionadas em seringa de 1mL) foram aplicados nas úlceras cutâneas (Figura 7), concomitantemente, com as culturas celulares (também acondicionadas em seringa de 1mL).

Foram colocadas as células cultivadas em conjunto com a cola de fibrina autóloga (Figura 7) sobre as úlceras nos 5 pacientes estudados.



**Figura 7-** Esquema de enxertia

#### 4.9- Curativo

Após 30 minutos da aplicação descrita no item 4.8, foram feitos curativos com hastes plásticas, gaze e micropore, de tal modo que não houvesse contato direto com a úlcera. Na Figura 8 está ilustrado o curativo em um dos doentes estudados (Caso 3).



**Figura 8-** Técnica do curativo

Em seguida, os pacientes foram dispensados, recebendo algumas orientações, particularmente repouso (Apêndice 2). Foi realizada a troca de curativo a cada 7 dias. Nenhuma outra terapêutica tópica foi realizada durante o período do implante.

#### 4.10- Relação entre o tamanho e o tempo de cicatrização das úlceras

No dia da enxertia foi realizada a documentação fotográfica, assim como em todos os dias das trocas de curativos, até a cicatrização completa das úlceras.

Foi usada câmera CANON EOS DIGITAL REBEL XT nº 0920524271 - DS 126071 - “Made in Japan”.

Toda a documentação fotográfica foi feita através de fotos, com e sem régua. A primeira com a finalidade de fazer a quantificação da área total das úlceras pela delimitação das bordas, utilizando para tanto o software IMAGE J e posterior análise estatística. A segunda, para uma melhor ilustração do trabalho. A Figura 9 ilustra um dos pacientes (Caso 2).



**Figura 9-** Ilustração

#### **4.11- Análise estatística**

Foi realizada a análise estatística dos 5 casos, sendo aplicada uma regressão exponencial entre o tamanho das úlceras ( $\text{cm}^2$ ) e o tempo de cicatrização das mesmas (em dias), com a finalidade de se avaliar a significância entre estas 2 variáveis.

## **5- RESULTADOS**

## 5.1- Técnicas laboratoriais

### 5.1.1- Preparação do concentrado celular

A preparação do concentrado celular ocorreu de acordo com a técnica padronizada já existente no Laboratório de Cultura de Células da Pele da Unicamp.

Trabalhou-se com amostras contendo  $10 \times 10^6$  células (queratinócitos e fibroblastos), obtidas a partir da área doadora que variou de 1,5 a 3,0 milhões de células totais (Figura 10).



**Figura 10-** Cultura primária

### 5.1.2- Cultura para queratinócitos

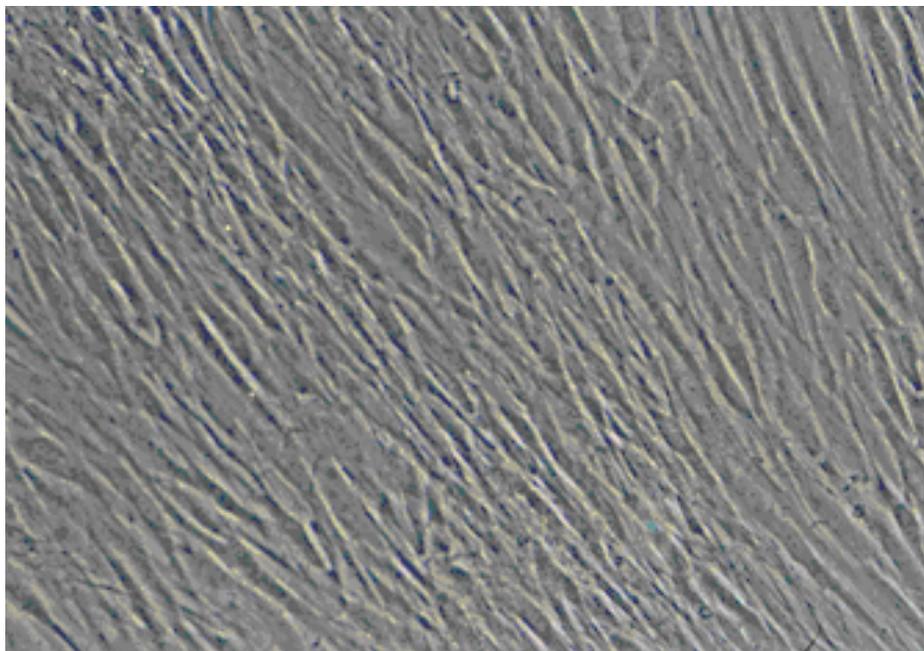
As células preparadas em cultura para o transplante de queratinócitos estão ilustradas na Figura 11.



**Figura 11-** Cultura de queratinócitos

### 5.1.3- Cultura para fibroblastos

As células preparadas em cultura para o transplante de fibroblastos estão ilustradas na Figura 12.



**Figura 12-** Cultura de fibroblastos

### **5.2- Procedimento cirúrgico na área doadora**

O tempo da excisão cirúrgica da área doadora foi em torno de minutos. No 14<sup>o</sup> dia, na retirada dos pontos, observou-se boa cicatrização, sem complicações.

### **5.3- Procedimento nas áreas receptoras**

Após os pacientes terem recebido simultaneamente as células cultivadas com a cola de fibrina autóloga diretamente sobre as úlceras; notou-se preenchimento da lesão com o conteúdo do implante (Figura 13). Observou-se aos exames semanais, o surgimento de intensa exsudação, tecido de granulação e presença de crostas serosas (Figura 14), com subsequente fechamento centrípeto.



**Figura 13-** Após 30 minutos do implante



**Figura 14-** Intensa exsudação e neovascularização

#### 5.4- Identificação e história clínica

Os resultados dos 5 casos estudados estão descritos em seguida e depois serão avaliados em conjunto.

##### **Relato dos casos:**

**Caso 1-** Paciente branca, do sexo feminino, 40 anos, diabética (DM1) desde os seis anos de idade. Tabagista. Há 18 meses apresentava úlcera profunda de 4,5 X 5,0cm de diâmetro na região do antepé esquerdo (Figura 15A), devido amputação transmetatarsiana. Apesar das diversas terapêuticas: câmara hiperbárica, desbridamentos e curativos diários com soro fisiológico, pomadas, cremes e óleos, não houve melhora da lesão. É dependente de insulina. Realizado o implante, ocorreu cicatrização gradativa da úlcera (Figuras. 15B, 15C e 15D), com cura completa após 60 dias (Figura 15E). Notou-se inicialmente intensa exsudação, com diminuição progressiva, durante as trocas de curativos, além de nítida neovascularização já na troca do primeiro curativo. Na cultura para bactérias houve o crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus*, antes e durante todo o tratamento. Fazia uso de ciprofloxacina antes do implante, antibiótico mantido durante este estudo. Ultrassonografia com doppler de membros inferiores: árvore arterial e venosa pérvias. Raio-X pé esquerdo: amputação do antepé ao nível das extremidades proximais dos metatarsos.



**Figura 15A- Caso 1: pré-tratamento**



**Figura 15B- Caso 1: dia 15**



**Figura 15C- Caso 1: dia 30**



**Figura 15D- Caso 1: dia 45**



**Figura 15E- Caso 1: dia 60**

**Caso 2-** Paciente branco, do sexo masculino, 64 anos, diabético (DM2) há 25 anos. Há 24 meses apresentava úlcera de 3 X 3cm na região plantar esquerda - mal perfurante plantar (Figura 16A). Hipertenso. Transplantado renal há 6 meses, em uso de ciclosporina 75mg 12/12h, micofenolato de mofetil 1g 12/12h, prednisona 7,5mg/d, sulfametoxazol-trimetropim 400mg + 80mg/d, sinvastatina 10mg/d, ciprofibrato 100mg/d, cálcio 500mg/d, atenolol 50mg 12/12h, metformina 850mg 12/12h e insulina NPH 50UI (manhã), insulina ultra-rápida 10UI (almoço). Realizado o implante, ocorreu cicatrização gradativa da úlcera (Figuras. 16B, 16C e 16D), com cura completa após 120 dias (Figura 16E). Notou-se inicialmente intensa exsudação, com diminuição progressiva, durante as trocas de curativo. Na cultura para bactérias não houve o crescimento de microrganismos. Ultrassonografia com doppler de membros inferiores: árvore arterial e venosa pérvias. Raio-X p  esquerdo: normal.



**Figura 16A- Caso 2: pré-tratamento**



**Figura 16B- Caso 2: dia 30**



**Figura 16C- Caso 2: dia 60**



**Figura 16D- Caso 2: dia 90**



**Figura 16E- Caso 2: dia 120**

**Caso 3-** Paciente branco, do sexo masculino, 67 anos, diabético (DM2) há 10 anos. Tabagista e hipertenso. Há 4 meses apresentava 2 úlceras em membro inferior direito (uma de 2 x 5cm na região maleolar lateral e outra com 2 x 8cm no terço distal lateral), surgidas simultaneamente após drenagem de abscesso (Figura 17A). Atualmente, em uso de insulina NPH 30UI/d. Realizado o implante, ocorreu cicatrização gradativa das lesões (Figuras 17B e 17C), com cura completa em 21 e 40 dias, respectivamente (Figura 17D). Notou-se inicialmente intensa exsudação, com diminuição progressiva, durante as trocas de curativo. Na cultura para bactérias não houve crescimento de microrganismos. Ultrassonografia com doppler de membros inferiores: árvore arterial e venosa pérvias. Raio-X p  direito: normal.



**Figura 17A- Caso 3: pré-tratamento**



**Figura 17B- Caso 3: dia 7**



**Figura 17C- Caso 3: dia 21**



**Figura 17D- Caso 3: dia 40**

**Caso 4-** Paciente negro, do sexo masculino, 47 anos, diabético (DM2) há 9 anos. Há 12 meses apresentava úlcera profunda de 3,0 X 4,0cm de diâmetro na região do antepé direito (Figura 18A), devido amputação transmetatarsiana. Concomitantemente, hipertensão arterial, nefropatia e retinopatia proliferativa. Apesar das diversas terapêuticas, como desbridamentos e curativos diários com pomadas, cremes e óleos, não houve melhora da lesão. Atualmente medicado com glibenclamida 10mg/d. Realizado o implante, ocorreu cicatrização gradativa da úlcera (Figuras. 18B, 18C, 18D e 18E), com cura completa em 120 dias (Figura 18F). Notou-se inicialmente intensa exsudação, com diminuição progressiva, durante as trocas de curativo; com nítida neovascularização. Na cultura para bactérias pré-tratamento houve o crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus*. Durante o tratamento, foi identificado além deste, *Pseudomonas aeruginosa*. Fazia uso de ciprofloxacina antes do implante, antibiótico mantido durante este estudo. Ultrassonografia com doppler de membros inferiores: árvore arterial e venosa pérvias. Raio-X pé direito: amputação do antepé ao nível das extremidades proximais dos metatarsos.



**Figura 18A- Caso 4: pré-tratamento**



**Figura 18B- Caso 4: dia 7**



**Figura 18C- Caso 4: dia 20**



**Figura 18D- Caso 4: dia 50**



**Figura 18E- Caso 4: dia 90**



**Figura 18F- Caso 4: dia 120**

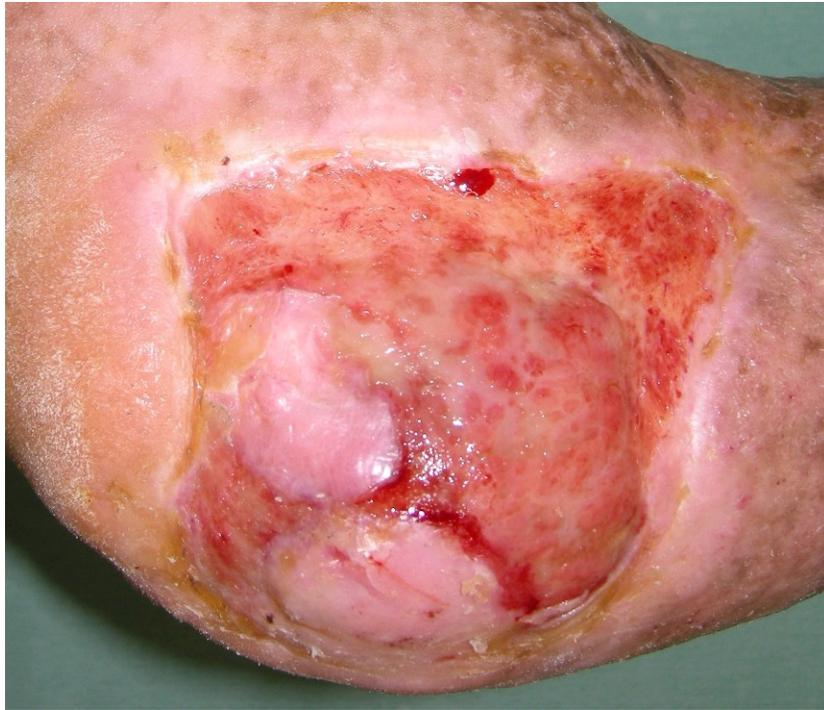
**Caso 5-** Paciente branco, do sexo masculino, 77 anos, diabético (DM2), há 20 anos. Há 20 anos apresenta úlcera de 7 x 9cm na região calcâneo-maleolar lateral direita, surgidas após politraumatismo (Figura 19A). Hipertenso. Realizado o implante, ocorreu discreta melhora (Figura 19B), sendo realizada uma segunda aplicação aos 40 dias, visando maior rapidez de resposta, particularmente pelo tamanho da úlcera. Observou-se melhora gradativa da mesma, notando-se inicialmente intensa exsudação, porém com diminuição progressiva, durante as trocas de curativos. Na cultura para bactérias houve o crescimento do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* sensível a meropenem (antes e durante o tratamento), antibiótico mantido durante todo o período do estudo. Faz uso de glibenclamida 10mg/d e enalapril 10mg/d. Ultrassonografia com doppler de membros inferiores: árvore arterial e venosa pérvias. Raio-X pé direito: fratura antiga e consolidada de 5º metatarso direito. Raio-X perna direita e tornozelo: fraturas antigas e consolidadas, com deformação tibial distal e proximal e fibular distal. Anquilose e deformação tíbio-társica direita. Artrose talo calcâneo direito. Raio-X joelho direito: fratura antiga e consolidada, com deformidade do platô tibial externo. Artrose. Tomografia computadorizada da perna direita: achados sequelares de fratura do segmento distal da tibia e tornozelo direitos. Após 60 dias (Figura 19C), notou-se piora do quadro, com maior secreção na lesão, cianose do pé direito, ausência de pulso tibial anterior e lentificação do enchimento capilar arterial. Realizada discussão conjunta (cirurgia vascular e infectologia), com a suspeita de doença oclusiva arterial aguda no território poplíteo distal. Foi solicitada ultrassonografia com doppler, cujo exame revelou oclusão de artéria tibial anterior, com fluxo preservado em fibular e tibial posterior com placas de ateromatose. Estes achados denotam doença arterial no território poplíteo-distal, o que explica uma cicatrização mais difícil. Apesar desta intercorrência, o paciente apresentou gradativa melhora (Figuras 19D e 19E), apesar de lentamente.



**Figura 19A- Caso 5: pré-tratamento**



**Figura 19B- Caso 5: dia 40**



**Figura 19C- Caso 5: dia 60**



**Figura 19D- Caso 5: dia 80**



**Figura 19E- Caso 5: dia 98**

### **Avaliação conjunta dos 5 casos do estudo**

Após os pacientes terem recebido simultaneamente as células cultivadas com a cola de fibrina autóloga diretamente sobre as úlceras; notou-se preenchimento da lesão com o conteúdo do implante, visibilizando-se membrana lisa e brilhante. Observou-se aos exames semanais, o surgimento de intensa exsudação, tecido de granulação e presença de crostas serosas, com subsequente fechamento centrípeto. Destaca-se a diminuição progressiva da exsudação.

As características clínicas gerais dos doentes do estudo, assim como as características específicas das úlceras dos mesmos, estão resumidas nos Quadros 1, 2 e 3. As 6 úlceras foram classificadas como Wagner 1. Em relação ao sistema utilizado pela Universidade do Texas, os casos 1, 4 e 5 foram classificados como Grau 1 Estágio B e os casos 2 e 3 como Grau 1 Estágio A. O caso 5 após a intercorrência (doença oclusiva arterial aguda periférica) foi reclassificado como Texas Grau 1 Estágio D.

O Gráfico 1 mostra o tempo de cicatrização das úlceras após os implantes autólogos.

**Quadro 1-** Características clínicas dos 5 casos estudados

<b>Casos</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Tempo de DM (anos)</b>	<b>Comorbidades</b>	<b>Tabagismo</b>
1	40	F	34 (DM1)	-	1 maço/dia
2	64	M	25 (DM2)	Nefropatia (transplantado renal) HAS	-
3	67	M	15 (DM2)	HAS	1 maço/dia
4	47	M	9 (DM2)	HAS Nefropatia Retinopatia	-
5	77	M	20 (DM2)	HAS Anquilose de tornozelo	-

**Quadro 2-** Características das úlceras dos 5 casos estudados

Casos	Localização	Tamanho Inicial (cm <sup>2</sup> )	Tempo da úlcera (meses)	Tempo de cicatrização pós-implante (dias)				
				ICU				Fechamento
				30º dia	60º dia	90º dia	120º dia	
1	Antepé	16,8	18	0,88	0,99	0,99	0,99	60
2	Plantar	7,5	24	0,26	0,53	0,64	0,93	120
3 <sup>a</sup>	Terço distal	5,0	4	1	1	1	1	40
3b	Maleolar lateral	4,0	4	1	1	1	1	21
4	Antepé	7,85	12	0,53	0,90	0,95	0,98	120
5	Retropé	36,62	240	0,10	0,10	0,10	0,10	
<b>Médias</b>		<b>12,96</b>	<b>50,33</b>	<b>0,62</b>	<b>0,75</b>	<b>0,78</b>	<b>0,83</b>	<b>72,2</b>

**Quadro 3-** Contaminação bacteriana das úlceras diabéticas dos 5 casos estudados

<b>Casos</b>	<b>Cultura para bactérias (pré-tratamento)</b>	<b>Cultura para bactérias (durante o tratamento)</b>	<b>Antibióticos em uso (pré e durante o tratamento)</b>
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ciprofloxacina
2	-	-	Sulfametoxazol+ trimetropim
3	-	-	-
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ciprofloxacina
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meropenem

5.4.1- Idade

Variou de 40 a 77 anos, com média de 59 anos (Quadro 1).

5.4.2- Sexo

Predominou o sexo masculino: 4 homens e 1 mulher (Quadro1).

5.4.3- Tempo de duração do DM

O tempo da doença de base variou de 9 a 34 anos, com média de 20,6 anos (Quadro 1).

#### 5.4.4- Tempo de duração das úlceras

O tempo de duração da úlcera variou de 4 meses a 20 anos, com média de 5 anos (Quadro 2).

#### 5.4.5- Comorbidades

Três pacientes apresentavam HAS. Dois pacientes, nefropatia, sendo que um deles também é transplantado renal; e o outro, retinopatia. Anquilose importante no mesmo membro afetado pela úlcera foi observada em um outro paciente (Quadro 1).

#### 5.4.6- Hábitos

Todos os pacientes negaram o uso crônico de bebidas alcoólicas. Dois pacientes confirmaram ser tabagistas (Quadro 1).

#### 5.4.7- Localização das úlceras

Entre os 5 pacientes diabéticos, 2 apresentaram as lesões na região transmetatarsiana, 1 na região plantar (mal perfurante), 1 na região calcâneo-maleolar lateral direita e 1 com duas úlceras (no 1/3 distal lateral da perna e a região maleolar lateral) (Quadro 2).

#### 5.4.8- Tamanho das úlceras

O tamanho das úlceras variou entre 4,0 e 36,62cm<sup>2</sup> (Quadro 2), com média de 12,96cm<sup>2</sup>.

#### 5.4.9- Contaminação bacteriana das úlceras

Em 3 pacientes houve o crescimento de alguns microrganismos (*Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), antes e/ou durante o estudo (Quadro 3).

#### 5.4.10- Tempo e índice de cicatrização das úlceras

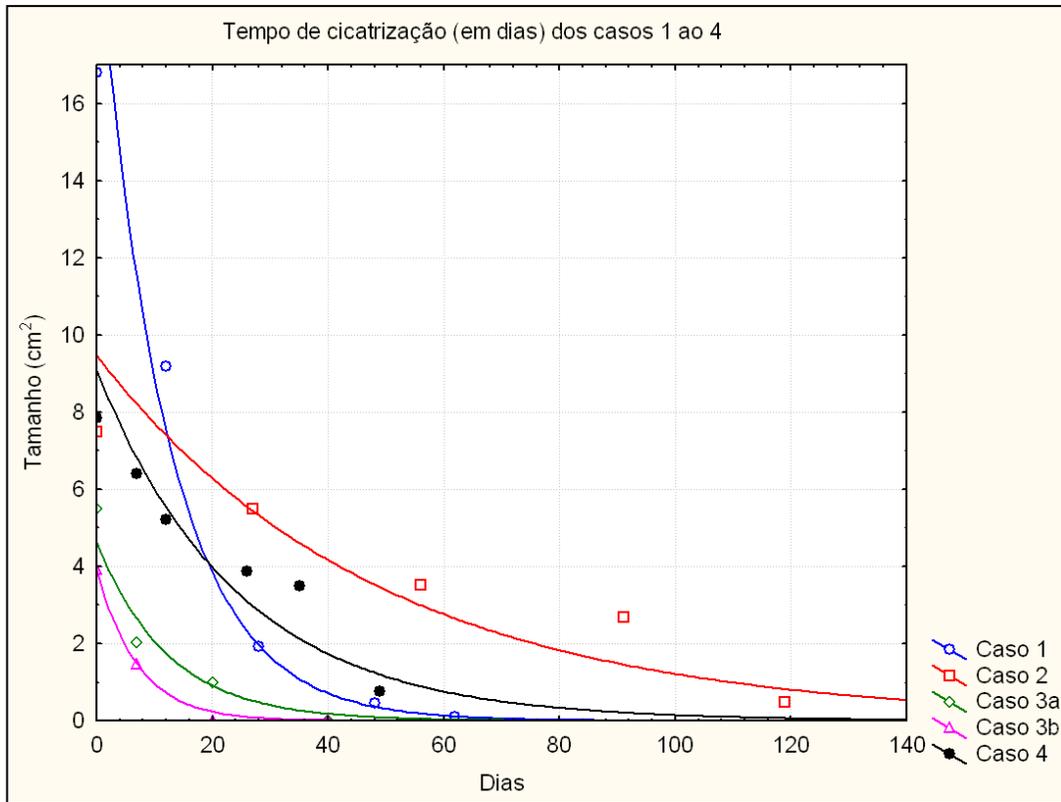
Houve cicatrização completa das úlceras, entre 21 a 120 dias, com média de 72 dias nos 4 primeiros casos apresentados. O caso 5 apresentou cicatrização parcial em 40 dias (Quadro 2 e Gráfico 1). A média dos Índices de Cicatrização das Úlceras (ICU) foi de 62%, 75%, 78% e 83% no 30º; 60º; 90º e 120º dias de evolução, respectivamente.

#### 5.4.11- Relação entre o tamanho e o tempo de cicatrização das úlceras

Toda a documentação fotográfica feita através de fotos sem régua, tanto no dia da enxertia, como em todos os dias das trocas de curativos, até a cicatrização completa das úlceras, ilustrou a evolução de todos os casos estudados (Casos 1 a 5).

Aquela feita através de fotos com régua, permitiu a realização dos cálculos geométricos, através da quantificação da área total das úlceras pela delimitação das bordas para a análise estatística.

Esta mostrou, pela aplicação da regressão exponencial entre o tamanho das úlceras (cm<sup>2</sup>) e o tempo de cicatrização das mesmas (em dias), uma relação significativa em todos os casos; exceto no caso 5, por apresentar somente 2 valores. Nota-se que os casos 1 a 4 têm o mesmo padrão, sendo que em alguns casos houve uma queda mais acentuada no tamanho em um tempo menor, como por exemplo, o caso 3B (Gráfico 1).



**Gráfico 1-** Resultados em  $\text{cm}^2$  do tamanho das úlceras nos tempos 0 (no dia do implante) e 20, 40, 60, 80, 100 e 120 dias (após o dia do implante), nos casos 1, 2, 3 e 4

## **Regressão exponencial**

**Caso 1=**  $20,5886 * e^{(-0,0839 * x)}$

**Caso 2=**  $9,4716 * e^{(-0,0205 * x)}$

**Caso 3a=**  $4,644 * e^{(-0,0812 * x)}$

**Caso 3b=**  $3,9344 * e^{(-0,141 * x)}$

**Caso 4=**  $9,0879 * e^{(-0,0414 * x)}$

## **Correlação exponencial**

**Caso 1=**  $R=0,99533$  ( $p=0,0003$ )

**Caso 2=**  $R=0,99159$  ( $p=0,0009$ )

**Caso 3a=**  $R=0,99152$  ( $p=0,0084$ )

**Caso 3b=**  $R=0,99851$  ( $p=0,0014$ )

**Caso 4=**  $R=0,98240$  ( $p=0,0004$ )

A Correlação Exponencial é um valor numérico representado pela letra “R”, que quantifica a força da relação entre as variáveis “Dias” e “Tamanho”.

A Regressão Exponencial é a forma de representar essa força, através da representação gráfica (curva).

O “p” é a significância das correlações, sendo obtido através da distribuição da Correlação do Produto-Momento de Pearson, com base no valor da correlação exponencial (R) e na quantidade de valores coletados. Em todos os casos, o p foi significativo.

O caso 5 não foi analisado por apresentar apenas 2 valores.

## **6- DISCUSSÃO**

Nas últimas décadas, a elevação progressiva do número de indivíduos portadores de DM é uma realidade indiscutível e universal. A população diabética no mundo está em franca expansão. Este fato, associado à melhora da expectativa de vida destes doentes, após a descoberta da insulina e das drogas antidiabéticas orais, muito contribuiu para o aumento das complicações crônicas que a doença acarreta<sup>4</sup>, dentre elas o pé diabético.

O pé diabético é uma das principais complicações do DM, caracterizado por úlceras, que evoluem com frequência para amputações de membros inferiores. Muitas amputações poderiam ser evitadas, com a detecção precoce e controle rigoroso da alteração metabólica, a educação dos cuidados com os pés e o tratamento oportuno de suas eventuais manifestações<sup>4,9</sup>. Também fundamental é a manutenção de boa perfusão do pé e o tratamento de infecções<sup>9</sup>.

Enfatiza-se a repercussão social e econômica na qualidade de vida destes pacientes, pois a eventual perda da independência física influencia diretamente na produtividade, trazendo interferências negativas em âmbito familiar<sup>3,4</sup>.

Assim, os profissionais da saúde envolvidos no tratamento dos diabéticos, precisam estar familiarizados com os avanços nesta área da medicina, visando a prevenção e tratamento precoces, o que induz a um melhor prognóstico. Equipes multidisciplinares devem realizar rígido acompanhamento destes doentes, para que sejam evitadas afecções graves ou mesmo fatais<sup>4,17</sup>.

É bem conhecido que grande parte das úlceras cutâneas em pacientes diabéticos têm difícil cicatrização, quando tratadas por métodos tradicionais, como: desbridamento, curativos, cirurgia para implantação de enxerto de pele, utilização de agentes quimioterápicos, dentre outros<sup>3,17, 31,33</sup>.

Visando possibilitar uma terapêutica mais eficaz, com melhores resultados funcionais e estéticos, além de recuperação mais rápida, permitindo o retorno do indivíduo às suas atividades profissionais (quando por ventura

incapacitado), foi utilizada a terapia celular através de implantes autólogos. Esta tecnologia idealizada no Laboratório de Cultura de Células da Pele da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp representa uma inédita e eficaz abordagem para o tratamento das úlceras diabéticas, independentemente de seus vários mecanismos etiopatogênicos.

Na literatura, existem alguns estudos em pacientes diabéticos sobre terapia celular para o tratamento de úlceras de pernas; no entanto, a maioria com o objetivo de avaliar o efeito de queratinócitos e fibroblastos alogênicos.<sup>21,22,28,34,35</sup> As pesquisas que utilizaram queratinócitos<sup>17,18</sup> e fibroblastos<sup>2,33</sup> autólogos mostraram que o transplante pode ajudar na cicatrização mais rápida, a partir de uma pequena biópsia de pele, sendo uma boa opção terapêutica para grandes úlceras diabéticas.

O presente trabalho utilizou de maneira inovadora cola de fibrina autóloga com co-cultura de queratinócitos e fibroblastos autólogos. A excelente cicatrização de todos os pacientes aqui tratados merece destaque.

Julgamos assim, de grande importância tecer comentários sobre alguns fatores que poderiam ter influência sobre o sucesso do método.

Quanto ao tempo de cicatrização e tamanho das úlceras (vide Quadro 2), ocorreu cicatrização completa em 83,3% dos casos em 21 a 120 dias. O tamanho variou entre 4,0 e 36,62 cm<sup>2</sup> nas 6 úlceras dos 5 doentes tratados. A relação entre essas 2 variáveis (tamanho x tempo) foi estatisticamente significativa, como se pode observar no Gráfico 1. No paciente que apresentava a maior úlcera, houve melhora (10% de cura) já em curto tempo (40 dias), resultado considerado bastante satisfatório, visto tratar-se de úlcera de longa duração (20 anos) em paciente com diversas comorbidades. Portanto, em nossa pesquisa o tamanho (área) da úlcera influenciou na cicatrização, fato também mencionado por Lobman et al<sup>18</sup>.

Ressalta-se que nossa porcentagem de cura foi superior a de todos os outros trabalhos<sup>17,18,33</sup>. Lobman et al<sup>18</sup> observaram cicatrização completa em 79% entre 7 e 64 dias, tendo estudado lesões variando somente de  $12,6 \pm 8\text{cm}^2$  em 14 pacientes. Já Moustafa et al<sup>17</sup> teve 66,7% no período de 6 a 20 semanas nas 9 úlceras dos 6 pacientes (medindo de 1 a  $16\text{cm}^2$ ). Por sua vez, Cavallini<sup>33</sup> obteve 70% de cicatrização no período de 8 a 20 semanas dos 10 pacientes relatados. E por fim, Vojtassák et al<sup>2</sup> estudaram apenas 1 paciente observando cicatrização parcial após 29 dias de tratamento.

Em relação ao tempo de duração da úlcera, no atual estudo sua variação foi de 4 meses a 20 anos (vide Quadro 2). As menores úlceras foram as que cicatrizaram mais rapidamente (casos 3a e 3b), enquanto a maior úlcera, mais lentamente (caso 5). Nos demais casos (casos 1, 2 e 4), o tempo de duração da úlcera variou de 1 a 2 anos, com cura entre 2 a 4 meses. Estes dados sugerem que exista uma correlação entre a velocidade de cicatrização com o seu tempo de duração.

Nos doentes aqui estudados, predominaram os homens com idade média de 59 anos e o tempo médio de duração do DM foi de 20 anos. Estes dados não interferiram sobre a velocidade de cicatrização (vide Quadro 1).

Na literatura, os quatro trabalhos sobre implantes autólogos<sup>2,17,18,33</sup> avaliaram indivíduos adultos com faixa etária equivalente aos doentes desta pesquisa, assim como tratavam-se de pacientes com DM de longa duração e a maioria com úlceras de duração superior a 6 meses. Somente Cavallini<sup>33</sup> refere que a maioria dos seus pacientes era do sexo masculino. Destes autores, apenas Lobmann et al<sup>18</sup> comentam que estes fatores não parecem ter influência importante na cicatrização, embora a amostra da pesquisa tenha sido pequena.

Em relação às comorbidades dos pacientes estudados (vide Quadro 1), é interessante referir que mesmo um paciente transplantado renal (caso 2) em uso de inúmeros medicamentos se beneficiou do implante autólogo. Todavia, destaca-se a preocupação do autor desta pesquisa, no controle de todas

as comorbidades como a HAS encontrada em 4 pacientes. Talvez o fator de maior dificuldade responsável pela demora da cicatrização tenha sido a localização em calcâneo com anquilose de tornozelo observada no caso 5, justificada pela agressão traumática diária na deambulação, obviamente associada à colonização bacteriana em úlcera extensa de longa duração, além da intercorrência de doença arterial oclusiva periférica<sup>13</sup>.

Comentário pertinente deve ser feito quanto à localização da úlcera. Em termos gerais, o prognóstico é pior quanto mais distal a mesma se apresentar. Isto é devido aos frequentes traumas e alterações neurológicas associados às microangiopatias prévias<sup>13</sup> nos pacientes diabéticos.

É sabido que infecções oportunistas são de grande importância na gênese das úlceras diabéticas<sup>13,33</sup>. Os germes predominantes são os *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *Proteus* e *Pseudomonas*<sup>13,33</sup>. Nos pacientes deste estudo, a cultura com antibiograma, pode confirmar o valor desta afirmativa (vide Quadro 3). Nos casos 2 e 3 não foi constatada a presença de nenhuma bactéria (ambos com excelente evolução). Nos casos 1 e 4, antes do implante foi isolado *Staphylococcus aureus*, sendo que os dois pacientes já vinham medicados de longa data com ciprofloxacina, por orientação do cirurgião vascular. Foi mantida tal droga, após avaliação do infectologista durante todo o período do estudo. No caso 1, houve persistência da mesma bactéria durante todo o tratamento; já no caso 4, observou-se o surgimento de *Pseudomonas aeruginosa* sensível a ciprofloxacina, o que provavelmente alterou a sua evolução. No entanto, ambos os casos (1 e 4) evoluíram com cicatrização completa, apesar da colonização bacteriana. No caso 5, já havia uma colonização prévia por *Pseudomonas aeruginosa*, há pelo menos 2 anos, confirmada com exames trazidos pelo paciente. Vinha com antibioticoterapia plena sem involução da colonização bacteriana.

É nossa opinião que as bactérias encontradas não impediram o sucesso do tratamento, e inclusive segundo alguns autores, como Lobmann et al<sup>18</sup> os queratinócitos podem diminuir as infecções, as quais são as causas mais comuns de amputação no pé diabético.

Por outro lado, ainda segundo Lobmann et al<sup>18</sup> os queratinócitos ativos expressariam vários fatores de crescimento, estimulando a cicatrização. Enquanto os fibroblastos autólogos estariam aptos a fornecer fatores de crescimento e outros sinais celulares, estimulando a neovascularização e a formação tecidual, destaca Cavallini<sup>33</sup>.

Em relação à técnica do implante, ressalta-se que no atual estudo foi usada a associação de culturas de fibroblastos e queratinócitos autólogos com cola de fibrina autóloga. É oportuno que se comente sobre a quantidade (mL) aplicada por área (cm<sup>2</sup>). Foram aplicadas 10 x 10<sup>6</sup> células por 2mL de cola de fibrina autóloga nas úlceras, não se levando em conta a área afetada. Merece realce a resposta excelente de nossos pacientes com apenas uma aplicação. Porém, se necessário, vários implantes poderão ser realizados na mesma lesão em ocasiões diferentes. Acreditamos que úlceras maiores mereceriam maiores quantidades do material e maior número de implantes. Estudos posteriores serão necessários para esclarecimentos quanto à concentração de células por centímetros quadrados de úlceras, visando o fechamento das mesmas, a partir da primeira aplicação.

Não representa obstáculo o tempo de preparação das culturas (cerca de 21 dias), opinião também compartilhada por Cavallini<sup>33</sup>, inclusive nos casos de queimaduras de segundo grau.

Em relação aos curativos realizados em nossas 6 úlceras, foi nítida a importância de se evitar o contato das mesmas com o material utilizado. A troca feita somente a cada 7 dias facilita a adesão do paciente, assim como evita gastos excessivos com gaze, micropore e diversos tipos de pomadas desnecessárias e ineficazes, que normalmente são utilizadas diariamente.

Durante todo o tratamento, não ocorreram reações adversas locais nos pacientes por nós estudados; portanto, revelando-se um método bastante seguro, dado corroborado pelos estudos de Moustafa et al<sup>17</sup>.

De grande vantagem, é a realização ambulatorial de procedimento minimamente invasivo, de fácil aplicação no doente, bem como a possibilidade de criopreservação das células do próprio paciente por tempo indeterminado.

Acreditamos na possibilidade da Unicamp atuar como pólo difusor (Banco de Pele), propiciando este valor para todo o Estado de São Paulo e cidades mais próximas do Paraná, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Este vislumbre diminui uma possível limitação que seria a necessidade de um laboratório altamente qualificado e profissionais experientes em todas as regiões do país.

Finalizando, a associação das técnicas (implante celular de queratinócitos e fibroblastos com a cola de fibrina) se mostrou eficaz, de fácil aplicação minimamente invasiva e segura, destacando-se como uma excelente opção terapêutica para úlceras crônicas diabéticas sem resposta aos tratamentos clássicos e mesmo para aquelas recém desbridadas ou submetidas a amputações. A aceleração do processo de cicatrização com essa terapia possibilitou a cura das lesões cutâneas crônicas em pacientes de risco elevado de amputação, repercutindo significativamente na qualidade de vida desses pacientes diabéticos, podendo significar um benefício importante para a saúde pública e previdência social.

## **7- CONCLUSÃO**

Com base nos objetivos propostos e nos resultados observados, concluiu-se como vantagens do método:

- Procedimento não invasivo comparado a enxertos comuns de pele,
- Retirada de pequeno fragmento de pele na área doadora,
- Fácil e rápida aplicação na área de enxertia,
- Banco de células do próprio paciente disponibilizado por tempo indeterminado,
- Realização do procedimento em ambulatório,
- Fácil adesão do paciente,
- Boa cicatrização,
- Eficaz,
- Seguro.

## **8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- 1- Lau TW, Chan YW, Lau CP, Chan CM, Lau CB, Fung KP, Leung PC, Ho YY. Investigation of the effects of Chinese medicine on fibroblast viability: implications in wound healing. *Phytother Res.* 2007 Oct; 21(10):938-47.
- 2- Vojtassák J, Danisovic L, Kubes M, Bakos D, Jarábek L, Ulicná M, Blasko M. Autologous biograft and mesenchymal stem cells in treatment of the diabetic foot. *Neuroendocrinology Lett.* 2006 Dec; 27 Suppl 2:134-7.
- 3- Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ. What is the future of diabetic wound care? *Diabetes Educ.* 2006 Mar-Apr; 32(2):197-210. Review.
- 4- Rezende KF, Nunes MAP, Melo NH, Malerbi D, Chacra AR, Ferraz MB. Internações por pé diabético: comparação entre o custo direto estimado e o desembolso do SUS. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2009; 52(3):523-30.
- 5- American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care.* 2008; 31 Suppl. 1:S62-S67.
- 6- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*: Report of the Expert Committee. *Diabetes Care.* 1997; 20:1183-1197.
- 7- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*: Follow-up report on the diagnosis of *diabetes mellitus*. *Diabetes Care.* 2003; 26:3160-3167.
- 8- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*: Report of the Expert Committee. *Diabetes Care.* 2010; 33:S1:S62-.S69
- 9- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Recommendation 2009. *Diabetes Care.* 2009; 32 Suppl 1:S13-S61.
- 10- Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Disorders of Carbohydrate and Lipid Metabolism. Type 2 *Diabetes Mellitus*. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polansky KS, Larsen PR editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2008. p.1329-89.

- 11- Dantas J R et al. Avaliação da função pancreática em paciente com diabetes melito tipo 1 de acordo com a duração da doença. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009; 53(1):64-71.
- 12- Saydah S.H, Fradkin J, Cowie C.C. Poor Control of Risk Factors for Vascular Disease Among Adults with Previously Diagnosed Diabetes. Jama. 2004; 291:335-42.
- 13- Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. Complications of *Diabetes Mellitus*. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polansky KS, Larsen PR editors. Williams Textbook of Endocrinology. 11th ed. Philadelphia: Saunders; 2008. p.1417-1501.
- 14- The Advance Collaborative Group. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med. 2008; 358:2560-72.
- 15- Sloten TTvan, Friederichs SAH,Huijberts MSP, Schaper NC. Diabetic foot: new insights into pathophysiology.Ned Tijdschr Genneskd.2008 Nov; 152(44):2400-5.
- 16- Apelqvist J, Bakker K, van Houtum WH, Schaper NC. International consensus and practical guidelines on the management and prevention on the diabetic foot. Diabetes Metab Res Rev. 2000: 16(S1):S84-S92).
- 17- Moustafa M, Simpson C, Glover M, Dawson RA, Tesfaye S, Creagh FM, Haddow D, Short R, Heller S, MacNeil S. A new autologous keratinocyte dressing treatment for non-healing diabetic neuropathic foot ulcers. Diabet Med. 2004 Jul; 21(7):786-9.
- 18- Lobmann R, Pittasch D, Mühlen I, Lehnert H. Autologous human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid for grafting in nonhealing diabetic foot lesions: a pilot study. J Diabetes Complications. 2003 Jul-Aug; 17(4):199-204.

- 19- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An Bras Dermatol.* 2003; 78(5):525-40.
- 20- Minatel DG, Enwemeka CS, França SC, Frade MAC. Fototerapia (LEDs 660/890nm) no tratamento de úlceras de perna em pacientes diabéticos: estudo de caso. *An Bras Dermatol.* 2009; 84(3):279-83.
- 21- Bayram Y, Deveci M, Imirzalioglu N, Soysal Y, Sengezer M. The cell based dressing with living allogenic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study. *Br J Plast Surg.* 2005 Oct; 58(7):988-96.
- 22- Han SK, Choi KJ, Kim WK. Clinical application of fresh fibroblast allografts for the treatment of diabetic foot ulcers: a pilot study. *Plast Reconstr Surg.* 2004; Dec; 114(7):1783-9.
- 23- 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.* 2001, 35(4):369-75.
- 24- Mandelbaum SH, Di Santis EP. Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol.* 2003; 78(4): 393-408.
- 25- Souto LR, Rehder J, Vassalo J, Cintra ML, Kraemer MH, Puzzi MB. Model of human skin (dermis + epidemis) reconstructed in vitro. *São Paulo 2006 Méd. J.*, Mar 2;124(2):71-6.
- 26- Kim MBM, Suzuki S, Nishimura Y, Um SC, Morota K, Maruguchi T. et al. Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. *Br J Plast Surg,* 1999; 52(7): 573-8.
- 27- Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52:443-51.
- 28- Hu S, Kirsner RS, Falanga V, Phillips T, Eaglstein WH. Evaluation of Apligraf persistence and basement membrane restoration in donor site wounds: a pilot study. *Wound Repair Regen.* 2006 Jul-Aug; 14(4):427-33.

- 29- Rehder J, Souto LR, Issa CM, Puzzi MB. Model of human epidermis reconstructed *in vitro* with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. *São Paulo Med J*, 2004; 122(1):22-5.
- 30- Margulis A, Zhang W, Garlick JA. *In vitro* fabrication of engineered human skin. *Methods Mol Biol*, 2004; 289: 61-70.
- 31- Bolívar-Flores YJ, Kuri-Harcuch W. Frozen allogeneic human epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. *Dermatol Surg*. 1999 Aug; 25(8):610-7.
- 32- Johnsen S, Ermuth T, Tanczos E, Bannasch H, Horch RE, Zschocke I, Peschen M, Schöpf E, Vanscheidt W, Augustin M. Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. *Vasa*. 2005 Feb; 34(1):25-9.
- 33- Cavallini M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. *Wound Repair Regen*. 2007 Jan-Feb; 15(1):35-8.
- 34- Hanft JR, Surprenant MS. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J Foot Ankle Surg*. 2002 Sep-Oct; 41(5):291-9.
- 35- Harvima IT, Virnes S, Kauppinen L, Huttunen M, Kivinen P, Niskanen L, Horsmanheimo M. Cultured allogeneic skin cells are effective in the treatment of chronic diabetic leg and foot ulcers. *Acta Derm Venereol*. 1999 May; 79(3):217-20.
- 36- Han SK, Kim HS, Kim WK. Efficacy and Safety of Fresh Fibroblast Allografts in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. *Dermatol Surg*. 2009; 35:1342-8.

## **9- ANEXOS**

## APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE  
HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

### Formulário de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Data da Aprovação: 13/11/2006

Título do Protocolo: "Terapia Celular com Implantes Autólogos de Células Dêrmicas e Epidérmicas e Pele Humana Reconstruída "in vitro" em Úlceras Cutâneas de Pacientes Diabéticos".

Investigador Principal: Marcelo Mattos e Dinato

### Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Em reunião de 13 de novembro de 2006 o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Guilherme Álvaro, AVALIOU o protocolo de estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referentes ao Protocolo de Pesquisa supra citado, que será conduzido na Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Guilherme Álvaro e o APROVOU, constando em ata.

Conforme resolução 196/96 – item IV.2d, deverá ser entregue uma cópia na íntegra do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao sujeito da pesquisa, após obtenção do mesmo. Atentar para item IV.1f desta resolução, onde determina que o sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

As modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas a este Comitê de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas (Res 196/96).

Solicitamos que sejam apresentados a este Comitê, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa bem como informações relativas a modificações da mesma, efeitos adversos, cancelamento, encerramento, destino dos conhecimentos obtidos e relatório final, conforme a resolução 196/96.

Data prevista para entrega do 1º relatório: maio/2007



Dr. Érico Paulo Heilbrun  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Guilherme Álvaro

Nota: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Guilherme Álvaro não autoriza a realização de nenhuma fase do Protocolo de Pesquisa antes da obtenção da aprovação.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Guilherme Álvaro  
Rua Ovidio Cruz 197 - Banguinhos - Santos - SP  
CEP 11045-904 - Telefone: 55 1332071306  
Horário de funcionamento: 2ª a 6ª feira das 09 às 12h  
Secretária: Kelly

## DECLARAÇÃO SOBRE OS PROCEDIMENTOS DO ESTUDO



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE SAÚDE DO INTERIOR  
HOSPITAL GUILHERME ÁLVARO

### DECLARAÇÃO SOBRE OS PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

**Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado:** “Terapia celular com implantes autólogos de células dérmicas e epidérmicas e pele humana reconstruída “in vitro” em úlceras cutâneas de pacientes diabéticos”

Eu, **Dr. Marcelo Mattos e Dinato**, CRM n.º 112676, Pesquisador Responsável pelo presente Projeto de Pesquisa declaro que a etapa de retirada dos fragmentos de pele (biópsia), bem como todo o acompanhamento médico e a etapa de enxertia (enxerto de pele) serão realizadas no Hospital Guilherme Álvaro, porém a etapa de preparo da pele retirada do paciente será realizada no Laboratório de Cultura de Células da Pele da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Campinas), conforme descrito no protocolo.

**Dr. Marcelo Mattos e Dinato**  
**Pesquisador Responsável pelo Estudo**  
**Data: 13/11/2006**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu (Nome Completo),.....  
Portador da carteira de identidade número....., nascido em ...../...../.....,  
na Cidade de ....., Estado de .....,  
Residente na rua.....,Número, .....  
na Cidade de ..... Estado:.....,  
Telefone:.....,declaro estar ciente de que participarei de um projeto de  
pesquisa para o tratamento de úlceras de perna “Terapia Celular com Implantes  
Autólogos de Células Dérmicas e Epidérmicas e Pele Humana Reconstruída “in vitro”  
em Úlceras Cutâneas de Pacientes Diabéticos”, sob responsabilidade do Dr Marcelo  
Mattos e Dinato.

Este tratamento consiste na retirada de um fragmento de pele da região  
ingüino-crural (“virilha”), o que será feito com anestesia local e posterior sutura. Esta  
pele será preparada (em torno de trinta dias) e após esse preparo será feito o implante  
sobre a úlcera.

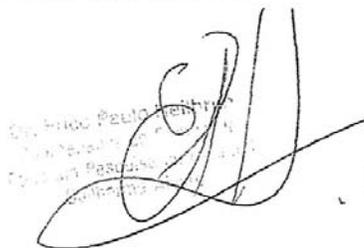
A possibilidade de fechamento das úlceras é de 70%. Para os pacientes  
que não obtiverem sucesso com esta terapêutica, serão instituídas medidas adequadas  
(tratamento convencional).

Fui informado e orientado quanto à pesquisa, que terei a garantia do  
esclarecimento de qualquer dúvida sobre os assuntos relacionados a esta pesquisa, e que  
tenho assegurado o direito ao sigilo sobre estas informações, e que minha identificação  
não será exposta nas conclusões e publicações deste trabalho. Também estou ciente da  
possibilidade de interromper o tratamento, se necessário, por motivos particulares e/ou  
relacionados à pesquisa .

Dr. Marcelo Mattos e Dinato  
Médico Dermatologista  
Hospital Guilherme Álvaro  
Endereço: Rua Oswaldo Cruz, 197  
Santos – SP – CEP: 11045-904  
Tel (13) 3202-1392  
Fax: (13) 3222-3115

Santos, de de

-----  
Paciente ou responsável



A handwritten signature in black ink is written over a faint, circular stamp. The stamp contains text that is mostly illegible but appears to include 'TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO' and 'PACIENTE RESPONSÁVEL'.

## **10- APÊNDICES**

## FICHA CONTROLE: AUTO ENXERTO DE QUERATINÓCITOS

NOME: \_\_\_\_\_

Nº Registro \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( ) Nº Controle \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

HPMA: \_\_\_\_\_

ISDA: Doenças de Base ou Associadas:

Cardiopatias: \_\_\_\_\_

Diabetes: \_\_\_\_\_

Insuf. Renal: \_\_\_\_\_

Insuf. Hepática \_\_\_\_\_

Insuf. De safena ao Doppler: \_\_\_\_\_

Outras: \_\_\_\_\_

Doenças Infecto Contagiosas: \_\_\_\_\_

Medicações em uso: \_\_\_\_\_

Sobre a Úlcera: Tempo de existência: \_\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_ Tamanho (Diâmetro): \_\_\_\_\_

Tratamentos Anteriores: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Características (fundo, bordas): \_\_\_\_\_

Sobre o tratamento: retirada do fragmento: Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Uso de medicação: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Complicações: \_\_\_\_\_

Preparo da Úlcera: Medicação usada: \_\_\_\_\_

Cuidados: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Sobre o Auto-enxerto: Quantidade em ml: \_\_\_\_\_

Quantidade de nº células: \_\_\_\_\_

Quantidade de úlceras tratadas: \_\_\_\_\_

Localização: \_\_\_\_\_

Evolução da Úlcera: Dia Tratamento: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Fechamento em mm: \_\_\_\_\_ Diâmetro: \_\_\_\_\_

Complicações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Orientações

- Manter repouso absoluto com a perna reta, não deixar a perna pendente;
- Não andar até liberação médica;
- Não mexer no curativo, deixar o curativo sempre fechado;
- O curativo pode vaziar uma secreção amarelada ou esverdeada ou sanguinolenta (tipo caldo de carne), porém é normal. Caso isso aconteça pode ser passado uma nova faixa sobre o curativo sem apertar e tomando cuidado para não achatar a parte saliente do curativo;
- O curativo pode apresentar um odor forte caso comece a sair secreção, isso é normal, mesmo assim mantenha-o fechado;
- Em caso de qualquer problema entre em contato com o Dr. Marcelo através do telefone 32021392 (Centro de Pesquisa Clínica) ou pelo celular 81294243 ou com a Márcia através do celular 81251225.