



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PAULA TAVARES COLPAS

**TERAPIA CELULAR COM CULTURAS DE FIBROBLASTOS ASSOCIADAS AO
USO DE MEMBRANAS CONSTITUÍDAS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM
POLISSACARÍDEOS ANIÔNICOS EM PACIENTE COM ÚLCERAS
CUTÂNEAS**

CAMPINAS

2015

PAULA TAVARES COLPAS

**TERAPIA CELULAR COM CULTURAS DE FIBROBLASTOS ASSOCIADAS AO
USO DE MEMBRANAS CONSTITUÍDAS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM
POLISSACARÍDEOS ANIÔNICOS EM PACIENTES COM ÚLCERAS
CUTÂNEAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, Área de
Concentração em Clínica Médica

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Beatriz Puzzi

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA PAULA TAVARES COLPAS, E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. MARIA BEATRIZ PUZZI.

CAMPINAS

2015

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C719t Colpas, Paula Tavares, 1981-
Terapia celular com culturas de fibroblastos associadas ao uso de membranas constituídas de quitosana complexada com polissacarídeos aniônicos em pacientes com úlceras cutâneas / Paula Tavares Colpas. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Maria Beatriz Puzzi.
Coorientador: Ângela Maria Moraes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. 2. Fibroblastos. 3. Polissacarídeos. 4. Úlcera cutânea. 5. Dermatomiosite. 6. Calcinose. 7. Quitosana. I. Puzzi, Maria Beatriz, 1950-. II. Moraes, Ângela Maria, 1966-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Cell therapy in patient with skin ulcers cultured fibroblasts associated with membranes obtained by combination of chitosan to anionic polysaccharides

Palavras-chave em inglês:

Cell- and tissue-based therapy

Fibroblasts

Polysaccharides

Skin ulcer

Dermatomyositis

Calcinosis

Chitosan

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Maria Beatriz Puzzi [Orientador]

Simone Appenzeller

Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

Data de defesa: 04-12-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO DE

PAULA TAVARES COLPAS

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Beatriz Puzzi

MEMBROS

1- Prof^a Dr^a Maria Beatriz Puzzi

2- Prof^a Dr^a Simone Appenzeller

3- Prof^a Dr^a Maria Carolina de Oliveira Rodrigues

**Programa de Pós Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

**A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca
examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna.**

Data defesa: 04/12/2015

Dedicatória

A meus pais

José Edson Colpas e Nair Tavares Colpas

*Que não mediram esforços em me dar uma ótima educação, dentro e fora de casa,
pelo apoio e dedicação em todos esses anos!*

Agradecimentos

Uma das partes mais difíceis dessa dissertação... Colocar no papel sentimentos por pessoas tão importantes tanto nesse trabalho, como na minha vida...

A meus pais, pelo esforço, carinho e apoio incondicional em toda a minha trajetória!

A meus irmãos: Marcos, Flávia e Carla, por todas as ajudas, tanto nesse trabalho, como em toda a minha vida! Com certeza vocês são fundamentais na minha vida!

A minha cunhada, Carolina, que ajudou nas fotos e minhas sobrinhas Marina e Isabella pelos momentos de distração...

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Beatriz Puzzi, que durante todos esses anos, desde a graduação, não desistiu da realização de um sonho e me deu autonomia nas escolhas de meus pacientes, mesmo não concordando com elas...

À minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes, pela coragem de orientar uma médica, que não tem tempo de ficar a semana toda no laboratório, e mesmo assim me apoiar no estudo.

Ao Paulo César Martins Alves, pessoa essencial para o desenvolvimento desse trabalho. Meu braço esquerdo e direito! Sem você essa pesquisa seria impossível. Muito obrigada pelas horas no laboratório, pelos finais de semana me ajudando e por acreditar nesse nosso projeto!

À Adriana Feltrin, por acreditar no meu trabalho e me encaminhar seus casos mais fáceis...rs

Ao Rodrigo (Bauru), pela amizade, pelo apoio, pela disponibilidade, por me ouvir e por pedir para a Adriana me encaminhar os pacientes.

À Simone, por encaminhar-me os pacientes mais fáceis e simples do seu ambulatório, confiando em mim e nesse projeto.

À Dra Maria Letícia Cintra e à Lucinha, por fazerem a microscopia eletrônica e ajudarem na interpretação dos dados.

À Carolina Caliarí Oliveira, pela ajuda no final do projeto.

Às meninas da Engenharia Química, por preparem todas as membranas utilizadas nesse trabalho, especialmente à Ana Luiza Pires, por toda a ajuda, mesmo nos finais de semana.

À XL Medicina Unicamp, especialmente à Turma C, por todos esses anos de amizade.

À balinha (Elis, Jean, Niterói, Tati e Tici)! Vocês são muito importantes, especiais e essenciais na minha vida!

Ao Tridil (Ana Carla, André e Flavinha) pela amizade, apoio e aprendizado nos anos de residência e até hoje!

As minhas R3: Carol, Gisele, Mari e Vanessa e ao Bruno pelo companheirismo e amizade de todos esses anos!

À Elayne e Isabelli, pelos momentos de risadas necessárias...

À Anabel e o Fábio, por entenderem meus dias de bom humor e mesmo assim me tolerarem...

Um especial agradecimento aos pacientes e seus parentes, que mesmo sofrendo, sem saber se o tratamento funcionaria, acreditaram e se disponibilizaram a me ajudar. Muito obrigada!

A todos que fizeram parte, seja direta ou indiretamente, meu muito obrigado!

Mesmo que a palavra “obrigado” signifique tanto, não é o suficiente para agradecer a todos por todo o esforço, apoio, paciência e dedicação!

“Muitas vezes, o que aparentemente é um fracasso, pode ser exatamente a razão de um grande sucesso futuro.

Tentar várias vezes é fundamental para o sucesso na ciência e na vida.

As pessoas de sucesso são sempre as pessoas que tiveram a coragem de tentar.”

(autor desconhecido – entregue a mim pela minha avó Alda Bruschetta Tavares, quando pelo terceiro ano não passei no vestibular...)

RESUMO

Dermatomiosite juvenil (DMJ) é uma doença multissistêmica, sendo a calcinose frequente e, normalmente, associada ao prognóstico favorável, porém incapacitante. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial da terapia celular com culturas de fibroblastos associadas a membranas de quitosana (Q), alginato (A) e xantana (X) em paciente com DMJ com calcinose e úlceras de pele. Apresenta-se um grave caso de DMJ com calcinose universal e ulcerações cutâneas em paciente de 18 anos, em tratamento convencional, sendo submetido à nova terapêutica para úlceras crônicas. Culturas de fibroblastos autólogos (para minimizar o risco de rejeição) foram obtidas de biópsia cutânea e aplicadas diretamente nas úlceras com cola de fibrina, sem prévio desbridamento, e cobertas com membranas Q-A ou Q-X, produzidas complexando-se os polissacarídeos em condições controladas de taxa de adição, mistura, temperatura e secagem, sendo que as de Q-A foram adicionalmente reticuladas com íons cálcio. O paciente foi submetido ao total de 7 aplicações. Melhora completa e sustentada da dor foi referida nas primeiras 12 horas, com início da cicatrização em 2 dias. Obteve-se cicatrização das úlceras acima de 89%, inclusive com melhora na calcinose. As membranas conferem à lesão cobertura mecânica que as protege do contato com contaminantes externos e previne a perda excessiva de líquido. Concluiu-se que a terapia celular autóloga associada à aplicação das membranas, como um tratamento adjuvante à DMJ, mostrou-se efetiva no tratamento das úlceras deste paciente, com melhora significativa na sua qualidade de vida. Essas células podem ser criopreservadas e utilizadas quando necessário. Trata-se de procedimento ambulatorial e de simples aplicação, com grande potencial de uso em casos correlatos.

Palavras-chaves: Terapia baseada em transplante de células e tecidos, Fibroblastos, Polissacarídeos, Úlcera cutânea, Dermatomiosite, Calcinose, Quitosana.

ABSTRACT

Juvenile dermatomyositis (JDM) is a multisystem disorder presented frequently with calcinosis and is usually associated with a favorable prognosis for life but functional disability may be severe. The objective of this study was to evaluate the therapeutical potencial of cell therapy with autologous cultures of fibroblasts covered by membranes of chitosan (C), alginate (A) and xanthan gum (X) in the treatment of JDM with calcinosis and skin ulcers. A severe case of JDM of an 18-year-old patient with calcinosis and ulcerations is presented. He was submitted to a new treatment for chronic wounds. An autologous fibroblasts culture (to minimize the risk of rejection) was obtained of a skin biopsy and applied directly on the ulcers, without previous debridement, using commercial fibrin glue and C-A or C-X membranes covered the cells and the glue. A total of seven applications were necessary. Twelve hours after the application, complete resolution of pain was reported and within 2 days, beginning of the healing process. Wound closure above 89% was achieved, with improvement also on calcinosis. JDM is a rare and difficult systemic autoimmune condition of childhood. Cutaneous manifestations can be serious and challenging to treat, and may progress to ulcerative disease and subcutaneous calcification, impacting in quality of life, as seen in the patient evaluated. Autologous cell therapy associated with polysaccharides membranes is an effective treatment for skin ulcers and could be an adjuvant treatment for JDM. These cells can be cryopreserved and eventually used in new implants. The procedure is simple and can be performed in ambulatorial conditions, resulting in significant improvement in this patient's quality of life.

Keywords: Cell- and tissue-based therapy, Fibroblasts, Polysaccharides, Skin ulcer, Dermatomyositis, Calcinosis, Chitosan.

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema das camadas da pele	17
Figura 2: Fases da cicatrização	25
Figura 3: Fatores que influenciam a deposição e quebra da fibrina	40
Figura 4: Etapas do cultivo de fibroblastos	48
Figura 5: Preparação membrana quitosana-alginato	50
Figura 6: Esquema preparação membrana quitosana-xantana	51
Figura 7: Aplicação das células e da cola de fibrina	53
Figura 8: Colocação da membrana após aspersão da cultura celular com a cola	53
Figura 9: Fragmento de derme e cultura de fibroblastos inicial – 10 dias	59
Figura 10: Cultura fibroblastos – 30 dias	59
Figura 11: Microscopia eletrônica de transmissão	60
Figura 12: Evolução da úlcera – joelho direito porção lateral	61
Figura 13: Evolução da úlcera – joelho direito porção lateral – semana 0 e semana 79.....	62
Figura 14: Evolução da úlcera – joelho esquerdo porção medial	63
Figura 15: Evolução da úlcera – joelho esquerdo porção medial – semana 0 e semana 79.	64
Figura 16: Gráfico da evolução das úlceras	65
Figura 17: Comparação da análise das respostas do SF-36 inicial e final	83
Figura 18: Apresentação da comparação do Raw Scale inicial e final	84

Lista de Tabelas

Tabela 1: Guia para substitutos biológicos para pele	29
Tabela 2: Ponderação dos dados SF-36	54
Tabela 3: Valores para cálculo do Raw Scale SF-36	58
Tabela 4: Porcentagem de reepitelização das úlceras ao final do tratamento	65
Tabela 5: Conversão dos dados das respostas do dia 19/02/2014 para os escores finais (SF-36)	80
Tabela 6: Conversão dos dados das respostas do dia 07/10/2015 para os escores finais (SF-36)	81
Tabela 7: Comparação do Raw Scale no início e final do tratamento	83

Lista de Abreviaturas

- AAS** – ácido acetil salicílico
- AVC** – acidente vascular cerebral
- CCVUQ** – Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire
- CEAP** - (C) clínica, (E) etiologia, (A) anatomia, (P) patologia
- CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa
- CIPED** - Centro de Investigação em Pediatria
- CNS** - Conselho Nacional de Saúde
- DM** – diabete melitus
- DMJ** – dermatomiosite juvenil
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra acético
- FCM** - Faculdade de Ciências Médicas
- FCs** - fatores de crescimento
- FEQ** - Faculdade de Engenharia Química
- GAGs** – glicosaminoglicanos
- GALT** - tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
- HAS** – hipertensão arterial sistêmica
- HC** - Hospital das Clínicas
- LCCP** - Laboratório de Cultura de Células da Pele
- MEC** - matriz extracelular
- MIN** – minutos
- PMN** – polimorfonucleares
- QA** – membrana de quitosana e alginato
- QAS** – membrana de quitosana, alginato e silicone
- QX** – membrana de quitosana e xantana
- RPM** - rotações por minuto
- SUS** – Sistema Único de Saúde
- TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UER** – Unidade de Emergência Referenciada
- UNICAMP** - Universidade Estadual de Campinas
- UTI** – Unidade de Terapia Intensiva

Sumário

1- Introdução	17
1.1- A pele	17
1.2- Úlceras crônicas	19
1.3- Dermatomiosite	21
1.4- Calcinose	22
1.5- Processo de cicatrização	23
1.6- Terapia celular	26
1.7- Cola de fibrina	28
1.8- Matrizes poliméricas para o recobrimento de lesões.....	40
2- Justificativa e Hipótese	43
3- Objetivos.....	45
3.1- Objetivos Gerais.....	45
3.2- Objetivos Específicos	45
4- Materiais e Métodos	46
4.1- Paciente e Local do Estudo	46
4.2- Coleta de material	46
4.3- Preparação das amostras de pele para cultura celular	47
4.4- Cultura de fibroblastos	47
4.5- Preparação das membranas.....	49
4.6- Microscopia eletrônica de transmissão.....	52
4.7- Aplicação das células e seguimento do paciente.....	52
4.8- Análise dos dados	54
4.9- Aplicação de questionários sobre qualidade de vida	54
4.9.1-Ponderação dos dados (SF-36).....	54
4.9.2- Cálculo Raw Scale (SF-36).....	57

5-	Resultados.....	59
5.1-	Característica da cultura de fibroblastos provenientes do paciente portador de DMJ.....	59
5.2-	Análise do material estudado por microscopia eletrônica.....	60
5.3-	Caso clínico	60
5.4-	Terapêutica Adotada.....	61
5.5-	Respostas dos questionários qualidade de vida	66
5.5.1-	CCVUQ.....	66
5.5.2-	SF-36.....	71
6-	Discussão	85
7-	Conclusão.....	89
7.1-	Sugestão para trabalhos futuros.....	90
8-	Referências Bibliográficas	91
9-	Anexos	104
9.1-	Autorização para uso da Figura 2	104
9.2-	Autorização para uso da Figura 3	107
9.3-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	111
9.4-	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	121
9.5-	Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire (CCVUQ).....	125
9.6-	Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida -SF-36.....	128

1.Introdução

1.1 – A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo que, em um adulto de 70 Kg, cobre uma área de aproximadamente 2 m², pesando por volta de 5 Kg. Consiste de uma epiderme celular estratificada sobre uma derme de tecido conjuntivo. Abaixo, encontra-se o tecido subcutâneo, que é separado do restante do corpo por uma camada de músculo estriado vestigial (McGrath e Uitto, 2010). A estrutura típica da pele é ilustrada na Figura 1.

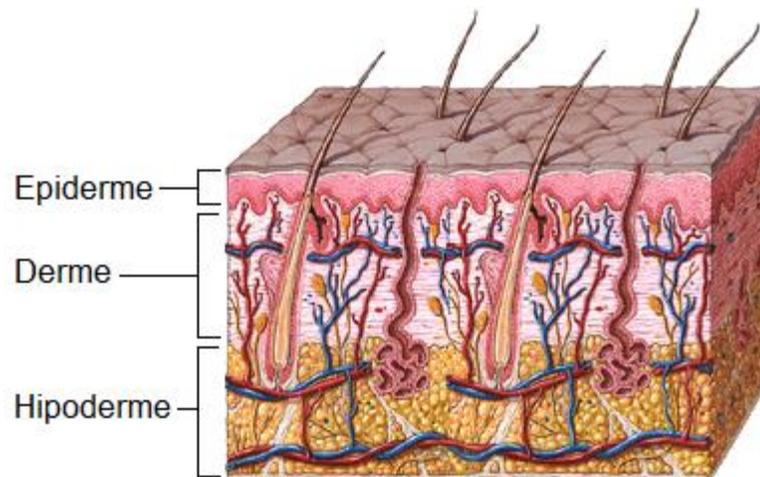


Figura 1: esquema das camadas da pele (imagem adaptada da National Library of Medicine, EUA, 2014).

A epiderme é constituída principalmente por queratinócitos e tem de 0,05 a 1 mm de espessura (McGrath e Uitto, 2010). Contêm na camada germinativa (camada basal), os queratinócitos, que garantem a sua renovação, e os melanócitos, células responsáveis pela pigmentação da pele, os quais sintetizam melanina, a qual é progressivamente transferida aos queratinócitos (Watt, 1988 *apud* Souto, 2005; McGrath e Uitto, 2010). Durante a diferenciação epidérmica, os queratinócitos sofrem

modificações morfológicas e biológicas. A partir da camada basal, eles movem-se através das camadas espinhosa e granulosa e se fixam na camada mais superficial (córnea), constituindo então estruturas multilamelares de corneócitos anucleados, circundados por lipídeos extracelulares (Taube *et al.*, 2000; Boranic *et al.*, 1999; Watt, 1998; Eckert *et al.*, 1997 *apud* Souto, 2005; McGrath e Uitto, 2010).

A epiderme é ligada à derme por uma complexa rede de proteínas e glicoproteínas que se estendem de dentro dos queratinócitos basais para a superfície da derme. Além da adesão, os componentes da junção dermo-epidérmica também contribuem para a migração celular (por exemplo, durante a fase de cicatrização), como também um sinalizador de eventos epiteliais-mesenquimais (McGrath e Uitto, 2010).

A epiderme serve como barreira mecânica contra agentes externos. As células de Langerhans apresentam função imunológica, reconhecendo antígenos e os apresentando a linfócitos T. Os melanócitos, através da produção de melanina, são protetores naturais contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta. Os queratinócitos são responsáveis pelo processo de queratinização. A formação de filamentos de queratina, em associação com desmossomos, hemidesmossomos e a membrana basal possibilitam a integridade estrutural (Urmacher, 1997 *apud* Souto, 2005).

A derme é uma matriz de suporte que contém polissacarídeos e proteínas, apresentando alta capacidade de retenção de água. Sua espessura varia de 0,05 a 5 mm. Apresenta dois tipos principais de fibras protéicas: colágeno e tecido elástico, cujas características e distribuição garantem-lhe a consistência física (textura e elasticidade) (Huang *et al.*, 1998 *apud* Souto, 2005; McGrath e Uitto, 2010) .

Quanto à função, a derme fornece o suporte mecânico, rigidez, e espessura da pele. Encontram-se as células dendríticas, macrófagos e mastócitos, com funções imunológicas, que reagem a estímulos inflamatórios e participam da cicatrização de úlceras. Os vasos sanguíneos dérmicos, além de fornecerem nutrição para a pele, estão envolvidos na termorregulação, função que é compartilhada com as glândulas sudoríparas. Pequenos e grandes plexos nervosos participam da inervação de diferentes órgãos cutâneos que são responsáveis pela detecção da dor, pressão e variações de temperatura (Urmacher, 1997 *apud* Souto, 2005).

1.2- Úlceras Crônicas

As úlceras cutâneas são rupturas estruturais ou fisiológicas no tegumento que incitam respostas de reparação. Quando lesada, a pele se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescentes (Jansson *et al.*, 2001).

Úlceras crônicas são, por definição, lesões que tiveram falhas para progredirem nas etapas normais da cicatrização, portanto entrando em um estado patológico de inflamação. Como resultado, o processo de cicatrização é atrasado, incompleto e não continua de maneira coordenada, subseqüentemente resultando em um desfecho anatômico e funcional inadequado. Essas úlceras são as maiores causas de incapacidades e são caracterizadas pela cronicidade e frequência de recidivas (Menke *et al.*, 2007).

Não foram localizados estudos de larga escala que examinem a prevalência e o custo econômico das úlceras crônicas. Nos Estados Unidos, a prevalência dos três maiores tipos de úlceras crônicas é estimada entre 3 a 6 milhões de pessoas, sendo 85% em indivíduos acima de 65 anos, resultando em custo estimado de US\$ 3 bilhões por ano (Menke *et al.*, 2007).

A prevalência de úlceras de perna na Europa é bem documentada, variando entre 0,18% e 1% nos diferentes países. No Reino Unido, dois grandes estudos demonstraram que a prevalência de úlceras ativas é de 0,15 a 0,18% em contraste com o 1% dos países escandinavos. As úlceras de perna ocorrem mais comumente em idosos e sua prevalência irá aumentar à medida que ocorre o envelhecimento da população (Sakar e Ballantyne, 2000).

O tratamento de úlceras crônicas soma um grande ônus financeiro em todo o mundo, com um gasto estimado no Reino Unido de um bilhão de libras por ano (Martin *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos, os custos variam de US\$ 775 milhões a US\$ 1 bilhão ao ano (Philips, 1994 *apud* Frade, 2003).

Sobre a prevalência ou o número de pacientes com úlceras de perna em nosso país, poucos são os trabalhos publicados de características nacionais. Maffei *et al.* (2002 *apud* Frade, 2003), num estudo na região de Botucatu (SP) encontrou alta frequência de úlceras venosas nos pacientes varicosos, frequentemente desencadeadas por trauma. Os autores atribuíram essa alta frequência à ausência de tratamento e pouco cuidado com os varicosos na população de nível socioeconômico baixo. Na região de Belo Horizonte (MG), Cabral (2000) também encontrou alta prevalência (2,6%) de úlceras venosas cicatrizadas ou abertas (classe CEAP 5 e 6, na qual C refere-se a clínica, E a etiologia, A a anatomia e P a patologia). Nos EUA, estima-se que 600.000 pessoas sofram de úlcera venosa (Philips *et al.*, 1991 *apud* Frade, 2003). Em alguns estudos, a úlcera venosa mostra-se como a segunda causa de ausência no trabalho, seguida do resfriado (Philips *et al.*, 1994; Gourdin *et al.*, 1993 *apud* Frade, 2003). Em um estudo de Abbade *et al.* (2005), em pacientes com úlcera venosa com idade média de 57 anos, 35% deles estavam aposentados, 16,1% afastados do trabalho devido a úlceras, 2,5% recebendo auxílio-doença, e 4,2% desempregados. Entretanto não existem dados nacionais ou regionais a respeito da incidência e prevalência da doença no país.

Dentre as úlceras crônicas, as queimaduras estão associadas a altas taxas de mortalidade, que variam entre 5 a 100%, dependendo principalmente da superfície corporal queimada (De Souza *et al.*, 1998). Falência múltipla de órgãos é a causa mais frequente de morte, com síndrome da resposta inflamatória sistêmica e infecções frequentemente associadas. Em pacientes com queimaduras extensas, as úlceras cutâneas são um local comum de infecções e escaras persistentes perpetuam a resposta inflamatória. Portanto, retirada precoce das áreas queimadas e curativo permanente continua sendo um fator para a diminuição da morbidade e mortalidade, sendo eficaz em pacientes sem lesões respiratórias (Gómez *et al.*, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, os acidentes que causam queimaduras estão entre os cinco mais comuns no país, com média mensal de atendimento de 2300 pessoas somente no SUS. Considerando, então, os atendimentos feitos nos demais locais e os casos nos quais não se procura auxílio profissional, o número é

potencialmente maior. De todas as internações por causas externas contabilizadas pelo SUS no ano de 2000, as queimaduras foram responsáveis por 28843 internações, o que corresponde a 4,4% do total (Gawryszewski *et al.*, 2000).

Algumas doenças autoimunes também são responsáveis por úlceras crônicas, contribuindo, assim, para o aumento dos custos no SUS. Entre elas, pode ser citada a dermatomiosite juvenil.

1.3- Dermatomiosite Juvenil

Dermatomiosite juvenil é uma doença autoimune rara, geralmente crônica, de início na infância, que afeta, principalmente, os músculos proximais e a pele, podendo comprometer múltiplos órgãos (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012).

Sua etiologia não é completamente conhecida, sendo sugerido que surge por complexas ações da disfunção imunológica, resultante do estímulo ambiental em pacientes susceptíveis (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012). Entre os fatores genéticos, pode ser citada a presença dos alelos HLA-B*08, DRB1*0301, DQA1*0501 e DQA1*0301, considerada um fator de risco adicional ao desenvolvimento da DMJ (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012). Além disso, alteração na expressão da queratina 14 (Wei *et al.*, 2015) e deficiência de complemento C4 e C4a (Lintner *et al.*, 2015) também são descritas na etiopatogênese da doença. Infecções por estreptococos β hemolítico, coxsackievirus, *Toxoplasma spp*, echovirus e parvovírus, além de gatilhos ambientais como exposição solar, uso de determinadas medicações e vacinação agiram como estímulos ambientais no desenvolvimento da patologia (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012).

O tratamento é realizado com drogas imunossupressoras, entretanto, 30% dos pacientes não apresentam controle adequado da doença (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012; Shinjo e Souza, 2013; Hoeltzel *et al.*, 2014; Meher *et al.*, 2014).

A DMJ pode estar associada à calcinose cutânea, tanto localizada como generalizada.

1.4- Calcinose

A calcinose é um depósito de cálcio que ocorre na pele e no tecido subcutâneo, afetando entre 20-70% dos pacientes com dermatomiosite juvenil. Normalmente é dolorosa, levando a quadros recorrentes de inflamação e infecção nos locais afetados (Valenzuela *et al.*, 2014). Sua patogenia não está totalmente esclarecida (Hoeltzel *et al.*, 2014), porém alguns mecanismos são propostos, como a liberação do cálcio mitocondrial das células musculares danificadas pela miosite. Macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e alterações nas proteínas reguladoras do cálcio parecem também estar envolvidos. Além desses fatores, alguns autoanticorpos são mais frequentemente vistos em pacientes com DMJ e calcinose, como NXP-2, MDA-5 e TIF1- γ (Valenzuela *et al.*, 2014).

Sua apresentação varia de pequenos nódulos localizados a grandes lesões debilitantes que envolvem grandes áreas corporais. Essas lesões podem ulcerar e expelir uma substância semelhante a giz, composta de sais de cálcio (Gutierrez Jr e Wetter, 2012). A gravidade parece ser decorrente da demora ao tratamento, resposta não adequada à terapêutica e ao polimorfismo do TNF- α -308 (Martin *et al.*, 2012).

A calcificação, na DMJ, é distrófica, ocorrendo em locais de tecidos lesados, normalmente com níveis séricos de cálcio e fósforo normais. Os locais frequentemente afetados são: cotovelos, joelhos, tronco, mãos, pés, glúteos e face, podendo, porém, comprometer qualquer local do corpo (Hoeltzel *et al.*, 2014).

Não existe um padrão ouro de tratamento, no entanto diversas medicações podem ser utilizadas com respostas variáveis. Entre essas terapêuticas, podem ser citadas: imunoglobulina, ciclosporina, diltiazem, rituximab, warfarina, talidomida, infliximab (Hoeltzel *et al.*, 2014), pamidronato (Palaniappan *et al.*, 2014), alendronato (Hoeltzel *et al.*, 2014; Cañas *et al.*, 2015), etidronato mais cimetidina (Wakabayashi *et al.*, 2015).

1.5- Processo de cicatrização

O processo de cicatrização de uma úlcera é uma complexa sequência de eventos iniciada quando o ferimento ocorre e finalizada com o completo fechamento da lesão sendo acompanhada por uma organização cicatricial funcional. A cascata de cicatrização pode ser dividida em 4 fases: a) hemostasia, b) inflamação, c) proliferação/reparação e d) remodelamento (Holloway *et al.*, 2012). Destaca-se, entretanto, que essa divisão é apenas didática, pois ocorre uma sobreposição das fases.

a) Hemostasia:

Após um dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes incitam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular. Ocorre agregação e degranulação de plaquetas, que ativam o fator XII, resultando em formação de coágulo e hemostasia. Isso é fundamental para preservar a integridade do sistema circulatório. Um coágulo de fibrina é formado, agindo como uma matriz preliminar, onde as plaquetas secretam fatores de crescimento (FCs), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC), facilitando a migração celular. Após isso, inicia-se a fibrinólise, permitindo que se passe para a próxima fase (Oliveira e Dias, 2012; Holloway *et al.*, 2012).

b) Inflamação:

Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Após a degradação do coágulo, os capilares se dilatam e se tornam mais permeáveis, ativando o sistema complemento e liberando inúmeros mediadores químicos. Nos três primeiros dias, predominam a exsudação e ação dos PMN e monócitos, responsáveis pela fagocitose de bactérias, produtos necróticos e liberação de enzimas líticas. O macrófago é a célula mais importante desta fase e permanece do terceiro ao décimo dia. Os linfócitos aparecem na lesão, aproximadamente após uma semana (Mandelbaum *et al.*, 2003; Holloway *et al.*, 2012).

A fibronectina, sintetizada por fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, adere simultaneamente, como uma cola, à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando como um mediador para interação entre o coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz extracelular (Mandelbaum *et al.*, 2003; Holloway *et al.*, 2012).

c) Proliferação/Reparação

Geralmente inicia-se no terceiro dia após o ferimento e perdura por algumas semanas (Holloway *et al.*, 2012). É caracterizada pela formação do tecido de granulação. Nessa fase ocorre a reepitelização pela migração de queratinócitos a partir das bordas das úlceras e dos anexos (Mandelbaum *et al.*, 2003). Esse novo tecido consiste em uma matriz de fibrina, fibronectina, proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e outras glicoproteínas (Holloway *et al.*, 2012). A proliferação de vasos (tecido de granulação) que ocorre nesta fase é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes e para a cicatrização. Desta forma, a fase proliferativa é dividida em reepitelização, fibroplasia e angiogênese (Mandelbaum *et al.*, 2003). Como o colágeno tipo III na ferida tem uma resistência à tensão diminuída, o paciente corre o risco de apresentar deiscência e abertura de pontos, mesmo em uma lesão previamente cicatrizada (Holloway *et al.*, 2012).

d) Maturação/Remodelamento

É a última fase da cadeia de cicatrização, normalmente inicia-se sete dias após a lesão tecidual, podendo durar um ano ou mais. É responsável pelo aumento da resistência à tensão e diminuição do tamanho da cicatriz. Ocorre a reestruturação da matriz extra-celular, com aumento de depósito e remodelação de colágeno, promovendo rigidez e resistência à tração à ferida (Holloway *et al.*, 2012). A neovasculatura local diminui, de forma que a área vai perdendo o eritema (Mandelbaum *et al.*, 2003). Três semanas após a lesão, a resistência à tensão é restabelecida para, aproximadamente, 20% do normal. Conforme a cicatrização se completa, atinge-se 70 a 80% da tensão de ruptura da pele normal (Mandelbaum *et al.*, 2003; Holloway *et al.*, 2012). Na Figura 2, mostra-se as fases da cicatrização, esquematicamente.

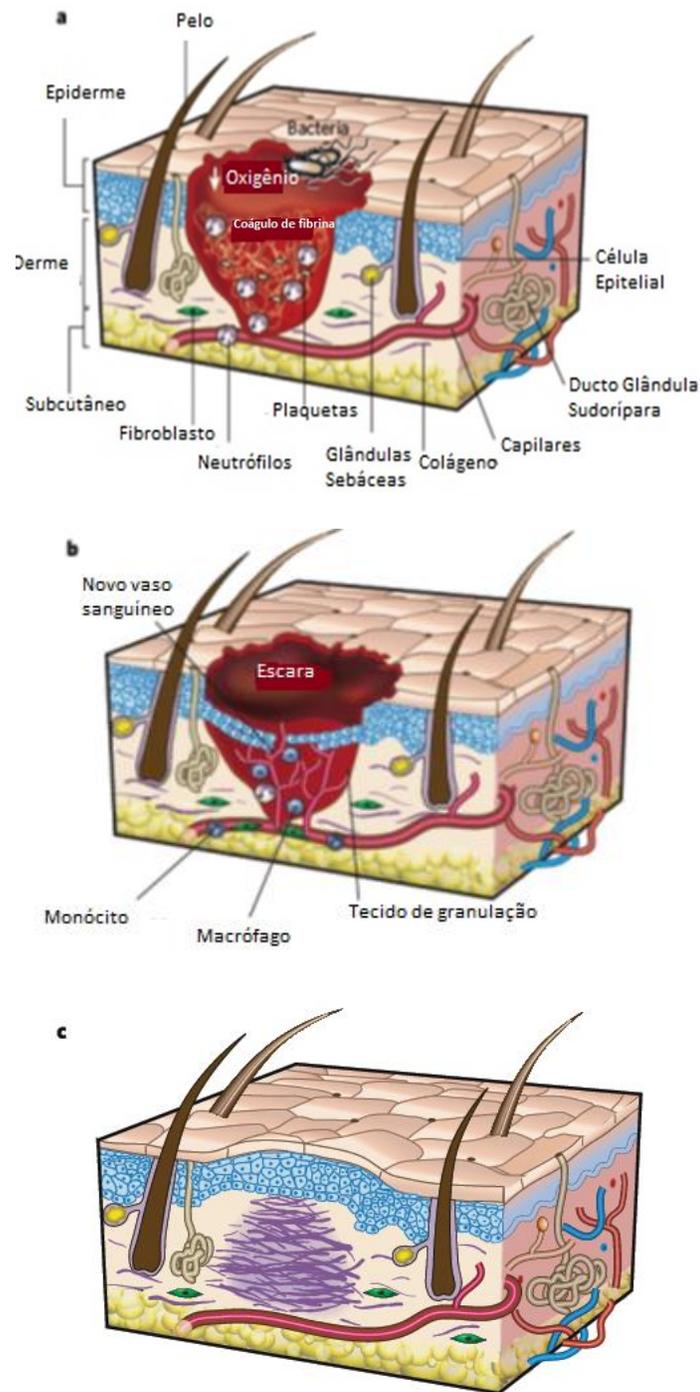


Figura 2: Fases da cicatrização – a) inflamação; b) proliferação; c) maturação (adaptado de Gurtner *et al.*, 2008, com autorização de Nature Publishing Group – número 3781301070959 – Anexo 9.1 - Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, (Gurtner *et al.*),copyright (2008).

1.6- Terapia Celular

Em lesões extensas e profundas da pele e mucosas pode ocorrer destruição da derme e dos elementos epidérmicos, resultando em um processo de reparo lento e sujeito a complicações. Nestes casos podem ser utilizados transplantes autólogos de pele, mas seu uso é limitado pelo tamanho da área doadora e pelas condições clínicas do paciente (Boranic *et al.*, 1999).

Dessa forma, o enxerto autólogo é o padrão-ouro para áreas queimadas, entretanto, encontra aplicação limitada no caso de em pacientes com extensas queimaduras. Os substitutos cutâneos feitos através de bioengenharia são úteis nesses casos. Entretanto, os produtos hoje existentes não são tão eficientes como o transplante autólogo (Gómez *et al.*, 2011). Para o manejo de extensas queimaduras cutâneas, a eficácia e segurança dos substitutos de pele não pode ser determinada, de acordo com revisão realizada por Pham *et al.* (2007).

Alotransplantes de cadáveres ou voluntários são rejeitados após uma ou duas semanas e fornecem somente cobertura temporária. Enxertos de pele humana ou animal, desvitalizados, liofilizados ou refrigerados em glicerol acomodam o tecido conjuntivo e estimulam o crescimento de vasos sanguíneos, mas, em geral, são degradados precocemente (Boranic *et al.*, 1999).

Visando solucionar o problema de pacientes com queimaduras em grande superfície corporal, portanto com áreas doadoras de pele escassas, inicialmente foi tentada a utilização de culturas de queratinócitos (Terskikh e Vasiliev, 1999) e fibroblastos (Boss *et al.*, 2000) cultivadas *in vitro*, autólogas ou não (Bolívar-Flores *et al.*, 1999), de forma isolada, sobre essas áreas. Foram desenvolvidos modelos de epiderme humana reconstruída *in vitro* (Pruniéras *et al.*, 1983; Régnier *et al.*, 1998), mas a utilização clínica de alguns desses modelos alcançou apenas sucesso parcial, em grande parte devido a problemas de retração do enxerto, decorrentes da falta de um leito dérmico (tecido conjuntivo) adequado (El-Sheemy *et al.*, 2001) ou da espessura fina do enxerto (Carsin *et al.*, 2000). Mais recentemente tem sido estudado o uso de células cultivadas *in vitro* associadas a meios de aderência (fixação) na pele (Ronfard *et al.*, 1991; Horch *et al.*, 1998; Horch *et al.*, 2001) e o uso de substitutos ou equivalentes

dérmicos contendo colágeno, associados a fibroblastos e queratinócitos autólogos cultivados *in vitro*, com melhores resultados (Kim *et al.*, 1999; Kremer *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 2001).

A obtenção de uma pele contendo derme e epiderme associadas, reconstruída com células obtidas a partir de um pequeno fragmento de pele e multiplicadas em laboratório, e que possa ser utilizada como enxerto, ainda é um objeto de investigação. A utilização de matrizes acelulares ou matrizes contendo colágeno para crescimento simultâneo de células dérmicas e epidérmicas tem mostrado resultados promissores (Archambault *et al.*, 1995; Auger *et al.*, 1998; Hoeller *et al.*, 2001). Observam-se, na literatura, diferentes estudos com a constante preocupação, não só de descreverem técnicas para se obter equivalentes de pele contendo elementos dérmicos e epidérmicos associados, mas também de demonstrarem a viabilidade clínica desses substitutos. Com a finalidade de correlacionar um modelo de pele ou substitutos e suas utilizações clínicas, as técnicas para obtenção *in vitro* devem ser devidamente padronizadas (Archambault *et al.*, 1995; Auger *et al.*, 1998; Hoeller *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado que a cultura simultânea de queratinócitos e fibroblastos seria uma abordagem mais adequada para reproduzir as características da pele humana *in vitro* do que a monocultura dessas células (Coulomb *et al.*, 1989; Auger *et al.*, 1998; Moll *et al.*, 1998).

O uso de suspensão de queratinócitos em uma matriz natural de cola de fibrina pode potencialmente tratar de uma variedade de defeitos de pele. Tanto em queimaduras agudas como também em úlceras crônicas, a aplicação clínica deste tipo de engenharia de substituto de tecido demonstra a capacidade da cultura autóloga de queratinócitos em uma matriz de cola de fibrina em aderir ao leito da lesão, espalhar-se sobre ela e reepitelizar tanto lesões agudas como crônicas (Kopp *et al.*, 2004).

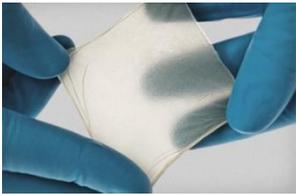
Assim, uma grande quantidade de substitutos de pele tem sido desenvolvida nos últimos dez anos, fornecendo uma ampla variedade de tratamentos à disposição de médicos e pacientes, como os descritos na Tabela 1. Muitos desses substitutos apresentaram resultados clínicos insatisfatórios, o que acabou por torná-los de uso limitado. Além disso, a literatura disponível não utiliza a abordagem de comparação dos

métodos apresentados com estudos controle.

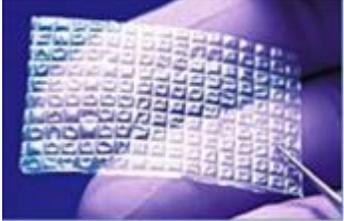
Vários substitutos de pele têm sido desenvolvidos para tratar defeitos de pele, sejam eles agudos ou crônicos (queimaduras, cicatrizes, úlceras cutâneas e anormalidades cutâneas congênitas). Eles são baseados em diferentes matrizes biocompatíveis, biodegradáveis ou não, e que suportam o crescimento das células da pele. Alguns substitutos de pele usam a fibrina como suporte para transferir queratinócitos para dentro da lesão. Tais matrizes podem ser aplicadas tanto em uma forma sólida, como um filme transparente e flexível, ou podem ser aplicadas na forma de *spray* na lesão, com uma suspensão de queratinócitos-cola de fibrina (Krasna, 2005).

Tabela 1: guia de substitutos biológicos para pele comercialmente disponíveis. A primeira coluna mostra o nome comercial do produto e seu fabricante. A segunda coluna mostra o aspecto típico do produto, a terceira sua composição e características específicas, a quarta e quinta, informações sobre o custo, quando disponíveis. Fontes: HealthNow New York Inc. (2015); NM Human Services Department (2015); Priority Health, (2015). Destaca-se que todas as imagens foram retiradas das páginas de internet das respectivas empresas fabricantes, após consulta na máquina de busca Google (<http://www.google.com.br>).

NOME COMERCIAL	ASPECTO TÍPICO	COMPOSIÇÃO/CARACTERÍSTICAS	CUSTO (por unidade)	CUSTO/CM ² (HCPCS)
Affinity® (NuTech Medical)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana fresca • Viabilidade: 42 dias 	-	Código: Q4159
Alloderm® (Life Cell Corp).		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular humana • Alogênica • Doador cadáver • Tamanho: 4cm x 12cm – 16cm x 20cm 	US\$ 5000,00 (4x12cm) – US\$ 7000,00 (16x20cm)	US\$37,10
Allomax® (Bard Davol)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular humana sem reticulação • Mantém fibras elásticas 	US\$ 9565,75 (10cm x 10cm)	US\$30,00

		<ul style="list-style-type: none"> • Alogênica • Tamanho: 2cm x 4cm – 16cm x 20cm 		
Allowrap® (AlloSource)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana • 2 camadas de tecido amniótico com camada epitelial voltada para fora • Tamanho: 2cm x 2cm – 4cm x 8cm 	-	Código: Q4150
Amnioband® (MTF)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana • Tamanho: 2cm x 2cm – 4cm x 6 cm 		Código: Q4151
Amniofix® (Mimedix)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana • Tamanho: 16 mm (diâmetro), 2cmx2cm – 4cmx6cm 	-	Código: Q4100
AmnioGraft® (Bio-Tissue)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana criopreservada • Tamanho: 1cm x 1,5cm – 3,5 cm x 3,5cm 	US\$495,00 (1x1,5cm)	Código: V2790

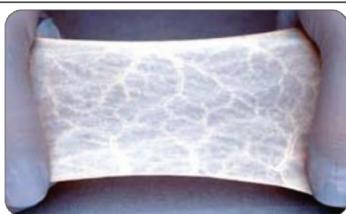
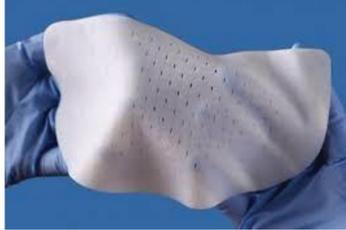
<p>Apligraf® (Organogenesis)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Terapia celular composta por 2 camadas em uma matriz de colágeno tipo 1: <ul style="list-style-type: none"> ○ Camada epidérmica com queratinócitos humanos ○ Camada dérmica com fibroblastos humanos • Tamanho: 75mm x 75mm 	<p>US\$1664,00</p>	<p>US\$31,99</p>
<p>Biobrane®/ Biobrane-L® (Smith & Nephew)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Curativo biossintético temporário • Constituído de membrana de silicone ligado a uma malha de nylon, onde são colocados peptídeos originados do colágeno da derme suína • Tamanho: 5cm x 5cm – 38cm x 51cm e em forma de luva (P,M,G) 	<p>US\$1121,20 (5cm x 5cm caixa com 5 unidades) - > US\$224,24/uni</p>	<p>Código: Q4100</p>
<p>BioDDryFlex® (BioD)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana desidratada • Tamanho: 1,5 cm²-2cm² – 4cm²-8cm² 	<p>-</p>	<p>Código: Q4138</p>

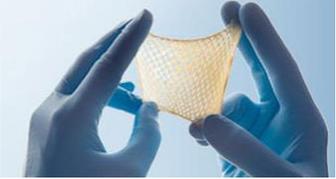
BioDfense® (BioD)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana • Tamanho: 2cm²x3cm² – 10cm²-10cm² 	-	Código: Q4140
Biovance® (Alliqua Biomedical)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana • Folha simples desidratada • Tamanho: 1cm x 2cm – 6cm x 6cm 	-	Código: Q4154
Clarix®Flo (Amniox Medical)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana e matriz de cordão umbilical humano • Substitui ou suplementa tecido danificado ou inadequado • Tamanho: 25mg, 50mg, 100mg 	-	Código: Q4155 (1mg)
Dermacell® (Life Net Health)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular processada com tecnologia patenteada Matracell® e Preservon® • Alogênica • Tamanho: 2cm x 2cm – 6 cm x 16cm 	-	US\$34,00

<p>Dermagraft® (Shire Regenerative Medicine)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Fibroblastos humanos em um scaffold bioabsorvível de pliglactina (Vicryl®) • Tamanho: 5cm x 7,5cm 	<p>US\$1500,00</p>	<p>US\$34,21</p>
<p>Dermamatrix® (Synthes)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular seca e congelada humana • Processada pela MTF • Alogênica • Tamanho: 1cm x 1cm – 2cm x 4cm 	<p>US\$3393,00 – US\$4563,00</p>	<p>US\$ 28,51 – US\$31,94</p>
<p>Dermapure® (Tissue Regenix Wound Care Inc)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Camada única de derme humana acelular • Para o tratamento de feridas agudas e crônicas • Alogênica • Tamanho: 2cm x 3cm – 4cm x 6cm 	<p>-</p>	<p>Código: Q4152</p>
<p>Dermavest® (Aedicell)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz acelular de tecido conjuntivo humano placentário 	<p>-</p>	<p>Código: Q4153</p>

EpiFix® (MiMedix)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica e coriônica humana desidratada • Composta de múltiplas camadas, incluindo uma camada única de células epiteliais, membrana basal e matriz de tecido conjuntivo avascular • Tamanho: 1,5cm² – 49cm² 	-	US\$215,57
Flex HD® (Ethicon)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular hidratada humana • Processado pela Muscoloskeletal Transplant Foundation (MTF) • Alogênica • Tamanho: 1cm x 2cm – 16cm x 20cm 	-	US\$30,00
Graftjacket® (KCI)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz regenerativa de tecido acelular humano, processado do banco de tecidos americano • Minimamente processada para remover a epiderme e as células da derme, preservando a estrutura dérmica • Alogênico • Material é seco e congelado • Tamanho: 4cm x 4cm – 4cm x 8cm 	-	US\$97,78

<p>Integra® (Integra Life Science)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Curativo composto de matriz porosa de colágeno de tendão bovino reticulada em uma camada semipermeável de polisiloxane (silicone) • Tamanho: 5cm x 5cm – 20cm x 25cm 	-	US\$24,10
<p>Neox®Cord 1K (Amniox Medical)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica e cordão umbilical humano criopreservado • Tamanho: 1,5cm x 1,5cm – 3cm x 6cm 	-	Código: Q4148
<p>Neox®Flo (Amniox Medical)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica humana e matriz de cordão umbilical humano • Tamanho: 25mg, 50 mg, 100mg 	-	Código: Q4155 (1mg)
<p>NuShield® (Nu Tech Medical, Inc)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica e coriônica humana em sua configuração natural • Tamanho: 2cm x 3cm – 6cm x 6cm 	-	Código: Q4160

<p>OASIS® (Cook Biotech)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Scaffold de colágeno • Derivado da submucosa do intestino delgado suíno • Xenogênico • Tamanho: 3cm x 3,5cm – 7cm x 20cm 	<p>US\$112,66 (3cm x 3,5cm)</p>	<p>Código: Q4124</p>
<p>Orcel® (Forticell Bioscience)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz alogênica com 2 camadas absorvíveis feitas de colágeno bovino tipo 1, onde fibroblastos e queratinócitos são cultivados 	<p>-</p>	<p>Código: Q4100</p>
<p>Permacol® (Covidien)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular suína reticulada • Xenogênico • Tamanho: 1cm x 4cm – 28cm x 40cm 	<p>US\$ 9259,10 (15cm x 20cm)</p>	<p>Código: C9364</p>
<p>Primatrix® (TEI Biosciences)</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular derivada de derme fetal bovina • Xenogênico • Tamanho: 3cm x 3cm – 10cm-25cm 	<p>-</p>	<p>US\$37,00</p>

Revitalon® (Medline Industries)		<ul style="list-style-type: none"> • Membrana amniótica e coriônica humana • Contém TGF-β, FGF-2, EGF, PDGF e citocinas • Tamanho: 2cm x 2cm – 4cm x 6cm 	US\$1098,05 (2cm x 2cm)	Código: Q4157
Strattice® (Life Cell Corp)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular não reticulada crosslink derivado de suíno • Xenogênico • Tamanho: 6cm x 8cm – 25cm-40cm 	£1800,00	US\$27,00
Surgimend® PRS (TEI Biosciences)		<ul style="list-style-type: none"> • Matriz dérmica acelular derivada de derme fetal bovina • Xenogênico • Tamanho: 7cm x 17cm – 20cm-20cm 	US\$ 8000,00 (20cm x 20cm)	US\$23,00
Theraskin® (Soluble Systems)		<ul style="list-style-type: none"> • Enxerto de pele humana heteróloga criopreservada, formada por fibroblastos e queratinócitos em uma matriz extracelular completamente desenvolvida • Tamanho: 2,5cm x 5cm – 5cm x 7,5cm 	US\$795,00 – US\$995,00	US\$35,13

<p>Transcyte® (Advanced Tissue Science)</p>		<ul style="list-style-type: none">• Consiste em uma membrana de polímero e fibroblastos humanos cultivados em uma malha de nylon. Depois do crescimento celular, essa malha é revestida com colágeno de derme suína e ligada a uma membrana de silicone• Tamanho: 12,5cm x 18,75cm	-	Código: Q4100
--	---	---	---	---------------

HCPCS – acrônimo para Healthcare Common Procedure Coding System

1.7- Cola de Fibrina

A cola de fibrina é um tipo de adesivo biológico derivado do sangue (Scardino *et al.*, 1999), originalmente desenvolvida como agente hemostático, auxiliando a coagulação, e consistindo de uma mistura de fibrinogênio e trombina, ambos não tóxicos e biodegradáveis (Jeschke *et al.*, 2013). Essa combinação funciona como uma cola por simular a fase inflamatória da cicatrização (Currie *et al.*, 2001), sendo frequentemente utilizada em cirurgia plástica reconstrutora, transplantes de órgãos e enxertos de pele (Scardino *et al.*, 1999; Currie *et al.*, 2001; Pérez-Guisado *et al.*, 2011; Jeschke *et al.*, 2013). Na Figura 3, mostra-se os fatores que interferem na cascata da fibrina no organismo.

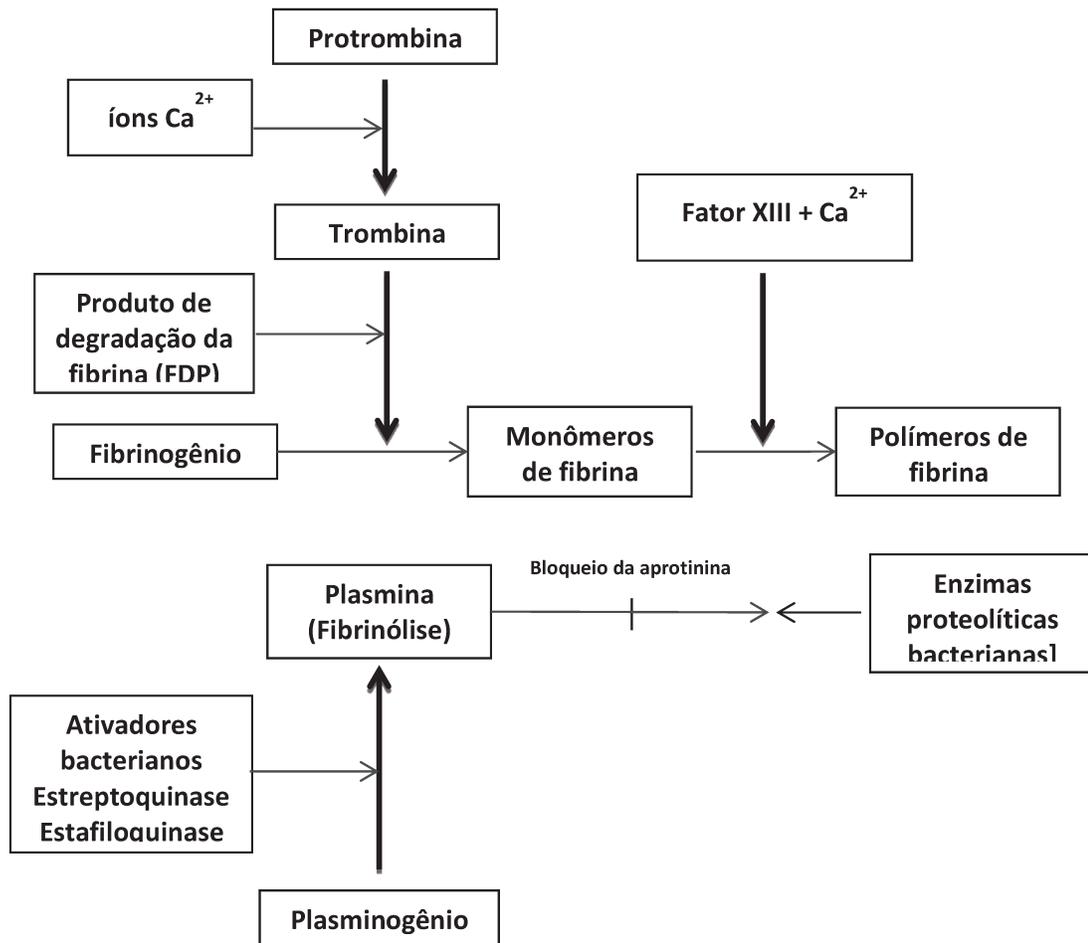


Figura 3: Fatores que influenciam a deposição e quebra da fibrina. Fibrinogênio é quebrado para monômeros de fibrina, pela ação da trombina. Os monômeros de fibrina então são polimerizados na presença de fator XIII e cálcio, precipitando como fibras de fibrina no tecido. O polímero de fibrina é quebrado para produtos de degradação de fibrina pela plasmina (que é inibida pela aprotinina) e enzimas proteolíticas bacterianas (adaptado de Currie *et al.*, 2001 – Anexo 9.2)

1.8- Matrizes poliméricas para o recobrimento de lesões

Diversos estudos têm apontado o uso de polímeros biodegradáveis como colágeno, quitosana, xantana, celulose e alginato, separadamente ou combinados, para aplicações em engenharia de tecidos (Silva, 2008; Zhao *et al.*, 2002; Laurencin *et al.*, 2001; Zhang e Ma, 1999). Particularmente, sistemas à base de quitosana, xantana e alginato representam alternativas promissoras para a produção destes suportes, tendo já uso registrado como componentes de dispositivos de uso clínico e sendo mais vantajosos do que matrizes de colágeno no que tange à biossegurança.

A quitosana é um amino-polissacarídeo derivado da quitina, consistindo de um copolímero de β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina). A quitina é encontrada em abundância na natureza, principalmente em carapaça de crustáceos, e a quitosana é obtida quando a maioria dos grupamentos acetil da quitina são removidos, normalmente por tratamento com bases fortes (Canella e Garcia, 2001). A quitosana comercial possui, geralmente, grau de desacetilação variando de 70 a 95%, e massa molar na faixa de 10^4 a 10^6 g.mol⁻¹ (Canella e Garcia, 2001).

A quitina e a quitosana são polímeros biodegradáveis, de fácil associação às células de mamíferos e com alto efeito regenerativo dos tecidos conjuntivo e ósseo. A quitosana pode ser utilizada como hemostáticos, fungistáticos, espermicidas, antitumorais, anticolestêmicos, conservantes de alimentos do ataque microbiológico e formadores de filmes biodegradáveis (Craveiro *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 1999). Além disso, pode também atuar como antiácido e anti-úlceras, protegendo a mucosa gástrica e inibindo a adesão de bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais (Josué *et al.*, 2000).

A biocompatibilidade da quitosana foi comprovada em implantes em tecidos vivos e sua baixa toxicidade foi verificada em animais (DL₅₀: dose letal para 50% de uma população de ratos igual a 16g/kg), permitindo, portanto, seu emprego em formulações farmacêuticas e médicas (Josué *et al.*, 2000). Em adição, a quitosana ainda estimula a proliferação e a reorganização da histo-arquitetura celular (Muzzarelli *et al.*, 1988).

A degradação deste polímero é realizada por enzimas largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corporais de animais (como a lisozima) e nas plantas, além de estarem presentes nos microrganismos do solo. As membranas produzidas com quitosana de baixo grau de desacetilação são mais facilmente absorvidas pelo organismo durante a recuperação do tecido, dispensando, portanto, a retirada do curativo e, possivelmente, danos ao tecido recuperado, ainda sensível (Khan *et al.*, 2000).

A quitosana possui alta solubilidade em alguns ácidos orgânicos, o que permite a obtenção de filmes e membranas, apresentando também propriedade de formar um gel em soluções ácidas, o que possibilita seu uso como veículo em formulações farmacêuticas.

Paul e Sharma (2004) mostram que um curativo experimental desenvolvido à base de quitosana e alginato contendo antibióticos e analgésicos tópicos apresentou, em seres humanos, efeito benéfico no controle de infecção e reduziu o tempo de cicatrização da ferida.

O alginato é um polissacarídeo natural, encontrado em várias espécies de algas. Esta biomolécula constitui-se de copolímeros lineares de (1,4)- α -L-guluronato e (1,4)- β -D-manuronato em ordens variadas. A composição e a sequência dos monômeros no alginato dependem da sua origem (Mofidi *et al.*, 2000) e estes fatores determinam suas propriedades físicas (Chan *et al.*, 2002). As propriedades gelificantes deste composto resultam da ligação cooperativa de cátions divalentes localizados entre blocos homopoliméricos de resíduos do glucoronato, destacando-se o uso do cálcio.

Este polissacarídeo tem sido utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia, sendo também empregado na preparação de matrizes poliméricas para encapsulação de fármacos, macromoléculas e células (Chan *et al.*, 2002), tendo uso já bem estabelecido no tratamento de lesões de pele. Deve-se também ressaltar que o alginato de cálcio é seguro e relativamente barato. Além destas características, os alginatos possuem propriedades mucoadesivas, as quais podem aumentar o tempo de contato entre os dispositivos por ele constituídos, o epitélio e as células do tecido linfóide GALT (Lemoine *et al.*, 1998).

Assim como a quitosana e o alginato, a xantana é um polissacarídeo atóxico, comumente empregado como espessante nas áreas de alimentos e medicina. Sua estrutura primária consiste em unidades que se repetem de um pentassacarídeo formado por duas moléculas de glicose, duas de manose e uma de ácido glucorônico, além de grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glicose com ligações nas posições 1 e 4. Este composto é obtido por fermentação microbiana e sua complexação com quitosana possibilita a obtenção de matrizes que apresentam elevada absorção de soluções aquosas e com estabilidade comprovada em fluidos biológicos (Veiga, 2009).

Uma técnica de preparação de membranas contendo simultaneamente quitosana e alginato fundamenta-se na produção controlada de complexos das matérias-primas e em sua moldagem e secagem (Rodrigues *et al.*, 2008). Membranas lamelares com 78 μm de espessura, capacidade de drenagem de água de 14,3 $\text{kg}/\text{m}^2/\text{dia}$, capacidade máxima de absorção de até 19,2 $\text{Kg H}_2\text{O}/\text{g}$ membrana, permeabilidade a vapor de água de 2,7 $\text{g}/\text{m}^2/\text{dia}$ e resistência à tração em torno de 30 MPa foram obtidas (Rodrigues *et al.*, 2008). Similarmente, membranas de quitosana e xantana podem ser também produzidas (Veiga, 2009), sendo também possível a obtenção, tanto para a combinação alginato-quitosana quanto para quitosana-xantana, de matrizes porosas pelo uso de tensoativos biocompatíveis durante a etapa de complexação dos polissacarídeos (Bueno e Moraes, 2011; Bellini, 2012).

A combinação destes polímeros na forma de complexos de polieletrólitos é frequentemente utilizada visando a sinergia e mesmo melhoria de propriedades dos compostos, por exemplo, o aumento da absorção de exsudatos e da estabilidade à exposição a soluções aquosas e ao pH (Paul e Sharma, 2004; Pires *et al.*, 2015).

2- Justificativa e Hipótese

As úlceras cutâneas crônicas têm difícil cicatrização, podendo permanecer por toda a vida. Cerca de 20% das lesões tratadas por métodos convencionais no período de um ano não regridem (Nelson *et al.*, 2002) e 34% dos pacientes curados apresentam recidivas (Barwell *et al.*, 2004; Morrell *et al.*, 1999). Os tratamentos hoje disponíveis, como desbridamento, curativos, enxertos de pele de regiões sadias do próprio paciente, utilização de agentes quimioterápicos, dentre outros, são ineficazes na maioria dos casos.

Esse aspecto é preocupante, uma vez que úlceras, como as de estase venosa, afetam de maneira muito negativa a vida do doente, pois além de serem associadas à intensa dor (Hareendran *et al.*, 2005; González-Consuegra e Verdú, 2011), reduzem a mobilidade do indivíduo, o qual pode ter então outras complicações como trombose venosa, ganho de peso e co-morbidades associadas. Além disso, o paciente é frequentemente afastado do trabalho e hospitalizado, reduzindo seu contato social (Persoon *et al.*, 2004; Green e Jester, 2010), o que facilita o desenvolvimento de depressão.

Diante disso, visou-se neste trabalho disponibilizar um tratamento menos agressivo, mais eficaz e viável economicamente, buscando também melhores resultados funcionais e estéticos através da aplicação de culturas de fibroblastos com cola de fibrina e uso de matrizes polissacarídicas. A terapia celular com cultura de queratinócitos autólogos tem mostrado importantes resultados na cicatrização de lesões da pele, incluindo rápida e efetiva regressão da lesão e reduzindo o tempo de tratamento (Rehder *et al.*, 2013).

O uso de coberturas biocompatíveis das células aplicadas na superfície da lesão é também relevante, pois pode auxiliar na redução da dor, na melhoria da cicatrização e também na proteção da área em tratamento do contato com agentes externos, como micro-organismos contaminantes. A associação de diferentes biopolímeros visando à obtenção de coberturas com tais propriedades pode, assim, resultar no desenvolvimento de curativos com melhores características, como, por exemplo, alta

absorção de fluido. Relevantes resultados *in vivo* foram recentemente relatados sobre o uso de membranas formadas associando-se quitosana e goma xantana (Bellini *et al.*, 2015) e alginato (Caetano *et al.*, 2015) para tratar úlceras cutâneas em ratos Wistar em combinação ou não com células mesenquimais estromais, verificando-se apreciável potencial para aplicação também como curativos em úlceras cutâneas em humanos.

Dessa forma, no presente estudo foi proposto o desenvolvimento de terapia celular com culturas de fibroblastos, associada a matrizes biológicas constituídas de membranas de: quitosana complexada com alginato ou xantana, visando uma melhor e mais rápida cicatrização de úlceras em paciente com dermatomiosite juvenil e calcinose universal.

3- Objetivos

3.1- Objetivo Geral

Avaliar a eficácia do tratamento de úlceras cutâneas, em paciente com dermatomiosite juvenil e calcinose universal, com cultura de fibroblastos autólogos associada ao uso de membranas constituídas de quitosana complexada com alginato ou xantana.

3.2- Objetivos Específicos

3.2.1 - avaliar clinicamente o paciente quanto à reepitelização, eritema, edema, tipo e formação de exsudato e infecção das úlceras cutâneas.

3.3.2 - avaliar se há diferença em relação ao tipo de membrana utilizada quanto à reepitelização, melhora da dor, formação de exsudato e infecção da ferida.

3.3.3 – avaliar o efeito da terapia proposta na qualidade de vida do paciente.

4- Materiais e Métodos

4.1- Paciente e Local do Estudo

O paciente incluído neste estudo foi recrutado no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), e seguido por 20 meses após a aplicação da terapia celular associada ao uso das membranas. O paciente só foi incluído depois de aceite de sua participação mediante leitura da Carta de Consentimento e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado e autorizado pela mãe do mesmo, com cópia disponível no Anexo 9.3. Os procedimentos adotados foram previamente estabelecidos e homologados junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (444.726 – Parecer emitido em 08/11/2013, disponível no Anexo 9.4), respeitando-se os princípios enunciados na declaração de Helsinque e na Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde.

As culturas de células foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células da Pele (LCCP) localizado no prédio do Centro de Investigação em Pediatria (CIPED) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp.

As matrizes dos biopolímeros quitosana, alginato e xantana foram preparadas no Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da Unicamp e esterilizadas com óxido de etileno pela ACECIL - Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA. (Campinas, SP).

4.2- Coleta de material

Amostras de pele foram coletadas de áreas sem lesões ativas do paciente sob condições assépticas. O paciente foi colocado em decúbito dorsal horizontal, com exposição da região de coleta que então foi limpa com solução tópica de clorexidina 2% (Riohex[®] 0,2, Rioquímica Indústria Farmacêutica, Brasil). Foi aplicada anestesia local com xilocaína 1% sem vasoconstritor (Xylestesin[®] 2%, Cristália, Brasil) na dose de 1,8 mL. A seguir, foi realizada a incisão com extensão entre 1,0 a 2,0 cm. A amostra de pele já obtida foi armazenada em frasco estéril com solução salina 0,9% com

antibiótico e antimicótico (Anti-Anti 15240, lote 577999, GIBCO/Invitrogen) e a área foi suturada com pontos separados através de fio monofilamentar de nylon 5.0, seguido de curativo oclusivo. As amostras de pele foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Cultura de Células da Pele. Três amostras foram retiradas em três momentos diferentes.

4.3- Preparação das amostras de pele para culturas celulares

Após o recebimento dos frascos contendo amostra de pele, os fragmentos foram separados do tecido adiposo e colocados em frascos com meio de cultura RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com antibiótico e antimicótico (Anti-Anti 15240, lote 577999, GIBCO/Invitrogen) e armazenados em geladeira (4-8°C) até serem manipulados, não ultrapassando o prazo máximo de 12 horas. O LCCP dispõe de uma sala de cultura devidamente equipada e com sistema de controle ambiental, área limpa classe 10.000 ISO 7 (ISO 14644-1), onde todos os procedimentos foram realizados, seguindo as técnicas já testadas e padronizadas pelo apoio técnico do laboratório.

Após o descarte do meio, os fragmentos foram colocados em placas de Petri com solução de tripsina 0,25%/EDTA 1X (GIBCO) e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ por 4 horas, para que ocorresse a separação entre a derme e epiderme. Após este período, foi adicionado Soro Fetal Bovino (LGC) a 10% para a interrupção da atividade da tripsina. Os fragmentos da derme foram separados e colocados em garrafas modelo T25 para cultivo de fibroblastos.

4.4- Cultura de fibroblastos

Os fibroblastos foram cultivados em meio M199 (Sigma-Aldrich), suplementado com L-glutamina (0,2 mg/mL), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (0,1 mg/mL) (GIBCO/Invitrogen) e soro fetal bovino 10% (FBS - LGC Biotechnology).

A troca do meio de cultura foi realizada três vezes por semana para garantir a manutenção do pH e o suprimento dos nutrientes das culturas e a passagem celular foi determinada pela confluência acima de 90% do frasco. Na passagem celular o meio de

cultura foi descartado e, em seguida, adicionou-se tripsina a 0,25% (Trypsin + EDTA) em cada frasco, com incubação de 5 minutos a 37°C, com tensão de CO₂ de 5%.

O soro fetal bovino foi utilizado para neutralização da tripsina e o líquido dos frascos contendo células foi transferido para tubos cônicos de 50 mL (Falcon) e centrifugado (1500rpm/10min). Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas e uma alíquota foi retirada para certificação de viabilidade celular (90%) com azul de Trypan (Merck Chemicals) e determinação do número de células através de contagem em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células em suspensão foram distribuídas em garrafas de cultura modelo T25 e mantidas em Incubadora a 37°C com 5% de CO₂, contendo 10⁷ células por garrafa.

Após quatro passagens, as células foram criopreservadas, em DMSO a 10%, e armazenadas em freezer a -80C até o momento da convocação do paciente para aplicação.

Na Figura 4, demonstra-se, esquematicamente o fluxograma simplificado da cultura celular.

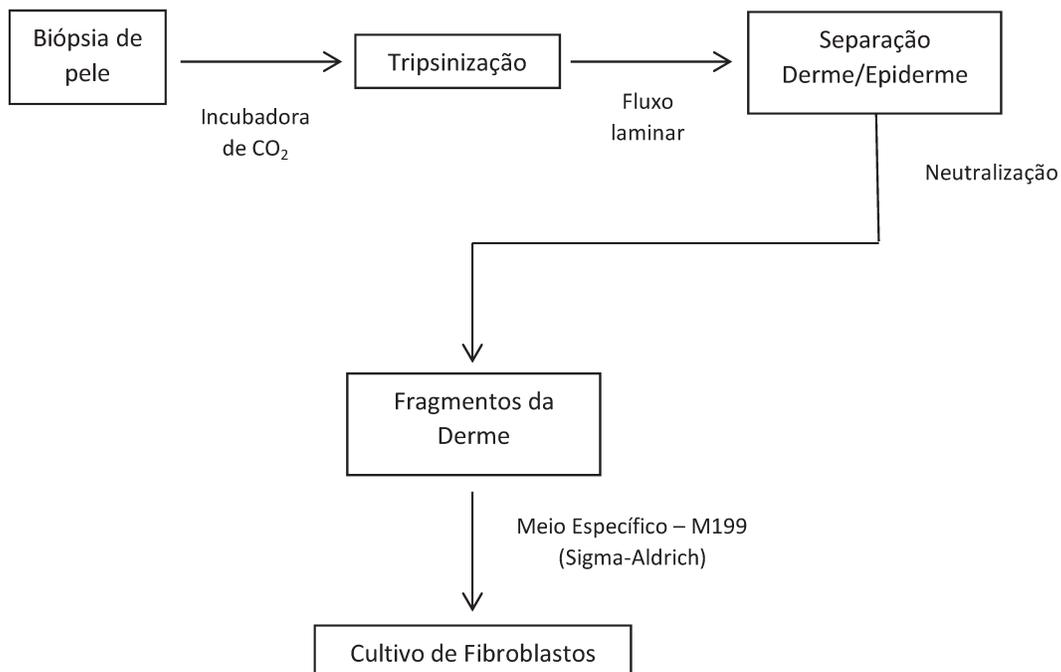


Figura 4: Etapas do cultivo de fibroblastos

4.5- Preparação das Membranas

O preparo das membranas seguiu técnica já implantada no Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química.

As membranas foram obtidas de acordo com adaptações dos métodos estabelecidos por Rodrigues *et al.* (2008), Bueno e Moraes (2011) e adaptado por Pires e Moraes (2015), no caso de dispositivos de Q-A, e com base nos procedimentos desenvolvidos por Veiga e Moraes (2011) e Bellini *et al.* (2012) para as membranas de Q-X.

Foram utilizadas quitosana com grau de desacetilação de 96% (Sigma-Aldrich, lote de número 109K0043V), alginato de sódio de média viscosidade obtido de *Macrocystis pyrifera* (Sigma-Aldrich, lote de número 058K0126), goma xantana (Sigma-Aldrich, lote de número 108K0038), ácido acético glacial, cloreto de cálcio diidratado e hidróxido de sódio (Merck); além disso, a água utilizada foi destilada e deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore).

Os equipamentos utilizados consistiram de um reator de aço inoxidável encamisado com diâmetro interno de 10 cm e altura de 20 cm, uma bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3, uma estufa com circulação de ar 410D da Nova Ética, um banho ultratermostático Q-214 M2 e um agitador mecânico Q-251 D com hélice do tipo pás inclinadas de raio de 2,1 cm da Quimis.

As membranas de quitosana e alginato foram preparadas pela adição de alíquotas de 180 mL de solução de quitosana a 1% (m/v) dissolvida em ácido acético a 2% (v/v) em 360 mL de solução aquosa de alginato a 0,5% (m/v) na vazão de 200 mL/h no reator de aço inoxidável mantido a 25 °C, sob agitação de 500 rpm. Após a mistura das soluções, a intensidade de agitação do material foi aumentada para 1000 rpm por 10 minutos adicionais. Em seguida, 26 mL de solução aquosa de NaOH a 2M foram adicionados para aumentar o pH para 7, mantendo-se a agitação por mais 10 minutos. Em seguida, 7,2 mL de solução aquosa de CaCl₂ a 2% (m/v) foram adicionados para reticular as carboxilas do alginato que não se complexaram à quitosana. A mistura obtida foi desaerada por 120 minutos, transferida (em alíquotas de massas iguais) para

quatro placas de Petri de poliestireno (diâmetro de 15 cm) e seca em estufa a 60 °C por 6 horas. Após a secagem, as membranas foram imersas em 150 mL de solução aquosa de CaCl_2 a 2% (m/v) por 30 minutos, para a reticulação das carboxilas livres remanescentes do alginato, e então lavadas por duas vezes por 30 minutos com 200 mL de água deionizada. A etapa final de secagem foi realizada à temperatura ambiente por 24 horas. Ilustra-se, na Figura 5, esse processo de forma simplificada.

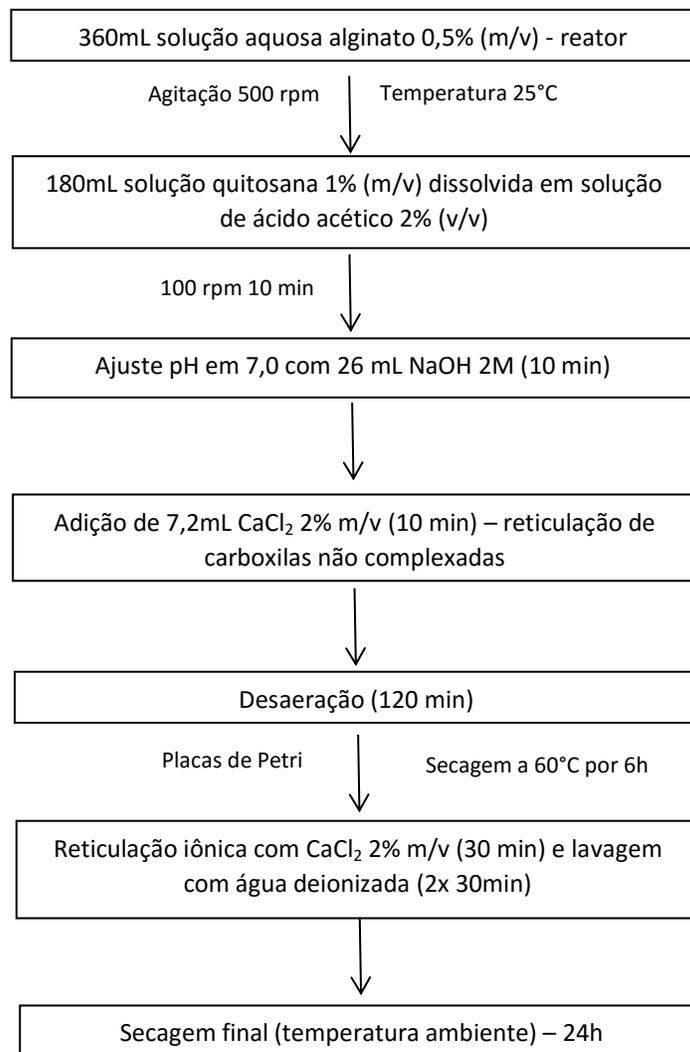


Figura 5: Preparação da membrana de quitosana-alginato.

No caso das membranas de quitosana e goma xantana, 200 mL de solução aquosa de goma xantana a 1,5% (m/v) foram adicionados a 200 mL de solução de quitosana a 1,5% (m/v) dissolvida em ácido acético a 1,5% (v/v) na vazão de 30 mL/h, a 25°C e sob agitação (1000 rpm). Em seguida, desaerou-se a suspensão e transferiu-se a mistura para uma placa de poliestireno de 15 cm de diâmetro e fez-se a secagem do material a 37°C por 24 a 48 horas. A membrana foi lavada por 30 minutos, por duas vezes, com 200 mL de água deionizada, uma vez com 250 mL de tampão Hepes (Sigma-Aldrich) a 10 mM para neutralizar o pH e finalmente, com 500 mL de água deionizada. Uma etapa final de secagem foi realizada à temperatura ambiente por 24 horas, prendendo-se as bordas para evitar o encolhimento da membrana. Esquematisa-se essa preparação na Figura 6.

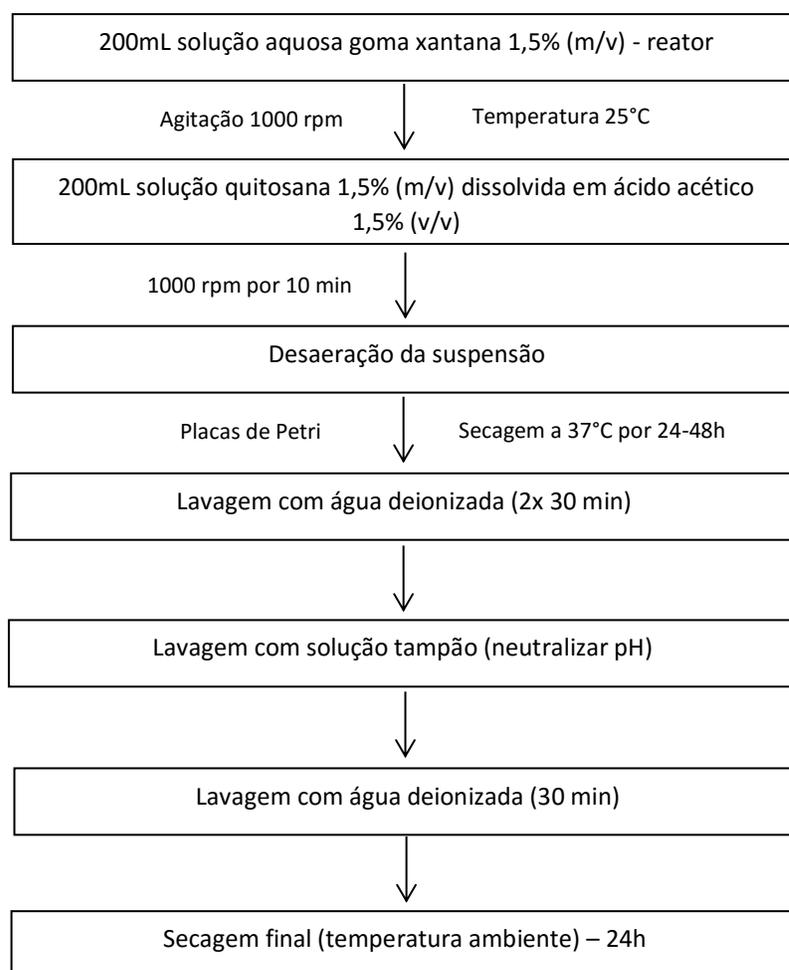


Figura 6: Esquema da preparação da membrana de quitosana-xantana.

As membranas foram esterilizadas com Oxyfume 30 (30% de óxido de etileno e 70% CO₂) a 40°C por 8 horas, sob umidade relativa de 30 a 80% pela ACECIL - Central de Esterilização Comércio e Indústria LTDA (Campinas, SP).

4.6- Microscopia Eletrônica de Transmissão das Células

Para avaliar a presença de células na superfície e/ou interior das matrizes, as amostras passaram por uma análise de microscopia eletrônica no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia Patológica da Unicamp. Foi realizado cultivo de fibroblastos sobre as membranas por 48 horas e, após serem fixadas em solução Karnovsky, foram impregnadas pelo ósmio e incluídas em resina araldite. A aquisição das imagens foi obtida em microscópio Zeiss, com aumentos de 1293 a 12930X.

4.7- Aplicação das células e acompanhamento do paciente

As células foram descongeladas e cultivadas por pelo menos 72 horas antes da aplicação. No dia da aplicação, as células foram tripsinizadas, lavadas e contadas conforme protocolos anteriormente descritos por Rehder *et al.* (2004), Souto *et al.* (2005, 2006), Bosnardo (2010) e Dinato *et al.* (2012). Foi preparada uma cultura de fibroblastos num total de 1×10^7 células. Para a aplicação, aspergiu-se as células com a cola de fibrina (Beriplast P – CSL-Behring) sobre o leito da úlcera sob condições assépticas, em regime ambulatorial (Figura 7).

Após a aspersão das células, sobre a úlcera, foram colocadas as membranas de polissacarídeos previamente intumescidas em solução fisiológica (Figura 8), a fim de proteger a área contra agentes que possam retirar o enxerto e visando auxiliar o processo de cicatrização.

O paciente foi acompanhado por 20 meses, a cada 7 dias no primeiro mês e, posteriormente a cada 15 ou 30 dias. Novas aplicações foram realizadas de acordo com a resposta do paciente, sendo estas em um total de 7.



Figura 7: Aplicação das células e da cola de fibrina.

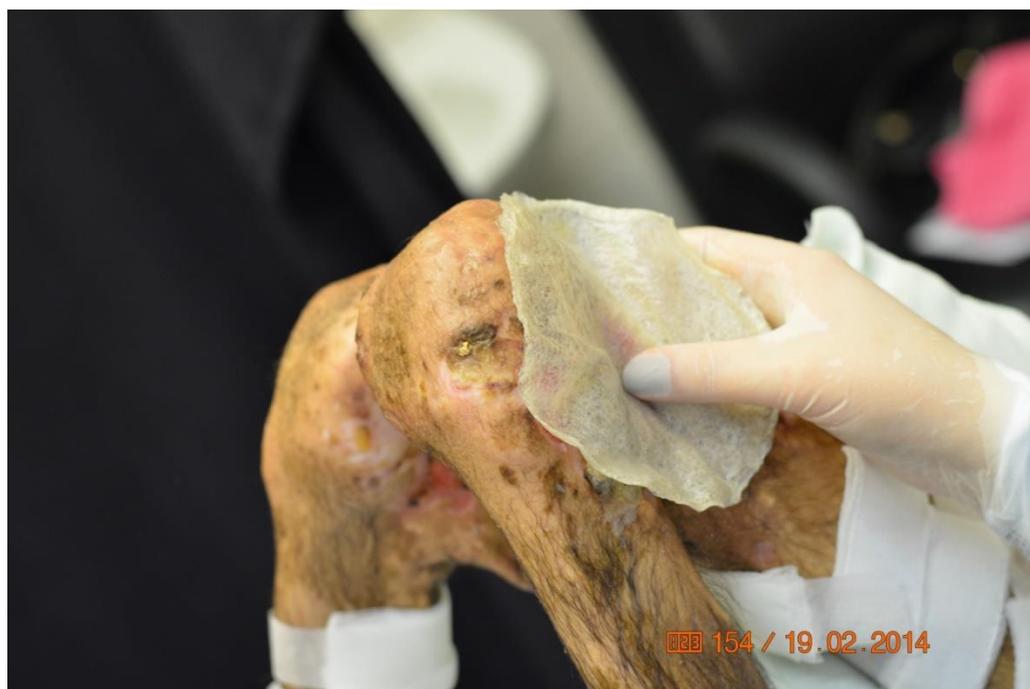


Figura 8: colocação da membrana após aspersão da cultura celular com cola de fibrina.

4.8- Análise dos dados

Foi realizada a documentação fotográfica no dia da aplicação da cultura de células e em todas as reavaliações. Uma câmera NIKON D5100 foi utilizada para tal. As fotos foram feitas com uma régua para possibilitar a mensuração da área das úlceras, utilizando o software Image J2 (Fiji).

4.9- Aplicação de questionários de qualidade de vida

O paciente foi submetido à aplicação de 2 questionários sobre qualidade de vida, previamente à aplicação da terapia e 3 meses após a 7^a aplicação. O primeiro questionário, Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire (CCVUQ), está descrito no anexo 9.5 e é mais específico para úlceras, e o segundo, constituído da versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida SF-36, está descrito no anexo 9.6, fazendo uma análise da qualidade de vida geral.

Os dados do questionário CCVUQ são descritivos. Já para a análise do SF-36 foram utilizados os parâmetros descritos a seguir, sendo constituído primeiro pela ponderação dos dados e, depois, pelo cálculo do Raw Scale:

4.9.1- Ponderação dos dados (SF-36):

Os escores do questionário de qualidade de vida foram calculados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2: Ponderação dos dados

Questão	Pontuação	
01	Se a resposta for	Pontuação
	1	5,0
	2	4,4
	3	3,4
	4	2,0
	5	1,0
02	Manter o mesmo valor	
03	Soma de todos os valores	
04	Soma de todos os valores	
05	Soma de todos os valores	
06	Se a resposta for	Pontuação
	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	1
07	Se a resposta for	Pontuação
	1	6,0
	2	5,4
	3	4,2
	4	3,1
	5	2,0
	6	1,0

08	<p>A resposta da questão 8 depende da nota da questão 7</p> <p>Se 7 = 1 e se 8 = 1, o valor da questão é (6)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 1, o valor da questão é (5)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 2, o valor da questão é (4)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (3)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 4, o valor da questão é (2)</p> <p>Se 7 = 2 à 6 e se 8 = 3, o valor da questão é (1)</p> <p>Se a questão 7 não for respondida, o escore da questão 8 passa a ser o seguinte:</p> <p>Se a resposta for (1), a pontuação será (6)</p> <p>Se a resposta for (2), a pontuação será (4,75)</p> <p>Se a resposta for (3), a pontuação será (3,5)</p> <p>Se a resposta for (4), a pontuação será (2,25)</p> <p>Se a resposta for (5), a pontuação será (1,0)</p>
09	<p>Nesta questão, a pontuação para os itens a, d, e ,h, deverá seguir a seguinte orientação:</p> <p>Se a resposta for 1, o valor será (6)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 6, o valor será (1)</p> <p>Para os demais itens (b, c,f,g, i), o valor será mantido o mesmo</p>
10	Considerar o mesmo valor.
11	Nesta questão os itens deverão ser somados, porém os itens b e d deverão seguir a seguinte pontuação:

	<p>Se a resposta for 1, o valor será (5)</p> <p>Se a resposta for 2, o valor será (4)</p> <p>Se a resposta for 3, o valor será (3)</p> <p>Se a resposta for 4, o valor será (2)</p> <p>Se a resposta for 5, o valor será (1)</p>
--	--

4.9.2- Cálculo do Raw Scale (SF-36):

Nesta fase transforma-se o valor das questões anteriores em notas de 8 domínios que variam de 0 (zero) a 100 (cem), onde 0 refere-se a pior e 100 a melhor para cada domínio. É chamado de *raw scale* porque o valor final não apresenta nenhuma unidade de medida.

Os domínios são listados a seguir:

- Capacidade funcional
- Limitação por aspectos físicos
- Dor
- Estado geral de saúde
- Vitalidade
- Aspectos sociais
- Aspectos emocionais
- Saúde mental

Para os cálculos referentes a cada domínio, aplica-se a seguinte equação:

$$\text{Valor no domínio} = \frac{\text{Valor obtido nas questões correspondentes} - \text{Limite inferior} \times 100}{\text{Variação (Score Range)}}$$

Na equação, os valores de limite inferior e variação (*Score Range*) são fixos e estão estipulados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores para cálculo do *Raw Scale*.

Domínio	Pontuação das questões correspondidas	Limite inferior	Variação
Capacidade funcional	03	10	20
Limitação por aspectos físicos	04	4	4
Dor	07 + 08	2	10
Estado geral de saúde	01 + 11	5	20
Vitalidade	09 (somente os itens a + e + g + i)	4	20
Aspectos sociais	06 + 10	2	8
Limitação por aspectos emocionais	05	3	3
Saúde mental	09 (somente os itens b + c + d + f + h)	5	25

5- Resultados

5.1- Características da cultura de fibroblastos provenientes do paciente portador de DMJ

O aspecto típico das células do paciente em cultura é observado nas Figuras 9 e 10. Observa-se que os fibroblastos iniciam seu crescimento a partir do fragmento da derme no meio de cultura. Inicialmente os fibroblastos encontram-se dispersos na garrafa de culturas e, com o passar do tempo, apresentam-se confluentes.



Figura 9: Fragmento de derme e cultura de fibroblastos inicial, no décimo dia.

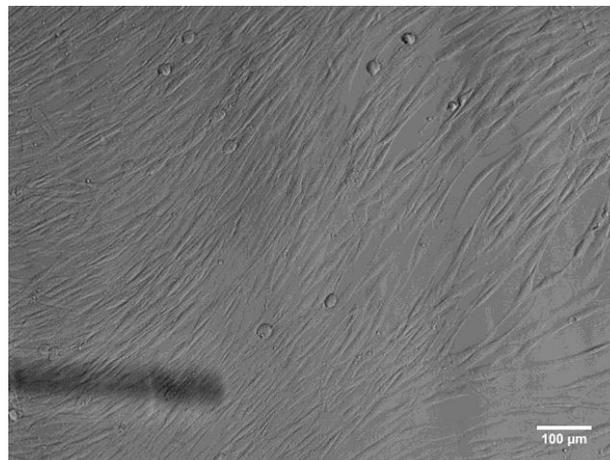


Figura 10: Cultura de fibroblastos ao trigésimo dia, notando-se a confluência celular.

5.2- Análise do material estudado por microscopia eletrônica de transmissão

Visando analisar o comportamento das culturas de fibroblastos nas membranas, foi realizado estudo através de microscopia eletrônica de transmissão. As células foram incubadas por 48 horas na presença do meio de cultura sobre as membranas e os resultados encontram-se na Figura 11.

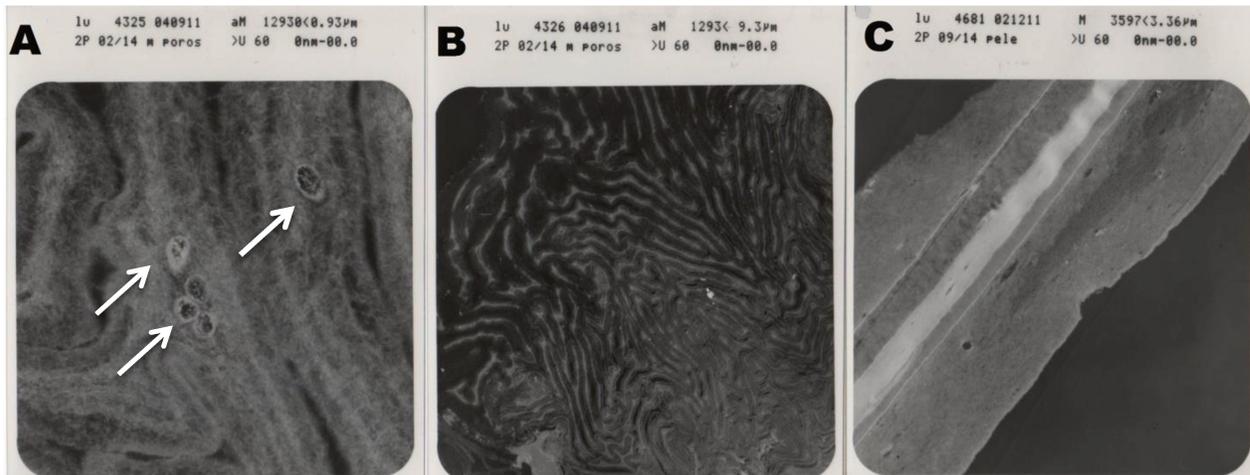


Figura 11: Membranas e células (setas brancas) vistas por microscopia eletrônica de transmissão: A- membrana de quitosana e xantana (aumento de 12930X); B- membrana de quitosana e alginato (aumento de 1293X); C – membrana de quitosana e alginato (aumento de 3597X).

Nota-se que as células foram capazes de penetrar na membrana de quitosana e xantana (Figura 11A). Já nas Figuras 11B e 11C, nos aumentos mostrados, não é possível ver as células, ou por terem sido lavadas durante o processo de fixação ou por estas não aderirem à membrana.

5.3- Caso clínico

Homem, branco, 18 anos, com diagnóstico de dermatomiosite juvenil desde os 5 anos de idade e calcinose universal, rapidamente progressiva, a partir dos 12 anos. Fez uso de gamaglobulina, diltiazem, alendronato e azatioprina, sem controle da doença. Atualmente em uso de prednisolona, metotrexate, ácido fólico, carbonato de cálcio, vitamina D₃, levotiroxina e sulfametaxazol-trimetoprim. Apresentava extensas úlceras, principalmente nos membros inferiores, e calcificações difusas. No início do estudo, o

paciente não encontrava-se em atividade da doença de base.

5.4- Terapêutica adotada

O paciente apresentava múltiplas lesões cutâneas, variando de aproximadamente 0,5 cm² a 8 cm², distribuídas por todo o corpo, principalmente nos membros inferiores. As lesões selecionadas para o tratamento foram as maiores, mais profundas e que causavam maior desconforto ao paciente. Foi feito acompanhamento fotográfico e medida da área das úlceras nas semanas 0, 3, 21, 28, 42, 64, 79 e os resultados estão demonstrados nas Figuras 12 a 16.

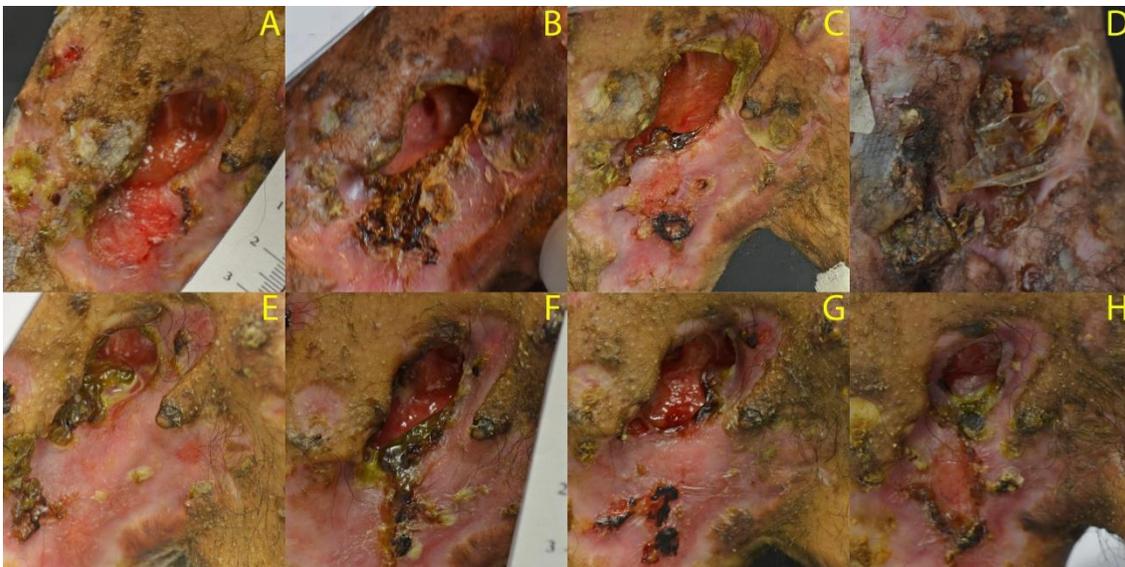


Figura 12: Evolução da úlcera – joelho direito, porção lateral: (A) semana 0, primeira aplicação de fibroblastos autólogos e membrana Q-A; (B) semana 3, segunda aplicação; (C) aspecto da lesão na semana 4; (D) semana 6, terceira aplicação da membrana Q-A; (E) semana 21, quarta aplicação; (F) semana 28, quinta aplicação; (G): semana 42, sexta aplicação; (H) semana 64, sétima aplicação.

Na Figura 12 mostra-se a evolução da úlcera do joelho direito, porção lateral, ao longo de 42 semanas de tratamento. No início do tratamento é possível notar a extensão da úlcera, com exposição óssea (Figura 12A). Observa-se na imagem referente à segunda aplicação a presença de crostas e o início da cicatrização centripetamente (Figura 12B) e, uma semana depois, uma melhora de 75% (Figura 12C). Na semana 21, momento da quarta aplicação, nota-se completa reepitelização da

porção distal da úlcera (Figura 12E). Na semana 28, devido a um quadro infeccioso sistêmico, houve pequeno aumento na extensão da ferida de $0,88 \text{ cm}^2$ para $1,22 \text{ cm}^2$ (Figura 12F) e na semana 42, apesar de um novo aumento na área de extensão da úlcera (de $1,22 \text{ cm}^2$ para $1,43 \text{ cm}^2$), foi notada uma melhora na profundidade da lesão (Figura 12G). Na sétima aplicação, efetuada na semana 64, percebe-se 87,85% de melhora desde o início (Figura 12H).

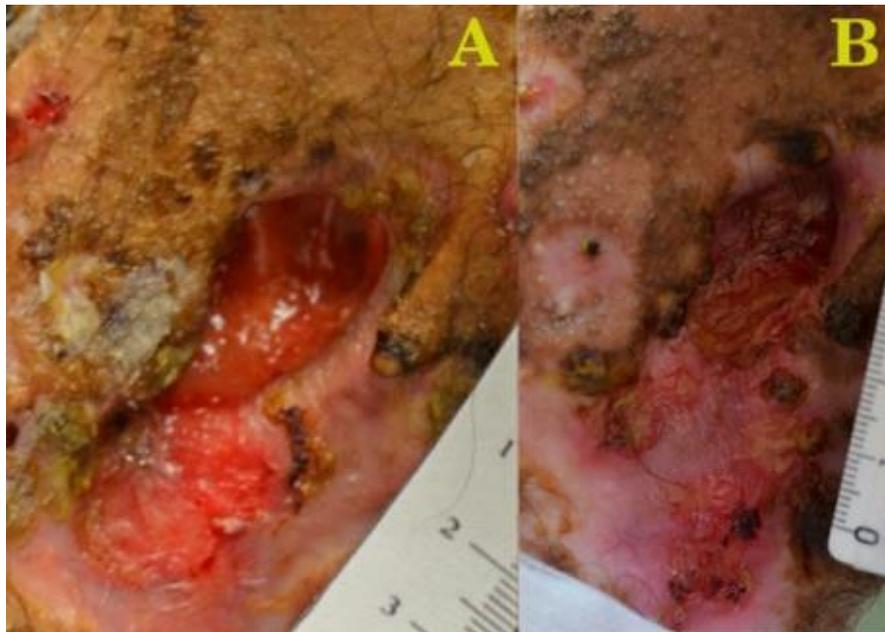


Figura 13: Evolução da úlcera localizada no joelho direito, porção lateral: (A) semana 0; (B) semana 79.

Na Figura 13, observa-se a comparação da úlcera na primeira aplicação, com uma área ulcerada de $7,82 \text{ cm}^2$ (Figura 13A) e 15 semanas após a última aplicação, com uma lesão de $0,25 \text{ cm}^2$ de área (Figura 13B), mostrando uma redução de 96,8% na área da lesão.

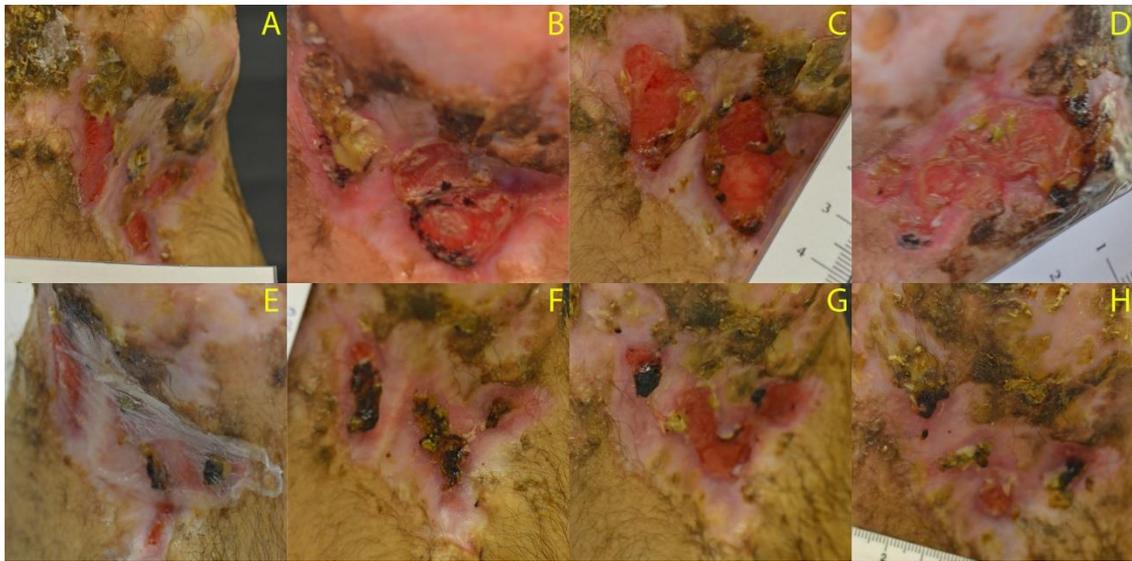


Figura 14: Evolução da úlcera localizada no joelho esquerdo, porção medial: (A) semana 0; (B) semana 3 - segunda aplicação; (C) semana 4 – 1 semana após a segunda aplicação; (D) semana 6 – terceira aplicação; (E) semana 21 – quarta aplicação; (F) semana 28 – quinta aplicação; (G): semana 42 – sexta aplicação; (H) semana 64 – sétima aplicação.

Na Figura 14 mostra-se a evolução da úlcera do joelho esquerdo, porção medial, ao longo de 42 semanas de tratamento. No início do tratamento é possível notar a extensão da úlcera, com área total de $6,08 \text{ cm}^2$ (Figura 14A). Observa-se na imagem referente à segunda aplicação a presença de crostas e o início da cicatrização (Figura 14B) e, uma semana depois, nota-se a presença de tecido de granulação (Figura 14C). Na terceira aplicação, observa-se melhora significativa na profundidade da úlcera (Figura 14D). O aspecto da úlcera após a colocação da membrana, no caso quitosana-xantana, é demonstrado na Figura 14E. Na semana 42 (sexta aplicação – Figura 14G), nota-se a presença de pequenas áreas de exulcerações devido a trauma local. Na sétima aplicação, efetuada na semana 64, percebe-se completa cicatrização da úlcera (Figura 14H).



Figura 15: Comparação da evolução da úlcera – joelho esquerdo, porção medial: (A) semana 0; (B) semana 79.

Na Figura 15 é possível avaliar a cicatrização da lesão no início e 3 meses após a última aplicação. É importante destacar que, menos de 12 horas após a aplicação das células e membranas, o paciente referiu melhora completa da dor. Dentro de dois dias, notou-se o início da cicatrização, apresentando exsudação, provavelmente secundária à cola de fibrina, presença de tecido de granulação e crostas serosas em algumas lesões. Subsequentemente, observou-se fechamento centrípeto das lesões. As úlceras menos extensas já apresentaram cicatrização completa no final da primeira semana.

A porcentagem de cicatrização alcançada foi superior a 89%, conforme demonstrado na Figura 16 e na Tabela 4, com melhora progressiva sendo observada mesmo após cinco meses da última aplicação. O paciente continua sem dor até o momento. Na avaliação das úlceras não houve edema ou quadro infeccioso nas lesões.

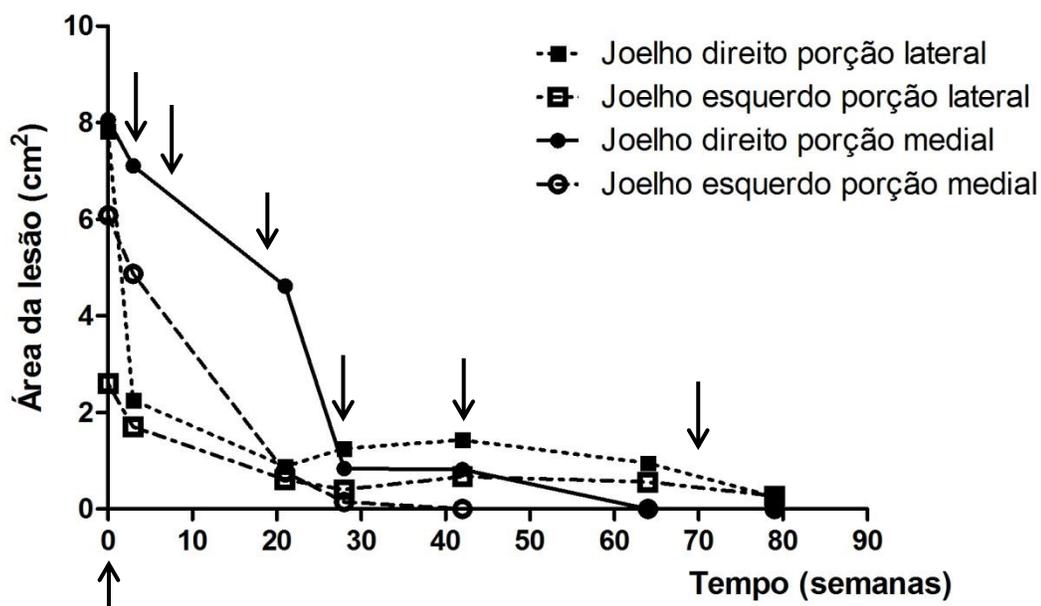


Figura 16: Evolução da cicatrização das úlceras. As setas indicam o momento da aplicação (semanas 0, 3,6, 21, 28, 42 e 70). Nas lesões do joelho direito foi utilizada membrana de quitosana-alginato e, nas do esquerdo, quitosana-xantana.

Tabela 4 – Porcentagem de reepitelização das úlceras ao final do tratamento.

Local da úlcera	Epitelização (%)
Joelho direito lateral	96,8%
Joelho esquerdo lateral	89,6%
Joelho direito medial	100
Joelho esquerdo medial	100

5.5- Respostas aos questionários de qualidade de vida

5.5.1 – Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire (CCVUQ) – versão de Couto et al. (2012):

O questionário CCVUQ, mais voltado a relação do paciente com a úlcera, foi respondido pelo paciente no dia 19/02/2014, previamente à terapia celular. As opções selecionadas estão indicadas em cinza.

1- Eu tenho dor por causa da minha úlcera:

Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	3	4	5

2- Estar com uma úlcera na minha perna me impede em fazer o seguinte:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Reunir com parentes e amigos	1	2	3	4	5
b-) Viajar de férias	1	2	3	4	5
c-) Realizar meus passatempos (<i>hobbies</i>)	1	2	3	4	5
d-) Usar transporte público	1	2	3	4	5

3- Quanto verdadeiro ou falso são as seguintes informações considerando sua úlcera na perna:

	Definitivamente falso	Na maior parte falso	Não sei	Na maior parte verdadeiro	Definitivamente verdadeiro
a-) Minha úlcera geralmente faz com que eu realize minhas atividades de forma mais lenta	1	2	3	4	5

b-) Minha úlcera me deixa preocupado em meus relacionamentos	1	2	3	4	5
c-) A secreção da minha úlcera é um problema	1	2	3	4	5
d-) Eu gasto muito tempo pensando na minha úlcera	1	2	3	4	5
e-) Eu fico preocupado que minha úlcera nunca cure	1	2	3	4	5
f-) Eu estou cansado de gastar muito tempo tratando da minha úlcera	1	2	3	4	5

4- Eu sou triste por causa da aparência das minhas pernas devido a úlcera e/ou curativos:

Não, definitivamente não	De vez em quando	Frequentemente	Toda hora (sempre)
1	2	4	5

5- A úlcera da minha perna me limita de fazer as seguintes tarefas de casa:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Cozinhar	1	2	3	4	5
b-) Limpar	1	2	3	4	5
c-) Fazer compras	1	2	3	4	5
d-) Cuidar do quintal	1	2	3	4	5

6- Eu me sinto deprimido por causa da minha úlcera na perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	4	5

7- Com relação aos curativos da sua perna, indique o quanto é um problema para você:

	Nenhum problema	Pequeno problema	Moderado problema	Grande problema	Enorme problema
a-) O volume deles	1	2	3	4	5
b-) A aparência deles	1	2	3	4	5
c-) A influência nas roupas que eu uso	1	2	3	4	5

8- Eu tenho dificuldade de andar por causa da úlcera da minha perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	4	5

O questionário foi novamente respondido pelo paciente no dia 07/10/2015, 3 meses após a última aplicação. As opções selecionadas estão indicadas em cinza.

1- Eu tenho dor por causa da minha úlcera:

Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	3	4	5

2- Estar com uma úlcera na minha perna me impede em fazer o seguinte:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Reunir com parentes e amigos	1	2	3	4	5
b-) Viajar de férias	1	2	3	4	5
c-) Realizar meus passatempos (<i>hobbies</i>)	1	2	3	4	5
d-) Usar transporte público	1	2	3	4	5

3- Quanto verdadeiro ou falso são as seguintes informações considerando sua úlcera na perna:

	Definitivamente falso	Na maior parte falso	Não sei	Na maior parte verdadeiro	Definitivamente verdadeiro
a-) Minha úlcera geralmente faz com que eu realize minhas atividades de forma mais lenta	1	2	3	4	5
b-) Minha úlcera me deixa preocupado em meus relacionamentos	1	2	3	4	5
c-) A secreção da minha úlcera é um problema	1	2	3	4	5
d-) Eu gasto muito tempo pensando na minha úlcera	1	2	3	4	5
e-) Eu fico preocupado que minha úlcera nunca cure	1	2	3	4	5
f-) Eu estou cansado de gastar muito tempo	1	2	3	4	5

tratando da minha úlcera					
--------------------------	--	--	--	--	--

4- Eu sou triste por causa da aparência das minhas pernas devido a úlcera e/ou curativos:

Não, definitivamente não	De vez em quando	Frequentemente	Toda hora (sempre)
1	2	4	5

5- A úlcera da minha perna me limita de fazer as seguintes tarefas de casa:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Cozinhar	1	2	3	4	5
b-) Limpar	1	2	3	4	5
c-) Fazer compras	1	2	3	4	5
d-) Cuidar do quintal	1	2	3	4	5

6- Eu me sinto deprimido por causa da minha úlcera na perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	4	5

7- Com relação aos curativos da sua perna, indique o quanto é um problema para você:

	Nenhum problema	Pequeno problema	Moderado problema	Grande problema	Enorme problema
a-) O volume deles	1	2	3	4	5
b-) A aparência deles	1	2	3	4	5
c-) A influência nas roupas que eu uso	1	2	3	4	5

8- Eu tenho dificuldade de andar por causa da úlcera da minha perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	4	5

5.5.2- Versão brasileira do Questionário de Qualidade de Vida – SF-36:

Um questionário alternativo, sobre qualidade de vida geral, foi respondido pelo paciente no dia 19/02/2014, previamente ao início da terapia. As opções selecionadas estão indicadas em cinza.

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rígorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de	1	2	3

pó, jogar bola, varrer a casa.			
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2

c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2
---	---	---

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime da maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo	1	2	3	4	5	6

você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?						
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

O questionário anterior foi novamente respondido pelo paciente no dia 07/10/2015, 3 meses após a última aplicação. Assim como anteriormente, as opções selecionadas pelo paciente estão indicadas em cinza.

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2

d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2
---	---	---

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

- 9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo	1	2	3	4	5	6

você tem se sentido uma pessoa feliz?						
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

Nas Tabelas 5 e 6, encontram-se sumarizados os resultados das respostas dadas no início e final do tratamento, em relação ao SF-36. Na Tabela 7 e nas Figuras 17 e 18, comparam-se os resultados.

Tabela 5: Conversão dos dados das respostas do dia 19/02/2014 para os escores finais (SF-36).

Questão	Resultado
1	2,0
2	4,0
3	10,0
4	5,0
5	3,0
6	3,0
7	3,1
8	3,0
9	3,0; 5,0; 6,0; 6,0; 3,0; 6,0; 4,0; 6,0; 4,0
10	1,0
11	1,0; 1,0; 5,0; 5,0

Tabela 6: Conversão dos dados das respostas do dia 07/10/2015 para os escores finais (SF-36).

Questão	Resultado
1	3,4
2	1,0
3	10,0
4	4,0
5	3,0
6	3,0
7	5,4
8	4,0
9	6,0; 5,0; 6,0; 5,0; 5,0; 6,0; 5,0; 6,0; 5,0
10	2,0
11	1,0; 5,0; 5,0; 5,0

A análise dos dados de 19/02/2014, do questionário SF-36, resulta em:

$$\text{a-) Capacidade funcional} = \frac{10 - 10 \times 100}{20} = 0$$

$$\text{b-) Limitação por aspecto físico} = \frac{5 - 4 \times 100}{4} = 25$$

$$\text{c-) Dor} = \frac{3,1 + 3 - 2 \times 100}{10} = 41$$

$$\text{d-) Estado geral de saúde} = \frac{2 + 12 - 5 \times 100}{20} = 45$$

$$\text{e-) Vitalidade} = \frac{3 + 3 + 4 + 4 - 4 \times 100}{20} = 50$$

$$f-) \text{ Aspectos sociais} = \frac{3 + 1 - 2 \times 100}{8} = 25$$

$$g-) \text{ Limitação por aspectos emocionais} = \frac{3 - 3 \times 100}{3} = 0$$

$$h-) \text{ Saúde Mental} = \frac{5 + 6 + 6 + 6 + 6 - 5 \times 100}{25} = 96$$

Os dados do questionário SF-36 do dia 07/10/2015, mostra os seguintes resultados:

$$a-) \text{ Capacidade funcional} = \frac{10 - 10 \times 100}{20} = 0$$

$$b-) \text{ Limitação por aspecto físico} = \frac{4 - 4 \times 100}{4} = 0$$

$$c-) \text{ Dor} = \frac{5,4 + 4 - 2 \times 100}{10} = 74$$

$$d-) \text{ Estado geral de saúde} = \frac{3,4 + 16 - 5 \times 100}{20} = 72$$

$$e-) \text{ Vitalidade} = \frac{6 + 5 + 5 + 5 - 4 \times 100}{2} = 85$$

$$f-) \text{ Aspectos sociais} = \frac{3 + 2 - 2 \times 100}{8} = 37,5$$

$$g-) \text{ Limitação por aspectos emocionais} = \frac{3 - 3 \times 100}{3} = 0$$

$$h-) \text{ Saúde Mental} = \frac{5 + 6 + 5 + 6 + 6 - 5 \times 100}{25} = 92$$

Tabela 7: Comparação do Raw Scale (SF-36) no início e final do tratamento:

Domínio	19/02/2014	07/10/2015
Capacidade funcional	0	0
Limitação por aspectos físicos	25	0
Dor	41	74
Estado geral de saúde	45	72
Vitalidade	50	85
Aspectos sociais	25	37,5
Limitação por aspectos emocionais	0	0
Saúde mental	96	92

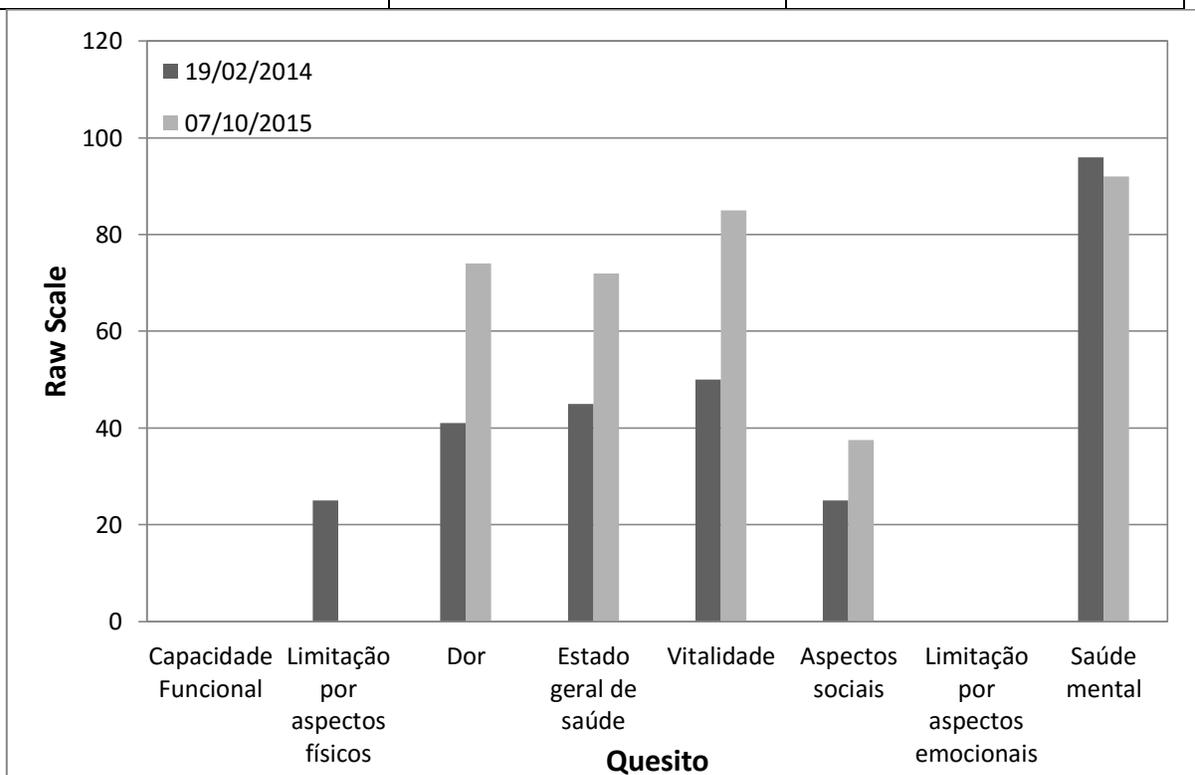


Figura 17: Comparação da análise das respostas do SF-36 inicial e final.

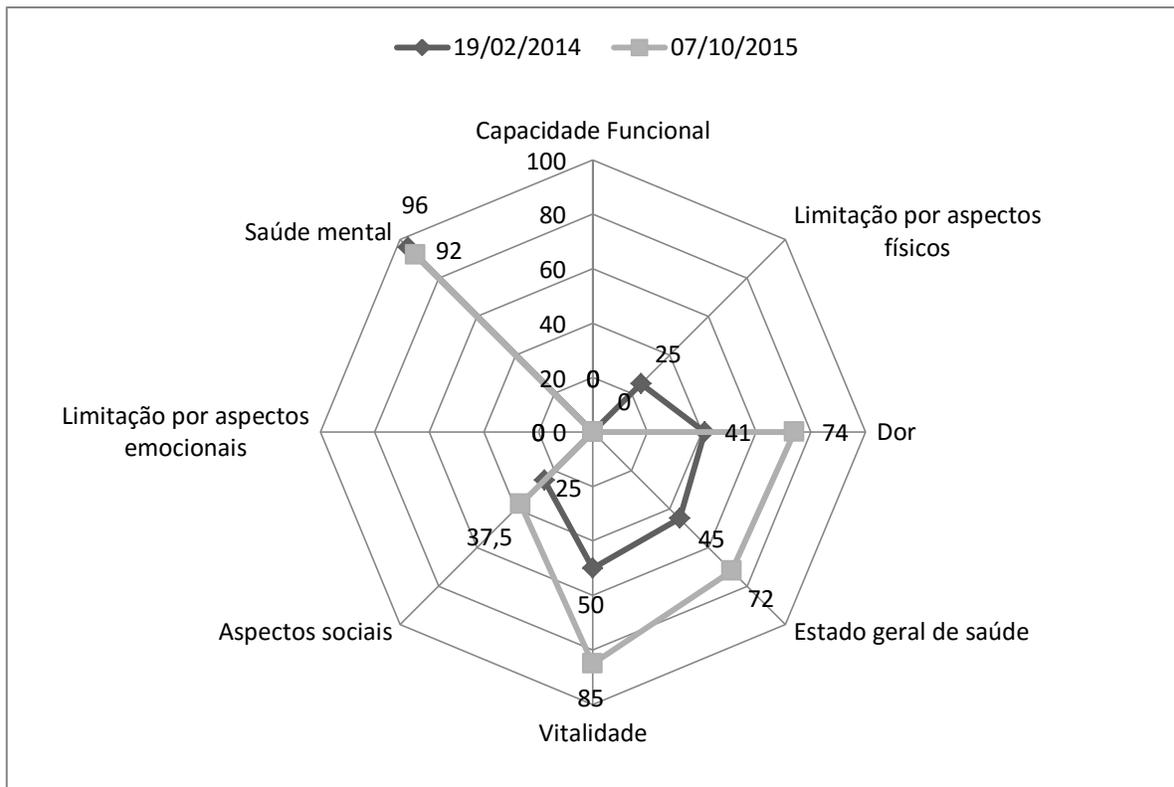


Figura 18: Apresentação da comparação do *Raw Scale* inicial e final na forma de gráfico radar.

Interessante notar que as respostas a algumas perguntas são contraditórias, pois se pode perceber melhora clínica do paciente e, o mesmo, refere melhora completa da dor e do estado geral. Entretanto, quando responde ao questionário, mostra-se pior na questão de limitação por aspectos físicos, apesar de melhora significativa da dor e da sua vitalidade.

Também, quando questionado em relação a realizar seus *hobbies*, houve piora no segundo questionário, porém refere melhora da dor e da sua relação com sua ferida e curativos.

6- Discussão

A dermatomiosite juvenil é uma doença autoimune rara, que afeta principalmente os músculos e a pele. O tratamento principal é comumente realizado com a administração de altas doses de corticosteroides associados a outras drogas imunossupressoras. Em, aproximadamente, 30% dos pacientes, a doença não é totalmente controlada, apesar de múltiplas intervenções (Batthish e Feldman, 2011; Martin *et al.*, 2012; Shinjo e Souza, 2013; Meher *et al.*, 2014; Hoeltzel *et al.*, 2014), fato observado no paciente envolvido no presente estudo. O transplante de medula óssea com células-tronco hematopoéticas autólogas foi descrito como uma última terapêutica utilizada em pacientes com DMJ refratária, porém a doença cutânea persiste, incluindo a calcinose e as contraturas (Enders *et al.*, 2015).

O tratamento de doenças ulcerativas e refratárias é complexo e mais desafiador em doenças autoimunes. A engenharia de tecidos, com foco nas culturas autólogas de queratinócitos e fibroblastos, tem sido utilizada no tratamento de úlceras cutâneas desde os anos 80. Inicialmente, essa técnica foi tentada em pacientes com queimaduras, mostrando bons resultados. Depois, um aumento na taxa de cicatrização foi observado com a aplicação de co-culturas autólogas de fibroblastos e queratinócitos cultivadas a partir de pequeno fragmento de biópsia de pele, em pacientes com úlceras diabéticas e de origem vascular (Bosnardo, 2010; Dinato *et al.*, 2012). Neste trabalho, utilizou-se a matriz polissacarídea como um curativo após a aplicação das culturas celulares de fibroblastos. Foi tentada a obtenção de culturas de queratinócitos, porém não foi possível separá-las de forma adequada para poder qualificá-la.

Nos últimos anos, a engenharia de tecidos tem avançado significativamente com a finalidade de cicatrização de úlceras e, uma das tendências na Dermatologia, é a utilização de biopolímeros em combinação com culturas celulares (células mesenquimais, fibroblastos e queratinócitos, dentre outras) no tratamento de feridas (Bellini *et al.*, 2015). Resultados relevantes foram observados no paciente envolvido no presente estudo após a aplicação de fibroblastos e queratinócitos autólogos, cobertos com membranas de quitosana-alginato ou quitosana-xantana, apesar de não se ter

realizado uma abordagem tradicional da engenharia de tecidos, uma vez que não se fez a aplicação das culturas celulares já aderidas nas membranas, dando-se, entretanto, oportunidade às mesmas para o crescimento em contato com as mesmas após a aplicação.

A proteção que as membranas oferecem contra estímulos ambientais negativos, como infecções, auxilia no processo de cicatrização. De acordo com Wang *et al.* (2002), o curativo ideal deve ser flexível e apresentar a capacidade de controlar a perda de água local. Deve ser resistente à invasão bacteriana, prevenindo sepse, ter boa aderência na úlcera, como também ser atóxico, não apresentar antigenicidade, ser fácil de aplicar e de ser removido. Do ponto de vista da engenharia, o material para o curativo deve também apresentar boas qualidades mecânicas, para que sua integridade seja mantida durante o processamento, a estocagem e o uso (Pires e Moraes, 2015). Adequadas taxas de evaporação da água também são importantes, tanto para criar um ambiente com adequada umidade para cicatrização, tanto para evitar acúmulo de fluidos na área lesionada. As duas membranas utilizadas no estudo mostraram-se adequadas, contribuindo para a regeneração cutânea e cicatrização da ferida. Também, pelo fato de serem transparentes, é possível avaliar a evolução da úlcera sem a necessidade de retirar o curativo.

A membrana de quitosana-alginato parece ter uma ação positiva no processo de remodelação cicatricial, aumentando a taxa de síntese de colágeno, melhorando a compactação das novas fibras e promovendo a presença de fibroblastos maduros (Wang *et al.*, 2002). Também parece estimular e regular algumas fases do processo cicatricial (Caetano *et al.*, 2015), sendo benéfica no tratamento de úlceras cutâneas. Tanto a síntese de colágeno como a contração da úlcera modulada pela membrana Q-A podem contribuir para uma cicatrização mais rápida (Caetano *et al.*, 2015). Talvez as membranas tenham também apresentado atuação na melhora da calcinose. Resultados equivalentes foram observados com as membranas de quitosana-xantana associadas a células mesenquimais (Bellini *et al.*, 2015).

A função da cola de fibrina na melhora da dor não é clara, no caso apresentado. Esse produto é um adesivo biológico que funciona por simular a fase exsudativa na

cicatrização, sendo frequentemente utilizado nas cirurgias plásticas e reconstrutivas, como também nos transplantes de órgãos e enxertos de pele. Supõe-se que os potenciais benefícios da cola, neste caso, além da melhora na aderência das células e da membrana na úlcera, são atribuídos à sua ação hemostática e antibacteriana (Scardino *et al.*, 1999; Currie *et al.*, 2001; Pérez-Guisado *et al.*, 2011; Jeschke *et al.*, 2013). Em condições normais, logo após o ferimento, fibrina e fibronectina são depositadas na lesão. A fibrina age como uma barreira hemostática, aderindo ao tecido e células ao redor da ferida, estimulando a migração de fibroblastos, o que deve ter ocorrido no caso apresentado. Rehder *et al.* (2013) mostraram que a aplicação apenas da cola de fibrina, sem as culturas celulares, não foi capaz de reepitelizar a ferida, e embora houvesse a formação de crosta, não foi mencionado se ocorreu redução da dor com essa terapia.

A matriz de fibrina libera fatores de crescimento, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de transformação do crescimento (TGF- β), e suas proteínas podem estar relacionadas com a melhora da dor, logo após o início do tratamento. Além disso, a ação antibacteriana do selante de fibrina e o aumento da migração e proliferação das células endoteliais devem contribuir para uma melhor vascularização, o que também predispõe a uma otimização na migração, proliferação e diferenciação de fibroblastos e queratinócitos, melhorando a cicatrização (Currie *et al.*, 2001).

Um resultado adicional observado com o decorrer do tratamento foi o fato da melhora da calcinose não só nas áreas tratadas como também à distância. Também chama atenção não ter ocorrido calcificação no local de realização da biópsia cutânea. Para esse efeito sistêmico observado, há necessidade de mais investigações para elucidar a razão dessa melhora.

A terapia celular com fibroblastos autólogos foi usada nesse trabalho como um tratamento mais efetivo nas úlceras da dermatomiosite juvenil, com um melhor resultado estético e funcional, e também com uma rápida melhora da dor. Essa estratégia de utilização de culturas celulares é um marco no tratamento de úlceras de diferentes etiopatogênias (Dinato *et al.*, 2012), e o uso das membranas de quitosana-

alginate e quitosana-xantana, em associação as células autólogas, é muito vantajoso, uma vez que as membranas podem funcionar como uma barreira física, prevenindo a contaminação microbiana ambiental (Bellini *et al.*, 2015), além de terem uma potencial ação no processo de cicatrização da úlcera. Não foi observada diferença na taxa de cicatrização, clinicamente, com as diferentes composições das membranas, pois não foram realizados estudos histopatológicos no paciente após a cicatrização das lesões, devido a questões éticas.

As culturas celulares podem ser criopreservadas e, eventualmente, utilizadas em novos implantes. Por serem autólogas, o risco de rejeição é eliminado. Outro aspecto positivo é o fato de não haver necessidade de internação hospitalar ou desbridamento das lesões.

Em relação aos questionários de qualidade de vida, o paciente, apesar da melhora clínica e relatada pelo mesmo e por sua mãe, é controverso em suas respostas. No geral, mostrou um grande ganho em relação a sua qualidade de vida, como se pode citar o fato de, após o tratamento, considerar-se tão saudável quanto qualquer outra pessoa e achar que sua saúde não irá piorar. Também, disse que, comparado há um ano, está muito melhor e sua dor está muito leve, o que se considera neste trabalho como um ganho apreciável. Pondera-se se as respostas controversas não são fruto da falta de referenciais do próprio paciente acerca de melhor condição de vida, dado que o mesmo sofre da doença desde os 5 anos de idade. Também houve ganho na mobilidade do paciente, uma vez que inicialmente precisava de ajuda para movimentar-se na cama e, ao final do tratamento realizado, conseguia se mover no leito e sentar-se por alguns momentos, provavelmente pelo fato da diminuição da dor.

Com base no observado nesse estudo, abre-se a possibilidade do tratamento de úlceras cutâneas ocasionadas por doenças sistêmicas, bem como a terapêutica da calcinose cutânea com o uso da terapia celular juntamente com a cobertura das lesões com as membranas polissacarídicas.

Este foi o primeiro trabalho que demonstrou a eficácia da terapia celular com culturas de fibroblastos e queratinócitos autólogas associadas a membranas de

quitosana-alginato e quitosana-xantana no tratamento de úlceras cutâneas em paciente com dermatomiosite juvenil. Apesar de ser uma terapêutica sofisticada e experimental, mostrou-se uma estratégia que pode ser utilizada em úlceras de diferentes etiologias com ganho não somente no fechamento das lesões, mas também na qualidade de vida do paciente.

7- Conclusões

Com base nos objetivos propostos e nos resultados observados, conclui-se que:

- 1- Os implantes de culturas de fibroblastos autólogos associados com a cola de fibrina e cobertos com as membranas polissacarídicas mostraram ser uma boa opção terapêutica no tratamento das úlceras de paciente com dermatomiosite juvenil.
- 2- Trata-se de procedimento minimamente invasivo, quando comparado com enxertos de pele tradicionais, pois há apenas a retirada de pequeno fragmento de pele, sem necessidade de internação hospitalar, sendo todo o procedimento realizado de forma ambulatorial.
- 3- A aplicação da terapia celular é rápida e indolor ao paciente, o que facilita a adesão ao tratamento.
- 4- Um banco celular do próprio paciente pode ser constituído e utilizado em aplicações subsequentes.
- 5- O procedimento não apresentou risco de rejeição ou efeito adverso detectável ao paciente.
- 6- Não houve diferença em relação à cicatrização quanto ao tipo de membrana utilizada.
- 7- Paciente mostrou-se mais seguro e confortável com a cobertura da úlcera com a membrana.
- 8- Melhora rápida e desaparecimento da dor foi relatado pelo paciente após o início do tratamento.
- 9- Melhora da qualidade de vida foi apontada pelo paciente.

Como sugestões para trabalhos futuros em continuidade a este, recomenda-se:

- 1- Analisar a viabilidade e crescimento das células sobre as membranas, determinando o tempo para alcançar o platô e verificar a possibilidade de obter-se um substituto de pele constituído deste tipo de conjunto.
- 2- Esclarecer o motivo pela melhora rápida das lesões e o desaparecimento da queixa da dor.
- 3- Avaliar o motivo pelo qual há melhora da calcificação, inclusive à distância (locais onde a terapia não foi aplicada).
- 4- Buscar compostos alternativos, em substituição à cola de fibrina, para a aderência das células à membrana e destas à lesão, visto que esta apresenta alto custo e pode ser associada à transferência de agentes adventícios ao paciente.
- 5- Investigar de forma sistemática os efeitos da cola de fibrina no tratamento proposto.
- 6- Avaliar histológica e imunohistoquimicamente o tecido cicatrizado.

8- Referências Bibliográficas

Abbade LPF, Lastória S, Rollo HA, Stolf HO. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. *International Journal of Dermatology* 2005; 44: 989–992.

Archambault M, Yaar M, Gilchrest BA. Keratinocytes and fibroblasts in a human skin equivalent model enhance melanocyte survival and melanin synthesis after ultraviolet irradiation. *Journal of Investigative Dermatology* 1985; 104(5): 859-867.

Auger FA, Rouabhia M, Goulet F, Berthod F, Moulin V, Germain L. Tissue-engineered human skin substitutes developed from collagen-populated hydrated gels: clinical and fundamental applications. *Medical and Biological Engineering & Computing* 1998 36(6): 801-812.

Barwell JR, Davies CE, Deacon F, Harvey K., Minor J, Sassano A, *et al.* Comparison of surgery and compression with compression alone in chronic venous ulceration (ESCHAR study): randomized controlled trial. *The Lancet* 2004; 363(9424): 1854-9.

Batthish M, Feldman BM. Juvenile Dermatomyositis. *Current Rheumatology Reports* 2011; 13: 216–224.

Bellini MZ, Vasconcelos MO, Moares AM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 2012; 125: E421–E431.

Bellini MZ, Caliari-Oliveira C, Mizukami A, Swiech K, Covas DT, Donadi EA, *et al.* Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications* 2015; 29(8): 1155–1166.

Bolívar-Flores YJ, Kuri-Harcuch W. Frozen allogeneic human epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. *Dermatologic Surgery* 1999; 25(8): 610–617.

Boranic M, Jakic-Razumovic J, Stanovic S, Kljenak A, Fattorini I. Skin cell culture: utilization in plastic surgery and laboratory studies. *Lijecnicki Vjesnik* 1999; 121(4-5):

137-143.

Bosnardo, CAF. Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada. *Tese de Doutorado* 2010; Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Boss WK, Usal H, Fodor PB, Chernoff G. Autologous cultured fibroblasts: a protein repair system. *Annals of Plastic Surgery* 2000; 44(5): 536-542.

Bueno CZ, Moraes AM. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. *Journal of Applied Polymer Science* 2011; 122: 624-631.

Cabral ALS - Insuficiência venosa crônica de membros inferiores: prevalência, sintomas e marcadores preditivos. *Tese de Doutorado* 2000; Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo.

Caetano GF, Frade MAC, Andrade TAM, Leite MN, Bueno CZ, Moraes AM, *et al.* Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 2015; 103(5): 1013-1022.

Cañas CA, Bonilla-Abadía F, Mejía M, Tobón GJ. Recovery of severe muscular and fascial calcinosis after treatment with bisphosphonates in a child with juvenile dermatomyositis. *Journal of Clinical Rheumatology* 2015; 21: 267–269.

Canella AMNC e Garcia RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – Influência do método de preparação e do solvente *Química Nova On Line* 2001; 24(1): 13-17.

Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, *et al.* Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns* 2000; 26(4): 379-387.

Chan LW, Lee HY, Heng PWS. Production of alginate microspheres by internal gelation

- using emulsification method *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 242: 259-262.
- Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of dermal fibroblasts on epidermalization. *Journal of Investigative Dermatology* 1989; 92: 122-125.
- Couto RC, Leal FJ, Pitta GBB, Bezerra RCB, Segundo WSS, Tatiana de Mendonça Porto TM. Tradução e adaptação cultural do *Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire* – Brasil. *Jornal Vascular Brasileiro* 2012; 11(2): 102-107.
- Craveiro AA, Craveiro AC, Queiroz DC. Quitosana – a fibra do futuro, Padetec, 1999; p124.
- Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. Use of Fibrin Glue in Skin Grafts and Tissue-Engineered Skin Replacements: A Review *Plastic and Reconstructive Surgery* 2001; 108: 1713-1726.
- De-Sousa DA, Marchesan WG, Greene LJ. Epidemiological data and mortality rate of patients hospitalized with burns in Brazil. *Burns* 1998; 4: 433- 438.
- Dinato M, Puzzi MB, Rehder J, Batista F. Tissue therapy with autologous dermal and epidermal culture cells for diabetic foot ulcers. *Cell Tissue Bank* 2012; 13: 241-249.
- Eckert RL, Crish JF, Robinson NA. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiological Reviews* 1997; 77: 397-424.
- El-Sheemy MA, Muir IF, Wheatley DN, Eremin O. Inhibition of the contraction of collagen gels by extracts from human dermis. *Cell Biology International* 2001; 25(7): 635-642.
- Enders FB, Delemarre EM, Kuemmerle-Deschner J, Torre P, Wulffraat NM, Prakken BP, *et al.* Autologous stem cell transplantation leads to a change in proinflammatory plasma cytokine profile of patient with juvenile dermatomyositis correlating disease activity. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2015; 74 (1): 315-317.
- Frade MACF. Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis* Tese de Doutorado 2003. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Gawryszewski VP, Koizumi MS, Mello-Jorge MHP. As causas externas no Brasil no ano 2000: comparando mortalidade e morbidade. *Caderno de Saúde Pública* 2004; 20(4): 995-1003.

Gómez C, Galán JM, Torrero V, Ferreiro I, Pérez D, Palao R, *et al.* Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: Clinical and functional outcomes. A multicentric study *Burns* 2011; 37: 580-589.

González-Consuegra RV e Verdú J. Quality of life in people with venous leg ulcers: an integrative review. *Journal of Advanced Nursing* 2011; 67(5): 926-44.

Green J, Jester R. Health-related quality of life and chronic venous leg ulceration: part 2. *British Journal of Community Nursing* 2010; 15(3): S4-6, S8, S10, *passim*.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration *Nature* 2008; 453: doi:10.1038/nature07039.

Gutierrez Jr A e Wetter DA. Calcinosis cutis in autoimmune connective tissue diseases. *Dermatologic Therapy* 2012; 25: 195–206.

Hareendran A, Bradbury A, Budd J, Geroulakos G, Hobbs R, Kenkre J, *et al.* Measuring the impact of venous leg ulcers on quality life. *Journal of Wound Care* 2005; 14(2): 53-7.

HealthNow New York Inc. Divisão BlueCross BlueShield of Western New York. Disponível em http://securews.bcbswny.com/content/dam/COMMON/Provider/Protocols/B/prov_prot_70113.pdf Acesso em 12/08/2015.

Hoeller D, Huppertz B, Roos TC, Gutiérrez PP, Merk HF, Frank J, *et al.* An improved and rapid method to reconstruct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. *Experimental Dermatology* 2001; 10(4): 264-271.

Hoeltzel MF, Oberle JE, Robinson AB, Agarwal A, Rider LG. The presentation, assessment, pathogenesis and treatment of calcinosis in Juvenile Dermatomyositis. *Current Rheumatology Reports* 2014; 16: 467.

Holloway S, Harding K, Stechmiller JK, Schultz G. Acute and chronic wound healing. In:

Baranoski S, Ayello EA. *Wound Care Essentials* 3ª edição, cap. 5, p.83-100, Estados Unidos: Wolters Klumer/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Horch RE, Bannasch H, Kopp J, Andree C, Stark GB. Single-cell suspensions of cultured human keratinocytes in fibrin-glue reconstitute the epidermis. *Cell Transplant* 1998; 7(3): 309-317.

Horch RE, Bannasch H, Stark GB. Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. *Transplantation Proceedings* 2001; 33(1-2): 642-644.

Huang Y, Ren L, Qin Y. Observation of cicatricial fibroblasts in culture and its biological properties. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 1998; 12(6): 332-5.

Jansson K, Haegerstrand A, Kratz G. A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human in vivo wound healing. *Scandinavian Journal of Plastic Reconstruction and Hand Surgery* 2001; 35(4):369–375.

Jeschke MG, Finnerty CC, Shahrokhi S, Branski LK, Dibildox M, ABA Organization and Delivery of Burn Care Committee. Wound Coverage Technologies in Burn Care: Novel Techniques *Committee Journal of Burn Care & Research* 2013; 34(6): doi:10.1097/BCR.0b013e31829b0075.

Josué A, Fávere VT, Laranjeira MCM, Kimura IY, Pedrosa, RC. Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e poli (ácido acrílico). *Polímeros Ciência e Tecnologia* 2000; 10(3): 116-121.

Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2000; 3(3): 303-311.

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. *British Journal of Plastic Surgery* 1999; 52(7):573–578.

Kopp J, Jeschke MG, Bach AD, Kneser U, Horch RE. Applied tissue engineering in the

closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix *Cell and Tissue Banking* 2004; 5: 89-96.

Krasna M, Planinsek F, Knezevic M, Arnez ZM, Jeras M. Evaluation of fibrin-based skin substitute prepared in a defined keratinocyte medium *International Journal of Pharmaceutics*, 2005; 291: 31-37.

Kremer M, Lang E, Berger AC. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents (composite-skin) of human keratinocytes in a collagen-glycosaminoglycan matrix (Integra™ Artificial Skin). *British Journal of Plastic Surgery* 2000; 53(6): 459-465.

Laurencin CT, Attawia MA, Lu LQ, Borden MD, Lu HH, Gorum WJ, *et al.* Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite delivery of BMP-2-producing cells: a regional gene therapy approach to bone regeneration. *Biomaterials* 2001; 22: 1271-1277.

Lemoine D, Wauters F, Bouchend'Homme S, Pr at V. Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 176 (1): 9-19.

Lim LY, Khor E, Ling CE. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan *Journal of Biomedical Materials Research B (Applied Biomaterials)* 1999; 48: 111-116.

Lintner KE, Patwardhan A, Rider LG, Abdul-Aziz R, Wu YL, Lundstr m E, *et al.* Gene copy-number variations (CNVs) of complement C4 and C4A deficiency in genetic risk and pathogenesis of juvenile dermatomyositis. *Annals of the Rheumatic Disease* 2015; 0: 1-8. doi:10.1136/annrheumdis-2015-207762.

Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatriza o: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2003; 78(4):393-410.

Maffei FHA. Varizes dos membros inferiores: epidemiologia, etiopatogenia e fisiopatologia. In: Doenças vasculares perif ricas. 3^a edição, cap 109, p.1499-1510, Rio de Janeiro: MEDSI, 2002.

Martin TA, Hilton J, Jiang WG, Harding K. Effect of human fibroblast-derived dermis on

expansion of tissue from venous leg ulcers *Wound Repair and Regeneration* 2003; 11: 292-296.

Martin N, Li CK, Wedderburn LR. Juvenile dermatomyositis: new insights and new treatment strategies. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2012; 4(1): 41-50.

McGrath JA e Uitto J. Anatomy and organization of human skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C. *Rook's Textbook of Dermatology* 8ª edição, cap 3, p.3.1-3.53, Inglaterra: Wiley-Blackwell, 2010.

Meher BJ, Pravakar M, Pradeep S, Padhan P. Severe calcinosis cutis with cutaneous ulceration in juvenile dermatomyositis. *Indian Pediatrics* 2014; 927 (51): 925-927.

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clinics in Dermatology* 2007; 25: 19–25.

Ministério da Saúde Resolução CNS 196/96. Disponível em http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/23_out_versao_final_196_ENCEP2012.pdf, Acesso em 28/10/2015.

Mofidi N, Aghai-Moghadam M, Sarbolouki MN. Mass preparation and characterization of alginate microspheres *Process Biochemistry* 2000; 35(9): 885-888.

Moll I, Houdek P, Schmidt H, Moll R. Characterization of epidermal wound healing in a human skin organ culture model: acceleration by transplanted keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 1998; 111: 251-258.

Morrel CJ, Walters SJ, Dixon S, Collins KA, Brereton LML, Peters J. Cost effectiveness of community leg ulcer clinics: randomised controlled Trial. *British Medical Journal* 1999; 316(7143): 1487-91.

Muzzarelli R, Baldassarre V, Ferrera P, Biagini G. Biological activity of chitosan ultrastructural study *Biomaterials* 1988; 9: 247-252.

National Library of Medicine. Skin layers. Disponível em 2014. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/8912.htm>. Acesso em

24/10/2015.

Nelson EA. Health related quality of life measurement. *EWMA Journal*. 2002; 2(1): 5-7.

NM Human Services Department (HSD). New Mexico medicaid fee for service HCPCS level II codes fee schedule. Disponível em: http://www.hsd.state.nm.us/uploads/FileLinks/e7cfb008157f422597ccc11d2034f0/HCPCS_CODE_FEE_SCHEDULE_4_15.pdf - Acesso em 17/08/2105

Oliveira IVPM e RVC Dias. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência *Acta Veterinaria Brasilica* 2012; 6(4): 267-271.

Palaniappan P, Lionel AP, Kumar S. Successful treatment of calcinosis cutis in juvenile Dermatomyositis with pamidronate. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*. 2014; 20(8): 454-455.

Paul W, Sharma CP. Chitosan and alginate wound dressings: a short review *Trends in Biomaterials & Artificial Organs* 2004; 18(1): 18-23.

Pérez-Guisado J, Gaston KL, Benítez-Goma JR, Cabrera-Sánchez E, Fidalgo-Persoon A, Heinen MM, Van Der Vleuten CJ, Rooij MJ, Van Der Kerkhof PC, Van Achterburg T. Leg ulcers: a review of their impact on daily life. *Journal of Clinical Nursing* 2004; 13(3): 341-54.

Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review. *Burns* 2007; 33: 946-957.

Philips TJ, Dover JS. Leg ulcers. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1991; 25: 965-987.

Philips TJ. Chronic cutaneous ulcers: etiology and epidemiology. *Journal of Investigative Dermatology* 1994; 102: 38-41s.

Pires ALR, Moraes AM. Improvement of mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through addition of biocompatible silicone rubber. *Journal of Applied Polymer Science* 2015; 132 (12): DOI: 10.1002/app.41686.

Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quimica Nova* 2015; 38(7): 957-971.

Priority Health. Disponível em: http://www.priorityhealth.com/provider/manual/auths/~//media/documents/medical_policies/91560.pdf - Acesso em 12/08/2105.

Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 81(Suppl 1): 28s-33s.

Régnier M, Patwardhan A, Scheynius A, Schmidt R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Medical & Biological Engineering & Computing* 1998; 36:821-824.

Rehder J, Souto LRM, Issa CM, Puzzi MB. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. *São Paulo Medical Journal* 2004 ; 122(1):22-5.

Rehder J, Bosnardo CAF, Kraft MBPL, Frade MAC, Guillaumon AT, Batista FBX *et al.* A comparative study of cell therapy and fibrin glue applied to chronic venous ulcers. *Procedia Engineering* 2013 ; 59 : 85-91.

Rodrigues AP, Sanchez EMS, Costa AC, Moraes AM. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science* 2008; 109: 2703-2710.

Ronfard V, Broly H, Mitchell V, Galizia JP, Hochart D, Chambon E, *et al.* Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns* 1991; 17(3): 181-184.

Sakar PK, Ballantyne S. Management of leg ulcers *Postgrad Medical Journal* 2000; 76: 674-682.

Scardino MS, Swaim SF, Morse BS, Sartin EA, Wright JC, Hoffman CE. Evaluation of Fibrin Sealants in Cutaneous Wound Closure. *Journal of Biomedical Materials Research B (Applied Biomaterials)* 1999; 48: 315–321.

Shinjo SK, Souza FHC. Update on the treatment of calcinosis in dermatomyositis.

Revista Brasileira de Reumatologia 2013; 53(2):211–214.

Silva SS. Processing and surface modification of novel natural origin architectures aimed for biomedical applications. *Tese de Doutorado*. 2008; Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal.

Souto LRM. Modelo de pele humana (Derme + Epiderme) Reconstruída In Vitro *Dissertação de Mestrado*. 2005; Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Souto LRM, Rehder J, Vassalo J, Cintra ML, Kraemer MHS, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. *São Paulo Medical Journal* 2006; 124(2):71-6.

Taube MB, Taïeb A. Lipid metabolism in cultured keratinocytes. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 2000; 75(1): 75-84.

Terskikh VV, Vasiliev AV. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *International Review of Cytology* 1999; 188: 41-72.

Urmacher CD. Normal Skin. In: Sternberg SS. *Histology for pathologists*. 2ª edição, p.25-45, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

Valenzuela A, Chung L, Casciola-Rosen L, Fiorentino D. Identification of Clinical Features and Autoantibodies Associated With Calcinosis in Dermatomyositis. *The Journal of the American Medical Association – JAMA - Dermatology* 2014; 150(7):724-729.

Veiga IG. Uso de xantana em substituição ao alginato em membranas coacervadas de quitosana projetadas para a cicatrização de lesões de pele. *Dissertação de Mestrado*. 2009; Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Veiga IG, Moraes AM. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. *Journal of Applied Polymer Science* 2012; 124: E154-E160.

Wakabayashi T, Sasaki N, Chinen N, Suzuki Y. Dramatic improvement of subcutaneous calcinosis by intermittent, high-dose etidronate plus cimetidine in a patient with juvenile dermatomyositis. *Case Reports in Rheumatology* 2015; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/817592>.

Wang L, Khor E, Wee, Lim LY. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2002; 63 (5): 610–618.

Watt FM. The epidermal keratinocyte. *Bioessays* 1998; 8(5): 163-7.

Wei X, Fricker K, Enk AH, Hadaschik EV. Altered expression of keratin 14 in lesional epidermis of autoimmune skin diseases *International Journal of Dermatology* 2015; doi: 10.1111/ijd.13011.

Zhang R, Ma PX. Poly(alpha-hydroxyl acids) hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 44: 446-455.

Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC, Zhang W, Zhang J, *et al.* Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials* 2002; 23: 3227-3234.

9- Anexos

9.1- Autorização de uso da Figura 2:

03/01/2016

RightsLink Printable License

NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 03, 2016

This is a License Agreement between Paula T Colpas ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

License Number	3781301070959
License date	Jan 03, 2016
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Wound repair and regeneration
Licensed content author	Geoffrey C. Gurtner, Sabine Werner, Yann Barrandon, Michael T. Longaker
Licensed content date	May 14, 2008
Volume number	453
Issue number	7193
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Figures	Figura 2: Fases da cicatrização – a) inflamação; b) proliferação; c) maturação (adaptado de Gurtner et al., 2008). Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration Nature 2008; 453: doi:10.1038/nature07039.
Author of this NPG article	no
Your reference number	None
Title of your thesis / dissertation	Cell Therapy in Patient with Skin Ulcers using Cultured Fibroblasts Associated with Membranes Obtained by the Combination of Chitosan to Anionic Polysaccharides
Expected completion date	Jan 2016
Estimated size (number of pages)	127
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

<https://s100.copyright.com/AppDispatchServlet>

1/3

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.
3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.

5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

Note: For republication from the *British Journal of Cancer*, the following credit lines apply.

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication) For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME], advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

Note: For adaptation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication).

Note: For translation from the *British Journal of Cancer*, the following credit line applies.

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd on behalf of Cancer Research UK: [JOURNAL NAME] (reference citation), copyright (year of publication)

03/01/2016

RightsLink Printable License

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

Special Terms:

v1.1

Questions? customer care@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

9.2- Autorização para uso da Figura 3:

03/01/2016

RightsLink Printable License

WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 03, 2016

This Agreement between Paula T Colpas ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	3781311310218
License date	Jan 03, 2016
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Plastic and Reconstructive Surgery
Licensed Content Title	The Use of Fibrin Glue in Skin Grafts and Tissue-Engineered Skin Replacements: A Review.
Licensed Content Author	Lachlan Currie, Justin Sharpe, and Robin Martin
Licensed Content Date	Jan 1, 2001
Licensed Content Volume Number	108
Licensed Content Issue Number	6
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
Portion	Figures/table/illustration
Number of figures/tables/illustrations	1
Figures/tables/illustrations used	1
Author of this Wolters Kluwer article	No
Title of your thesis / dissertation	Cell Therapy in Patient with Skin Ulcers using Cultured Fibroblasts Associated with Membranes Obtained by the Combination of Chitosan to Anionic Polysaccharides
Expected completion date	Jan 2016
Estimated size(pages)	127
Requestor Location	Paula T Colpas Rua Dr João Lopes Vieira, 108 apto 132 1 CAMPINAS, Brazil 13087734 Attn: Paula T Colpas
Billing Type	Invoice
Billing Address	Paula T Colpas Rua Dr João Lopes Vieira, 108 apto 132 1 CAMPINAS, Brazil 13087734 Attn: Paula T Colpas
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Terms and conditions Wolters Kluwer Health

1. **Transfer of License:** Wolters Kluwer hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions herein
2. **Credit Line:** A credit line will be prominently placed, wherever the material is reused and include: the author(s), title of article, title of journal, volume number, issue number and inclusive pages.
Where a journal is being published by a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
 - i. **for Open access journals:**The following statement needs to be added when reprinting the material in Open Access journals only: 'promotional and commercial use of the material in print, digital or mobile device format is prohibited without the permission from the publisher Wolters Kluwer Health. Please contact healthpermissions@wolterskluwer.com for further information
3. **Exceptions:** In case of *Disease Colon Rectum, Plastic Reconstructive Surgery, The Green Journal, Critical care Medicine, Pediatric Critical Care Medicine, the American Heart Publications, the American Academy of Neurology* the following guideline applies: no drug/ trade name or logo can be included in the same page as the material re-used.
4. **Translations:** When requesting a permission to translate a full text article, Wolters Kluwer/ Lippincott Williams & Wilkins request to receive the pdf of the translated document. This disclaimer should be added at all times:
Wolters Kluwer Health and its Societies take no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.
5. **Warranties** The requestor warrants that the material shall not be used in any manner which may be considered derogatory to the title, content, or authors of the material, or to Wolters Kluwer
6. **Indemnity:** You hereby indemnify and hold harmless Wolters Kluwer and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims, costs, proceeding or demands arising out of your unauthorised use of the Licensed Material.
7. **Geographical Scope:** Permission granted is valid worldwide in the English language and the languages specified in your original request
8. Wolters Kluwer cannot supply the requestor with the original artwork or a "clean copy."
9. Permission is valid if the borrowed material is original to a Wolters Kluwer imprint (Lippincott-Raven Publishers, Williams & Wilkins, Lea & Febiger, Harwal, Rapid Science, Little Brown & Company, Harper & Row Medical, American Journal of Nursing Co, and Urban & Schwarzenberg)
10. **Termination of contract:** If you opt not to use the material requested above please notify RightsLink or Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins within 90 days of the original invoice date.
11. This permission does not apply to **images** that are credited to publications other than Wolters Kluwer journals. For images credited to non-Wolters Kluwer Health journal publications, you will need to obtain permission from the journal referenced in the figure or table legend or credit line before making any use of image(s) or table(s)
12. **Third party material:** Adaptations are protected by copyright, so if you would like to reuse material that we have adapted from another source, you will need not only our permission, but the permission of the rights holder of the original material. Similarly, if you want to reuse an adaptation of original LWW content that appears in another publishers work, you will need our permission and that of the next publisher. The adaptation should be credited as follows: Adapted with permission from Wolters Kluwer Health: Book author, title, year of publication or Journal name, article author, title, reference citation, year of publication.
13. **Altering or modifying material:** Please note that modification of text within figures or full-text article is strictly forbidden.
14. Please note that articles in the **ahead-of-print stage** of publication can be cited and the content may be re-used by including the date of access and the unique DOI number. Any final changes in manuscripts will be made at the time of print publication and will be reflected in the final electronic issue. Disclaimer: Articles appearing in the Published Ahead-of-Print section have been peer-reviewed and accepted for publication in the relevant journal and posted online before print publication. Articles appearing as publish ahead-of-print may contain statements, opinions, and information that have errors in facts, figures, or

03/01/2016

RightsLink Printable License

interpretation. Accordingly, Lippincott Williams & Wilkins, the editors and authors and their respective employees are not responsible or liable for the use of any such inaccurate or misleading data, opinion or information contained in the articles in this section.

15. Duration of the license:

- i. Permission is granted for a one-time use only within 12 months from the date of this invoice. Rights herein do not apply to future reproductions, editors, revisions, or other derivative works. Once the 12- month term has expired, permission to renew must be submitted in writing.
- ii. For content reused in another journal or book, in print or electronic format, the license is one-time use and lasts for the 1st edition of a book or for the life of the edition in case of journals.
- iii. If your Permission Request is for use on a website (which is not a journal or a book), internet, intranet, or any publicly accessible site, you agree to remove the material from such site after 12 months or else renew your permission request.

16. Contingent on payment: *While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.*

17. Waived permission fee: If the permission fee for the requested use of our material has been waived in this instance, please be advised that your future requests for Wolters Kluwer materials may attract a fee on another occasion. Please always check with the Wolters Kluwer Permissions Team if in doubt healthpermissions@wolterskluwer.com

For Books only:

18. Permission is granted for a one time use only. Rights herein do not apply to future reproductions, editions, revisions, or other derivative works.

Service Description for Content Services

Subject to these terms of use, any terms set forth on the particular order, and payment of the applicable fee, you may make the following uses of the ordered materials:

• **Content Rental:** You may access and view a single electronic copy of the materials ordered for the time period designated at the time the order is placed. Access to the materials will be provided through a dedicated content viewer or other portal, and access will be discontinued upon expiration of the designated time period. An order for Content Rental does not include any rights to print, download, save, create additional copies, to distribute or to reuse in any way the full text or parts of the materials.

• **Content Purchase:** You may access and download a single electronic copy of the materials ordered. Copies will be provided by email or by such other means as publisher may make available from time to time. An order for Content Purchase does not include any rights to create additional copies or to distribute copies of the materials.

The materials may be accessed and used only by the person who placed the Order or the person on whose behalf the order was placed and only in accordance with the terms included in the particular order.

SPECIAL CASES:

1. **For STM Signatories only, as agreed as part of the STM Guidelines**

03/01/2016

RightsLink Printable License

Any permission granted for a particular edition will apply also to subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted illustrations or excerpts.

Please click [here](#) to view the STM guidelines.

Other Terms and Conditions:

v1.13

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

9.3- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Centro de Investigação em Pediatria - CIPED

Laboratório de Cultura de Células da Pele e Epiderme Reconstruída

(LCCP)

Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Dermatologia

Título do Estudo: **MODELO DE SUBSTITUTO DE PELE HUMANA
CONSTITUÍDA DE CO-CULTURAS DE QUERATINÓCITOS E
FIBROBLASTOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS DE QUITOSANA
COMPLEXADA COM POLISSACARÍDEOS ANIÔNICOS**

Responsáveis:

Paula Tavares Colpas

Prof^a Dr^a Maria Beatriz Puzzi

Prof^a Dr^a Ângela Maria Moraes

Código do Paciente (para ocultar identidade /se necessário): _____

Nome do Paciente: _____

Data de Nascimento: ___/___/___, Idade: ___ RG: _____

Endereço: Rua/Av.: _____

Aptº/Compl.: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ Telefone(s):(____) _____

HOSPITAL: _____

Nº de Registro no Hospital: _____

Nome do Responsável legal pelo Paciente: _____

_____ (Caso seja necessário)

Data de Nascimento: ___/___/___, Idade: ___ RG: _____

Endereço: Rua/Av.: _____

Aptº/Compl.: _____ Bairro: _____ Cidade: _____

Estado: _____ Telefone(s):(____) _____

Grau de Parentesco: _____ Exigir documento (comprovante)

1. Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar de um Estudo de Pesquisa sobre uso de derivados de pele e pele autóloga, ou seja do(a) próprio(a) paciente, multiplicada e reconstruída em laboratório a partir de um fragmento de pele do(a) próprio(a) paciente, para tratamento de queimadura(s) e úlcera (s) (feridas).

Queimaduras e úlceras são freqüentemente tratadas localmente com curativos e enxertia de pele, pele esta retirada do próprio paciente, de um local sem queimadura(s) ou ferida(s) e de proporção semelhante ao tamanho da área que se pretende cobrir (área queimada).

O objetivo deste Estudo é avaliar a eficácia do uso de derivados de pele

(queratinócitos, fibroblastos, ou seja, células que formam a pele), junto com matrizes biológicas, no tratamento de queimaduras agudas de pele, visando oferecer um tratamento equivalente ao usualmente empregado (enxertia), com menor quantidade de pele a ser retirada de áreas corporais não comprometidas pela(s) queimadura(s) e de úlceras de causas variadas e duração variadas.

Não há relação deste Estudo com outros Estudos que vêm sendo realizados em alguns países, como França, Estados Unidos da América e China, embora sejam similares e todos visem chegar a tratamentos com menores riscos (morbidade) e melhores resultados no tratamento de pacientes queimados.

Os custos relativos ao tratamento padrão serão cobertos, como normalmente seriam, pela Instituição onde se encontra internado(s) ou fazem o acompanhamento ambulatorial o(s) paciente.

2. Desenho do Estudo

Para ser elegível e participar deste Estudo, você deve ser vítima de queimadura por fogo, contato, escaldamento, eletricidade, agentes químicos e físicos, ou qualquer outra causa, que resulte em lesões de 2º e/ou 3º graus. Também poderão fazer parte pacientes que apresentem qualquer tipo de úlcera, desde que não apresente infecção no momento.

A primeira parte é um processo de triagem que determinará se você é elegível para o Estudo, e permitirá que o(s) médico(s) documente(m) cuidadosamente o seu caso e seu estado geral de saúde. Você será entrevistado e será submetido a exame físico, caso este ainda não tenha sido realizado. Você será submetido, sob anestesia, à coleta de um pequeno fragmento de pele, que será utilizado como fonte de células para a obtenção do tipo de enxerto determinado para o seu caso. Será realizada documentação fotográfica da(s) área(s) queimada(s), sem que seja possível a sua identificação.

A segunda parte do Estudo consiste na colocação do enxerto determinado para o

seu caso sobre a área receptora (queimada ou ferida), num período de 10 a 20 dias após a coleta inicial de pele. Essa colocação não acarreta dor e é feita após simples limpeza da área receptora. Será realizada nova documentação fotográfica nessa fase.

A terceira parte é um período de acompanhamento e observação de 3 meses, a contar da data da enxertia. No primeiro mês serão realizadas avaliações semanais e, após, avaliações mensais. Após o 3º mês você passará a ser acompanhado pela equipe médica da Instituição onde você já faz o acompanhamento, salvo em caso de eventual necessidade de acompanhamento por um período maior.

Você também poderá ser solicitado, eventualmente, a preencher um breve questionário que abrange diversos aspectos do impacto da doença e do tratamento sobre a sua saúde geral e atividade.

Uma vez que o presente Estudo está sendo conduzido para avaliar tipos específicos de tratamento para queimaduras e úlceras, não será permitido que você seja tratado com medicações não permitidas pela equipe médica do Estudo ou em Centros de Tratamento não participantes do Estudo, salvo no caso de você desistir de participar do Estudo em qualquer momento, quaisquer que sejam os motivos.

3. Implicações da Participação

a) Riscos

Além da inconveniência das visitas ao médico nas datas determinadas, o tratamento e procedimentos deste Estudo podem envolver, os seguintes riscos e desconfortos previsíveis:

Gestação: Embora o presente Estudo não faça uso de nenhum tipo de droga sistêmica ou local potencialmente danosa para você ou ao feto, é essencial que homens e mulheres em idade fértil utilizem métodos contraceptivos eficazes durante a participação no presente Estudo. Isto inclui o período de tratamento e, no mínimo, três meses após o final do tratamento. O controle contraceptivo aceitável pelos médicos pode incluir, mas não está limitado a, o uso de contraceptivos orais, DIUS,

preservativos, diafragmas, implantes, esterilização cirúrgica ou pós-menopausa. Entretanto, nenhum método contraceptivo elimina completamente o risco de gravidez. Caso ocorra gestação, pode haver um risco de aborto espontâneo, defeitos congênitos ou outras condições médicas imprevisíveis.

Seu médico deve ser notificado imediatamente caso você engravide durante o Estudo Clínico ou no período de três meses após o final do tratamento.

Informações Gerais: Caso você concorde em participar do Estudo e independentemente do tratamento que você receba, você deverá procurar auxílio médico sem retardo e contatar o médico que o trata neste Estudo, caso apresente dúvida(s) a qualquer momento.

Biópsias da(s) Área(s) Receptora(s): As biópsias de pele na(s) área(s) receptora(s), são procedimentos simples, que não acarretam grandes riscos. Entretanto, há algum desconforto associado aos procedimentos. Os procedimentos serão realizados sob anestesia local. Os riscos incluem: pequeno sangramento no(s) local(is) da(s) biópsia(s), que não costuma durar mais que alguns minutos e possibilidade de infecção local (celulite).

Ausência de Eficácia do Tratamento: O tratamento poderá não ser eficaz na resolução do seu caso, por problemas independentes ou relacionados ao Estudo. Neste caso você será excluído do Estudo e receberá tratamento convencional.

Riscos Desconhecidos: Há a possibilidade de que ocorram complicações e efeitos colaterais desconhecidos no momento. Você será informado a respeito de quaisquer novos achados significativos que possam se desenvolver com o tratamento e que possam afetar sua disposição em continuar a participação no Estudo. Você será solicitado a reconhecer por escrito que foi informado a respeito destes achados.

b) Benefícios

Caso seu tratamento seja eficaz, você irá se beneficiar na medida em que será exposto a menor morbidade (risco), uma vez que terá uma área doadora de pele consideravelmente menor, com menores chances de infecção, perdas plasmáticas

("soro sanguíneo") menores, com reduzidas chances de distúrbios hidroeletrólíticos causados pelo aumento da área cruenta e poucas sequelas (cicatrizes) decorrentes do tratamento.

c) Tratamento Alternativo

Caso você decida não participar do presente Estudo, você receberá o tratamento padrão para queimadura(s) e úlcera(s), conforme determinado por seu médico.

d) Responsabilidades dos Participantes

Caso você decida participar, você deverá fornecer informações a respeito de sua saúde durante todo o Estudo, particularmente alterações benéficas ou adversas. Conforme mencionado anteriormente, você deve relatar qualquer gravidez ocorrida com você. Caso você procure tratamento com seu Clínico Geral ou quaisquer outros profissionais de saúde, você deve lembrá-los a respeito de seu envolvimento no Estudo.

É importante que você siga as instruções de seu médico com relação à medicação e procedimentos de Estudo. Gostaríamos que você relatasse todos os sinais e sintomas, independentemente de qual tratamento você possa estar recebendo ou se você considera que o sinal/sintoma esteja ou não relacionado ao Estudo. Por favor, nos informe sobre quaisquer medicações adicionais ou regulares durante seu envolvimento no Estudo.

4. Tratamento Médico

Você receberá tratamento médico gratuito para qualquer lesão que comprovadamente guarde relação direta com o tratamento realizado de acordo com este protocolo de Estudo Clínico e tratamento convencional caso não haja eficácia no tratamento.

É importante que você esteja ciente de que a participação no presente Estudo de Pesquisa é completamente voluntária, e que você pode se recusar a participar ou se

retirar deste a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais você de outra forma teria direito. Caso você decida interromper sua participação no Estudo, você deve notificar o médico do Estudo. Em caso de retirada precoce do Estudo, você será contatado para avaliações de acompanhamento de segurança. A recusa ou retirada não influenciará seu tratamento médico.

Você compreende que os Responsáveis por este Estudo têm o direito de encerrar sua participação no mesmo, caso você não siga as instruções do Estudo ou se considerarem que esta interrupção seja de maior benefício para você, ou ainda se todo o Estudo for cancelado pelos Órgãos Responsáveis e/ou Fiscalizadores. Se, durante o Estudo, for descoberta qualquer nova informação significativa sobre os tratamentos disponíveis, você terá imediatamente acesso a essa informação e então poderá decidir continuar ou interromper sua participação.

Você será incentivado a fazer perguntas a qualquer momento durante o Estudo. Caso você apresente algum efeito colateral ou lesão relacionada ao Estudo ou tenha outras dúvidas sobre o Estudo, entre em Contato com Paula Tavares Colpas no telefone (19) 35217776 (Ambulatório de Dermatologia) ou pelo e-mail: paulacolpas@gmail.com ou Dra. Maria Beatriz Puzzi, no telefone (19) 3521-8988.

Se você tiver perguntas sobre seus direitos como paciente participante de um Estudo Clínico, você também poderá entrar em contato com uma terceira parte imparcial, Prof^a Dr^a Carmen Silvia Bertuzzo Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP, no telefone (19) 3521-8936.

5. Pagamentos e Despesas

Não há forma de remuneração monetária (ou outra) por sua participação. Entretanto, todo o material utilizado e suprimentos clínicos serão fornecidos a você gratuitamente. Os Órgãos Financiadores e Instituições Participantes cobrirão todos os custos relacionados a todos os procedimentos específicos requeridos pelo Estudo Clínico em questão.

6. Confidencialidade

Sua participação neste Estudo será mantida em caráter confidencial e seu nome não será revelado a ninguém que não o pessoal do Estudo. Entretanto, os órgãos Financiadores e Fiscalizadores Oficiais e Instituições Participantes, bem como os Comitês de Ética em Pesquisa FCM/UNICAMP, poderão revisar os registros do Estudo. Estas partes poderão ter acesso direto aos seus registros médicos originais e/ou dados para verificação dos procedimentos do Estudo Clínico, sem violação de sua confidencialidade, na extensão permitida pelas leis e regulamentações aplicáveis. Caso os resultados deste Estudo sejam publicados na literatura médica, você não será identificado nominalmente.

Seus dados poderão ser analisados em qualquer Instituição de Saúde ou país do mundo. Alguns testes estatísticos serão realizados com seus dados, juntamente com aqueles coletados de outros pacientes que entraram no Estudo. Os resultados podem ser enviados às Autoridades Sanitárias em todo o mundo, e os resultados também podem ser usados em relatórios do Estudo, em apresentações científicas ou publicações. Pode ser necessário rever os dados deste Estudo mais tarde, e pode ser preciso realizar testes extras em amostras coletadas durante o Estudo ou realizar análises estatísticas adicionais com os dados. Os resultados deste Estudo podem ser usados para futuras pesquisas médicas. Além disso, é possível que no futuro seja preciso coletar informações adicionais de seus arquivos médicos a fim de colocar os dados já coletados em contexto médico apropriado. A aprovação dos referidos Comitês de Ética será solicitada antes de coletar estas informações adicionais.

Se você desistir do Estudo a qualquer tempo, informações coletadas a seu respeito até este dado momento poderão ser utilizadas.

Ocasionalmente, em qualquer momento durante ou após o Estudo, a equipe Responsável pelo Estudo, os órgãos Financiadores e Fiscalizadores Oficiais e Instituições Participantes, terão acesso aos seus arquivos médicos para que estes possam confirmar que a informação coletada durante o Estudo é precisa. Nestas

circunstâncias, a sua identidade poderá ser aberta. Representantes dos Comitês de Ética também poderão ter acesso semelhante.

7. Declaração de Consentimento

Eu li as informações acima e compreendi o propósito do Estudo, bem como os benefícios e riscos potenciais de minha participação neste Estudo. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas sobre os procedimentos e sobre os materiais em estudo, e todas as minhas questões foram respondidas a contento.

Eu autorizo a equipe médica responsável por este Estudo a coletarem e processarem minhas informações, inclusive as informações sobre meu estado de saúde.

Autorizo que minhas informações sejam também processadas por órgãos Fiscalizadores Oficiais, Instituições Participantes e pelos Comitês de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, e entendo que minhas informações podem ser enviadas para outros países. Se eu decidir me retirar do Estudo, eu concordo que as informações coletadas a meu respeito até o momento de minha saída possam continuar sendo processadas.

Eu autorizo que minhas informações, incluindo informações sobre minha saúde e sobre meu grau de satisfação com o tratamento possam ser utilizadas para futuras pesquisas médicas.

Ao assinar este formulário, indico que consenti voluntariamente minha participação neste estudo. Eu recebi uma cópia deste consentimento informado.

Nome do Paciente: _____

_____ / ____ / ____

Assinatura do Paciente (escrita pelo paciente)

data

Nome do Representante Legal: _____

_____ / ____ / ____

Assinatura do Representante Legal (escrita pelo Representante) data

Eu, abaixo assinado, expliquei integralmente os detalhes relevantes deste adendo para o paciente acima indicado e/ou seu representante legal e forneci a este paciente uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e datado.

Nome do Médico: _____

(Investigador)

____/____/____

Assinatura do Médico

data

(Investigador)

9.4 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MODELO DE SUBSTITUTO DE PELE HUMANA CONSTITUÍDA DE CO-CULTURAS DE QUERATINÓCITOS E FIBROBLASTOS EM MATRIZES BIOLÓGICAS DE QUITOSANA COMPLEXADA COM POLISSACARÍDEOS ANIÔNICOS

Pesquisador: Paula Tavares Colpas

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais.);

Versão: 2

CAAE: 20838713.0.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 444.726

Data da Relatoria: 08/11/2013

Apresentação do Projeto:

A pesquisadora esclarece que no presente estudo é proposto o desenvolvimento de um modelo de substituto de pele humana, composto de co-culturas de queratinócitos e fibroblastos, utilizando-se matrizes biológicas constituídas de membranas quitosana e alginato ou de quitosana e xantana. Tais substitutos serão implantados em lesões de pacientes com queimaduras de 2º e 3º graus e pacientes com úlceras cutâneas de causa vascular ou devido a outras doenças sistêmicas, trazendo benefícios como a redução do tempo de tratamento, a proteção da lesão de ataque microbiano, além da potencial contribuição na melhoria da qualidade de vida do paciente. As culturas celulares serão realizadas a partir de fragmento de pele de aproximadamente 2,0 por 1,0 cm retirado do próprio paciente, através de biópsia cutânea sob anestesia local. Após cultura dos tipos celulares, os queratinócitos autólogos juntamente com a cola de fibrina autóloga ou industrializada serão aspergidos sobre o leito da úlcera, sob técnicas assépticas, em regime ambulatorial. O implante será protegido por uma matriz biológica a fim de evitar o contato direto do curativo com agentes que possam retirar o enxerto e possibilitar uma aceleração do processo de cicatrização. Participarão do estudo cinco pacientes exclusivamente deste centro. além da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887

UF: SP **Município:** CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 444.726

coleta de sangue, haverá registro de dados médicos e os procedimentos com os participantes compreendem o acompanhamento e observação por três meses, a contar da data da enxertia. No primeiro mês serão realizadas avaliações semanais e, após, avaliações mensais. Após o 3º mês os participantes passarão a ser acompanhados pela equipe médica da instituição, salvo em caso de eventual necessidade de acompanhamento por um período maior.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentar técnica reprodutível para obtenção de substituto de pele humana, constituída por co-culturas de queratinócitos e fibroblastos em matrizes biológicas constituídas de membranas de quitosana complexada com alginato ou xantana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme análise da pesquisadora, os pacientes poderão sentir dor no local da realização da biópsia, podendo ocorrer infecção cutânea local. Para minimizar esse desconforto a coleta será realizada sob anestesia local. Há o risco de não ocorrer a cicatrização de forma adequada. O benefício direto aos participantes compreende a cicatrização de feridas crônicas com melhora da dor e da qualidade de vida.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo destinado para a dissertação de mestrado acadêmico da pesquisadora, sob orientação de docente da instituição e com participação de outros pesquisadores da Unicamp. O estudo é relevante em termos de benefícios sociais e diretos aos participantes. Não haverá retenção de amostras em biorrepositório, conforme indicação da pesquisadora nas informações básicas sobre o estudo geradas pela PB.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente preenchida e assinada pela pesquisadora e pelo superintendente do HC/Unicamp, local onde os participantes serão recrutados. Além das informações básicas sobre o estudo, a pesquisadora anexou protocolo detalhado. O cronograma de estudo sugere que os procedimentos com os participantes já foram iniciados, o que contraria os princípios éticos da resolução 488/2012 (vide pendência abaixo). O orçamento indica gastos de R\$ 5.000,00 a serem arcados por recursos próprios. O TCLE é bastante detalhado e contempla os requisitos do sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

Lembramos que, se o TCLE tiver mais de uma página, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e o pesquisador responsável deverão rubricar todas as folhas desse

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 444.726

documento, apondo suas assinaturas na última página do referido termo (Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS; Resolução 466/2012 CNS/MS).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No parecer anterior foi apresentada a seguinte pendências: no cronograma do estudo há sobreposição entre o período de apreciação ética no CEP e os procedimentos com os sujeitos de pesquisa, o que contraria a resolução 466/2012 CNS/MS no artigo XI.2 letra "a". Solicita-se à pesquisadora esclarecer se os procedimentos já foram iniciados e adequar o cronograma do estudo.

Comentário: a pesquisadora apresentou modificação no cronograma de forma a iniciar os procedimentos com os sujeitos de pesquisa na segunda quinzena do mês de novembro. Pendência atendida.

Conclusão: aprovado após resposta a pendência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parcial e final, bem como encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

CAMPINAS, 04 de Novembro de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 444.726

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.5- Charing Cross Venous Ulcer Questionnaire (CCVUQ):

1- Eu tenho dor por causa da minha úlcera:

Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	3	4	5

2- Estar com uma úlcera na minha perna me impede em fazer o seguinte:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Reunir com parentes e amigos	1	2	3	4	5
b-) Viajar de férias	1	2	3	4	5
c-) Realizar meus passatempos (<i>hobbies</i>)	1	2	3	4	5
d-) Usar transporte público	1	2	3	4	5

3- Quanto verdadeiro ou falso são as seguintes informações considerando sua úlcera na perna:

	Definitivamente falso	Na maior parte falso	Não sei	Na maior parte verdadeiro	Definitivamente verdadeiro
a-) Minha úlcera geralmente faz com que eu realize minhas atividades de forma mais lenta	1	2	3	4	5
b-) Minha úlcera me deixa preocupado em meus relacionamentos	1	2	3	4	5

c-) A secreção da minha úlcera é um problema	1	2	3	4	5
d-) Eu gasto muito tempo pensando na minha úlcera	1	2	3	4	5
e-) Eu fico preocupado que minha úlcera nunca cure	1	2	3	4	5
f-) Eu estou cansado de gastar muito tempo tratando da minha úlcera	1	2	3	4	5

4- Eu sou triste por causa da aparência das minhas pernas devido a úlcera e/ou curativos:

Não, definitivamente não	De vez em quando	Frequentemente	Toda hora (sempre)
1	2	4	5

5- A úlcera da minha perna me limita de fazer as seguintes tarefas de casa:

	Nenhuma parte do tempo	Pouca parte do tempo	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
a-) Cozinhar	1	2	3	4	5
b-) Limpar	1	2	3	4	5
c-) Fazer compras	1	2	3	4	5
d-) Cuidar do quintal	1	2	3	4	5

6- Eu me sinto deprimido por causa da minha úlcera na perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
-------	------------------	----------------	--------

1	2	4	5
---	---	---	---

7- Com relação aos curativos da sua perna, indique o quanto é um problema para você:

	Nenhum problema	Pequeno problema	Moderado problema	Grande problema	Enorme problema
a-) O volume deles	1	2	3	4	5
b-) A aparência deles	1	2	3	4	5
c-) A influência nas roupas que eu uso	1	2	3	4	5

8- Eu tenho dificuldade de andar por causa da úlcera da minha perna:

Nunca	De vez em quando	Frequentemente	Sempre
1	2	4	5

9.6- Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida -SF-36

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você se classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rígorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3

g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminui a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo	1	2	3	4	5	6

você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?						
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode anima-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranqüilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
------------	------------------------	-----------------------	----------------------------	------------------------

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo obedecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5