

***CLÁUDIA MARIA BERNARDINO MAGRO ISSA***

***TRANSPLANTE DE MELANÓCITOS NO TRATAMENTO DO  
VITILIGO: UM PROGRESSO TERAPÊUTICO?***

***CAMPINAS***

***2003***

**CLÁUDIA MARIA BERNARDINO MAGRO ISSA**

**TRANSPLANTE DE MELANÓCITOS NO TRATAMENTO DO  
VITILIGO: UM PROGRESSO TERAPÊUTICO?**

*Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas, da  
Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do título de Doutor em Clínica Médica*

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARIA BEATRIZ PUZZI**

**CAMPINAS**

**2003**

*Este estudo foi financiado por um auxílio à pesquisa da FAPESP.*

*À minha família, Emílio, Daniel e Caio,  
pela paciência e compreensão.*

*Aos meus pais, Luiz e Guiomar, pelo amor.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Beatriz Puzzi, pelo apoio e pela dedicação à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, pela acolhida em seu laboratório e apoio à pesquisa.

À Jussara Rehder, que em todo momento esteve presente com seu otimismo.

Aos funcionários da Disciplina de Dermatologia, pela amizade e disponibilidade.

Aos meus pacientes, que compreenderam minha ausência no consultório.

À Renata Iahn e Isabel Iahn, sempre minhas amigas.

A Sérgio Cavalcante, por todo apoio e por sua amizade.

A Leonardo Rangel Alves, estatístico que muito me auxiliou.

A Clauser Lemos, pela ajuda nas finalizações deste trabalho.

Aos pacientes portadores de vitiligo, pela confiança que depositaram na pesquisa e no tratamento.

A todos que não foram citados nominalmente, e que contribuíram para este trabalho.

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine.*

*E ainda que eu tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.*

*E ainda que distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.*

*O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não se vangloria, não se ensoberbece, não se porta inconvenientemente, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal; não se regozija com a injustiça, mas se regozija com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O amor jamais acaba!*

*COR 13, 1-8*

	<b>PÁG.</b>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxvii</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	41
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	51
2.1. OBJETIVO GERAL.....	53
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	55
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	63
4.1. CASUÍSTICA.....	65
4.1.1. Critérios de inclusão.....	65
4.1.2. Critérios de exclusão.....	66
4.1.3. Critérios diagnósticos e laboratoriais.....	67
4.1.4. Aspectos éticos.....	67
4.1.5. Estudo da Casuística: (parâmetros para análise da casuística).....	67
4.1.6. Período de estudo.....	68
4.2. METODOLOGIA.....	68
4.2.1. Grupo de indivíduos com vitiligo.....	68
4.2.2. Técnicas cirúrgicas.....	71
4.2.3. Transporte do fragmento da área doadora.....	73
4.2.4. Técnicas laboratoriais de preparação das células para o transplante autólogo.....	74

4.2.5. Transporte das células.....	80
4.2.6. Técnicas de enxertia.....	80
4.2.7. Curativos.....	81
4.2.8. Padronização das medidas de repigmentação.....	81
4.2.9. Análise Estatística.....	82
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>83</b>
5.1. IDENTIFICAÇÃO E HISTÓRIA CLÍNICA.....	85
5.1.1. Idade.....	87
5.1.2. Sexo.....	87
5.1.3. Fototipo.....	87
5.1.4. Formas clínicas.....	87
5.1.5. Antecedentes pessoais.....	87
5.1.6. Antecedentes familiares.....	87
5.1.7. Tratamentos anteriores.....	88
5.1.8. Perfil dos exames laboratoriais.....	88
5.2. TÉCNICAS CIRÚRGICAS.....	88
5.2.1. Crioterapias.....	88
5.2.2. Áreas doadoras.....	88
5.2.3. Transporte do fragmento da área doadora.....	89
5.3. TÉCNICAS LABORATORIAIS DE PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA O TRANSPLANTE AUTÓLOGO.....	89
5.3.1. Preparação do concentrado celular de queratinócitos e melanócitos não em cultura.....	89
5.3.2. Cultura de melanócitos autólogos.....	91

5.4. ÁREAS RECEPTORAS.....	93
5.4.1. Área receptora de tratamento com apenas crioterapia (AC).....	93
5.4.2. Área receptora de tratamento com crioterapia mais meio de cultura (CM).....	95
5.4.3. Área receptora tratada com crioterapia mais transplante de queratinócitos e melanócitos não em cultura (QM).....	95
5.4.4. Área receptora tratada com crioterapia mais transplante de melanócitos autólogos em cultura (CC).....	98
5.5. MEDIDAS DE REPIGMENTAÇÃO.....	102
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	104
5.6.1. Comparação dentro de cada tratamento.....	104
5.6.2. Comparando os diferentes tratamentos nos tempos em relação à porcentagem de redução das áreas lesionadas.....	106
5.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO DE REPIGMENTAÇÃO.....	107
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>109</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>121</b>
<b>9. LISTA DE OBRAS CONSULTADAS.....</b>	<b>131</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>135</b>
ANEXO 1. PROTOCOLO DE INCLUSÃO.....	137
ANEXO 2. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....	138
ANEXO 3. INFORMAÇÃO SOBRE O PROJETO E TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO.....	139
ANEXO 4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	141

## ***LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS***

---

<b>AC</b>	Apenas crioterapia
<b>CM</b>	Crioterapia mais meio de cultura
<b>QM</b>	Transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura
<b>CC</b>	Transplante de melanócitos em cultura
<b>Cm</b>	centímetros
<b>Cm<sup>2</sup></b>	centímetros quadrados
<b>H</b>	horas
<b>T0</b>	início do tratamento
<b>T30</b>	30 dias após efetuar-se o tratamento
<b>T60</b>	60 dias após efetuar-se o tratamento
<b>T90</b>	90 dias após efetuar-se o tratamento
<b>8-MOP</b>	8- metoxipsoraleno
<b>PUVA</b>	psoraleno ultravioleta A
<b>MI</b>	mililitros
<b>mM</b>	milimolar
<b>µg</b>	micrograma
<b>UI</b>	unidades internacionais
<b>M</b>	masculino
<b>F</b>	feminino

## *LISTA DE FIGURAS*

---

	<i>PÁG.</i>
<b>Figura 1:</b> Intervalo de descongelamento.....	72
<b>Figura 2:</b> Intervalo de descongelamento.....	72
<b>Figura 3:</b> Bolha formada após 24 horas.....	72
<b>Figura 4:</b> Dessecamento natural da bolha após 10 dias.....	72
<b>Figura 5:</b> Obtenção da área doadora.....	73
<b>Figura 6:</b> Obtenção da área doadora.....	73
<b>Figura 7:</b> Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura.....	75
<b>Figura 8:</b> Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação.....	75
<b>Figura 9:</b> Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação.....	76
<b>Figura 10:</b> Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação.....	76
<b>Figura 11:</b> Esquema de transplante de melanócitos em cultura.....	78
<b>Figura 12:</b> Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação....	78
<b>Figura 13:</b> Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação....	79
<b>Figura 14:</b> Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação....	79
<b>Figura 15:</b> Bolha com conteúdo aspirado.....	80
<b>Figura 16:</b> Técnica de enxertia. Injetando conteúdo do transplante.....	81
<b>Figura 17:</b> Concentrado de melanócitos e queratinócitos não em cultura.....	91
<b>Figura 18:</b> Melanócitos em cultura.....	92

<b>Figura 19:</b>	Melanócitos em cultura.....	93
<b>Figura 20:</b>	Caso 11. Tratamento AC. T0.....	94
<b>Figura 21:</b>	Caso 11. Tratamento AC. T90.....	94
<b>Figura 22:</b>	Caso extra . Tratamento AC. T0.....	94
<b>Figura 23:</b>	Caso extra . Tratamento AC. T90.....	94
<b>Figura 24:</b>	Caso 4. Tratamento CM. T0.....	95
<b>Figura 25:</b>	Caso 4. Tratamento CM. T90.....	95
<b>Figura 26:</b>	Caso 1. Tratamento QM. T0.....	96
<b>Figura 27:</b>	Caso 1. Tratamento QM. T30.....	96
<b>Figura 28:</b>	Caso 1. Tratamento QM. T60.....	96
<b>Figura 29:</b>	Caso 1. Tratamento QM. T90.....	96
<b>Figura 30:</b>	Caso 1. Tratamento QM. Com 180 após tratamento.....	97
<b>Figura 31:</b>	Caso 12. Tratamento QM. T0.....	97
<b>Figura 32:</b>	Caso 12. Tratamento QM. T0. Bolha dessecando.....	97
<b>Figura 33:</b>	Caso 12. Tratamento QM. T60.....	98
<b>Figura 34:</b>	Caso 12. Tratamento QM. T90.....	98
<b>Figura 35:</b>	Caso 1. Tratamento CC. T0.....	99
<b>Figura 36:</b>	Caso 1, Tratamento CC. T30.....	99
<b>Figura 37:</b>	Caso 1. Tratamento CC. T60.....	99
<b>Figura 38:</b>	Caso 1. Tratamento CC. T90.....	99
<b>Figura 39:</b>	Caso 12. Tratamento CC. T0.....	100
<b>Figura 40:</b>	Caso 12, Tratamento CC. T60.....	100
<b>Figura 41:</b>	Caso 12. Tratamento CC. T60. Maior aumento.....	100

<b>Figura 42:</b>	Caso 12. Tratamento CC. T90.....	100
<b>Figura 43:</b>	Caso 11. Tratamento AC. T0.....	101
<b>Figura 44:</b>	Caso 11. Tratamento CC. T0).....	101
<b>Figura 45:</b>	Caso 11. Tratamento AC. T60.....	101
<b>Figura 46:</b>	Caso 11. Tratamento CC. T60.....	101
<b>Figura 47:</b>	Caso 11. Tratamento AC. T90.....	102
<b>Figura 48:</b>	Caso 11. Tratamento CC. T90.....	102
<b>Figura 49:</b>	Caso 12. Tratamento QM. T6.....	108
<b>Figura 50:</b>	Caso 12. Tratamento QM. Pigmentação de área contígua.....	108

## *LISTA DE GRÁFICOS*

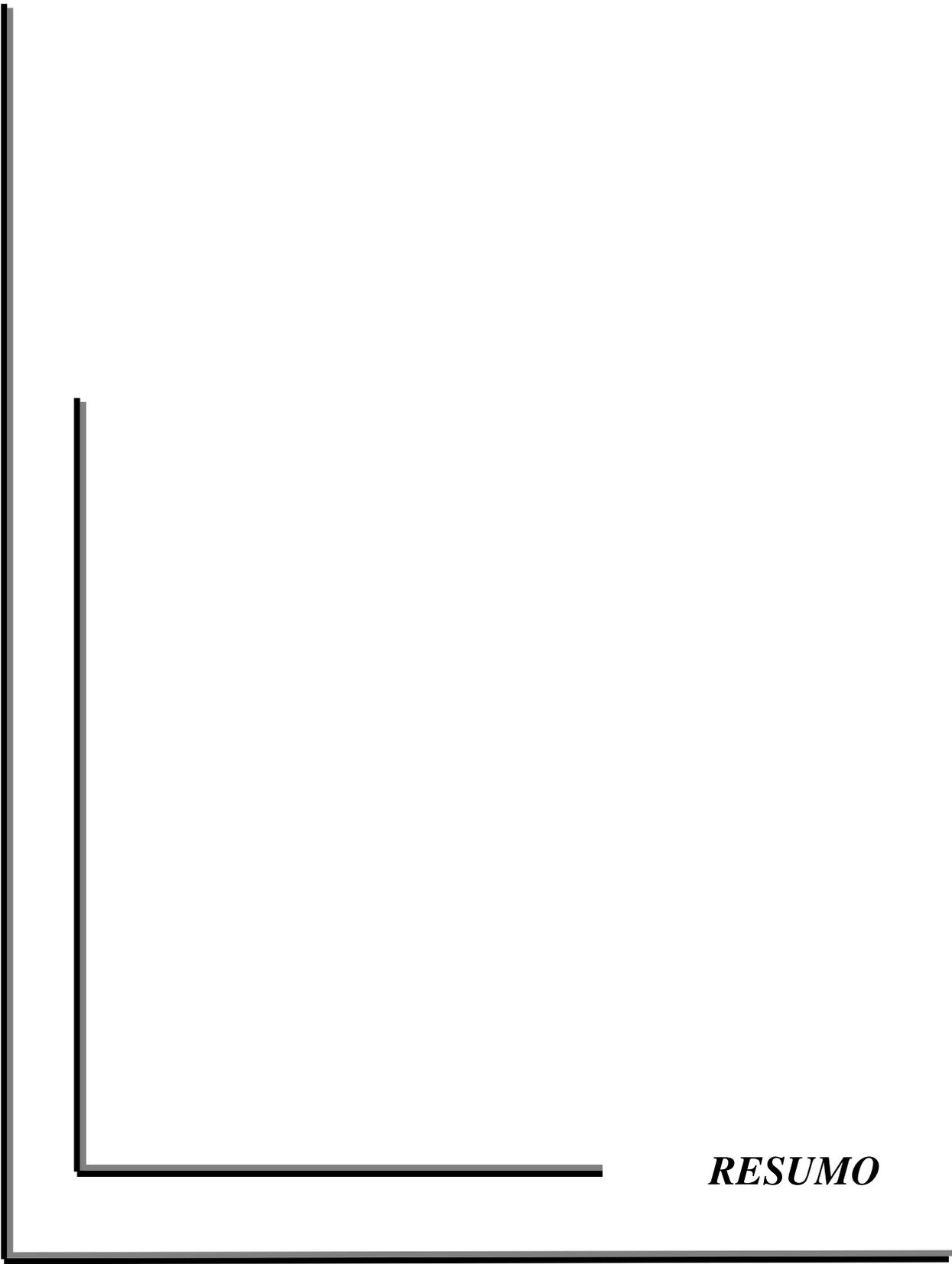
---

	<i>PÁG.</i>
<b>Gráfico 1:</b> Gráfico das áreas médias das lesões em cm <sup>2</sup> por tratamento ao longo do tempo em dias.....	105
<b>Gráfico 2:</b> Gráfico das médias das porcentagens de redução das áreas lesionadas em relação ao inicial em cada tempo por tratamento.....	106

## *LISTA DE QUADROS*

---

	<i>PÁG.</i>
<b>Quadro 1:</b> Descrição dos 12 casos.....	85
<b>Quadro 2:</b> Descrição dos 12 casos, em relação às áreas de tratamento.....	86
<b>Quadro 3:</b> Contagem de células envolvidas nos tratamentos.....	90
<b>Quadro 4:</b> Medidas das áreas crônicas em cm <sup>2</sup> .....	103



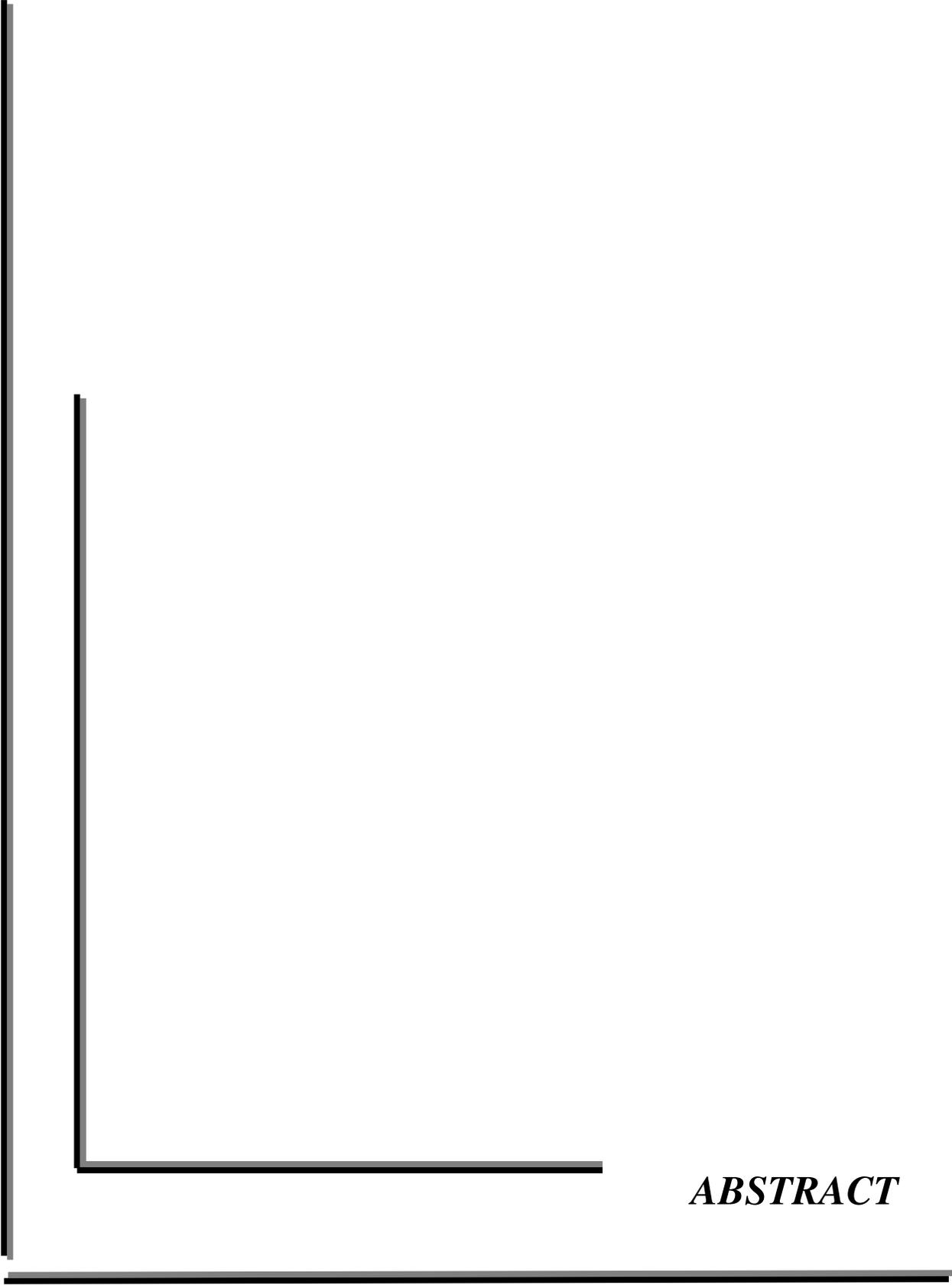
*RESUMO*

Resumo:

Foram apresentados os resultados de um estudo com 12 pacientes portadores de vitiligo estável, tratados com quatro diferentes técnicas cirúrgicas, aplicadas em cada paciente de forma concomitante; num total de 48 áreas tratadas e seguidas ao longo de 90 dias. Efetuaram-se os seguintes tratamentos: tratamento apenas com crioterapia (AC); crioterapia mais meio de cultura para melanócitos (CM); crioterapia mais transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura (QM); crioterapia mais transplante de melanócitos em cultura (CC). Acompanhou-se o aparecimento e evolução da repigmentação ao longo do tempo.

Não houve repigmentação em AC e CM. Houve repigmentação progressiva em QM e CC, ao longo dos 90 dias. O nível de redução da área acrômica em ambos foi significativa ao longo dos 90 dias. Não houve, porém, diferença significativa entre ambos.

Palavras-chave: Vitiligo, Tratamento, Nitrogênio líquido, Enxertia.

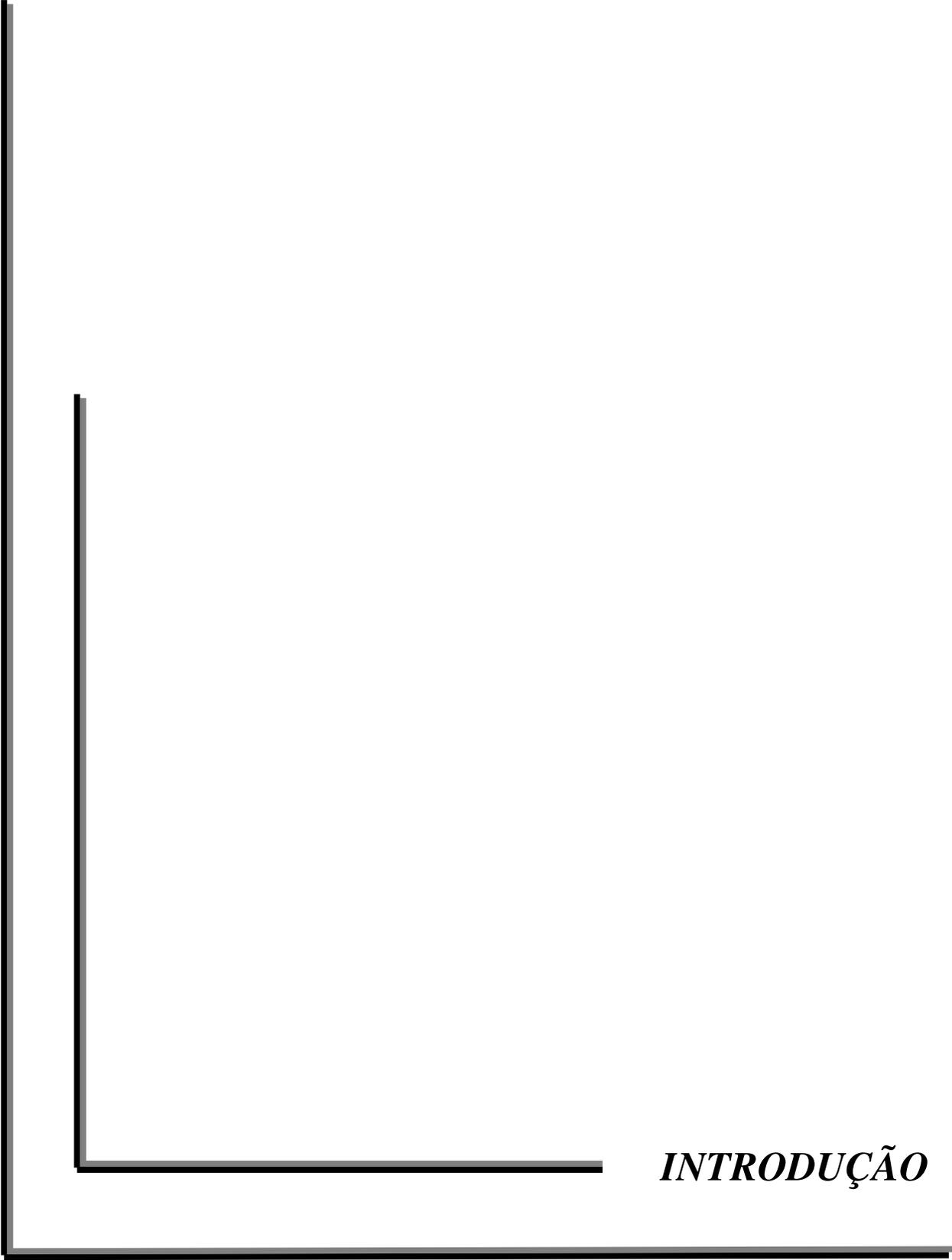


*ABSTRACT*

Abstract:

This study presents the results of a clinical trial study, conducted on 12 patients with stable vitiligo at the vitiligo outpatient clinic of The Clinical Hospital of the University of Campinas, between March 2000 and December 2001. This study was in accordance with the ethical standards of the Institutional Review Board. The patients were concomitantly treated with four different types of surgical techniques in 48 areas randomly chosen. There was a 90-day follow-up period. The following treatments were carried out: only cryotherapeutic treatment (OC); cryotherapy plus melanocyte culture medium (CM); cryotherapy plus transplantation of non-cultured melanocytes and keratinocytes (KM); and cryotherapy plus transplantation of cultured melanocytes (CC). The appearance of repigmentation and its evolution were followed all along the treatments. In the case of OC and CM no repigmentation occurred. Progressive repigmentation was observed over a period of 90 days in the case of KM and CC. In these two groups there was a significant reduction in the achromic areas during this time but no significant difference was found between the two treatments.

Keywords: Cryotherapy, Melanocyte culture, Melanocyte transplantation, Treatment, Vitiligo.



***INTRODUÇÃO***

O termo “vitiligo” parece ter sido utilizado pela primeira vez por Celsus em seu clássico “De Medicina” (30 AC). FITZPATRICK (1964) sugeriu que o termo tenha sido derivado da palavra latina *vitelius*, que significa “novilho”, dada a semelhança das máculas brancas da doença com as manchas brancas de um novilho malhado. LEIDER (1968) relatou que a palavra seria derivada de *vitium*, que significa falha ou mancha. A citação de SUTTON interpretou o termo da seguinte forma: “Vitiligo (*vitium*), uma espécie de lepra ou erupção cutânea, consistindo de máculas negras ou brancas chamadas de morfêia, alphas, melas, lence ou designando uma erupção cutânea em geral” (SUTTON, 1965).

Mesmo que o termo vitiligo tenha sido usado somente no primeiro século antes de Cristo, descrições da doença hoje conhecida como vitiligo são encontradas nos clássicos médicos do segundo milênio antes de Cristo. No papiro de EBERS (1500 AC) existem menções a duas doenças afetando a cor da pele, uma delas associada com edema e que deveria ser deixada sem tratamento, provavelmente a lepra, e uma outra em que ocorreria apenas alteração da cor, provavelmente o vitiligo. Na escritura antiga da Índia, ATHARVAVEDA (1500 AC), existe referência à doença *Kilas*, palavra que, em sânscrito, é derivada de *Kil*, significando “o branco que se espalha”. Outro termo usado para designar máculas acrômicas nos tratados médicos da Índia antiga é *Svitra*, que significa “difundir a cor branca” (NAIR, 1978).

Apesar de o vitiligo ser uma doença reconhecida desde a Antiguidade, foi confundida freqüentemente com a lepra. Mesmo Hipócrates (460 a 355 AC) não diferenciava essas duas moléstias e esta confusão foi perpetuada quando a Bíblia foi transcrita para o grego por ordem de Ptolomeu II (250 DC).

No Velho Testamento, capítulo XIII Leviticus, existe menção a várias doenças com máculas acrômicas, agrupadas na palavra hebraica *Zoraat*. Na versão grega da Bíblia, o termo *Zoraat* foi traduzido como “lepra” e, posteriormente, versado para o inglês. Essa confusão entre vitiligo e lepra no Velho Testamento contribuiu significativamente para o preconceito existente em relação às manchas brancas em geral.

Um similar estado de espírito verificou-se no livro sagrado do Budismo *Vinaya Pitak* (500 AC), em que homens e mulheres sofrendo de manchas brancas na pele não eram considerados elegíveis para o ordenamento (NAIR, 1978).

O vitiligo caracteriza-se por ser uma leucodermia adquirida (SAMPAIO e RIVITTI, 1998) de origem desconhecida, que afeta cerca de 1% da população mundial. Causa destruição de grânulos de melanina e de melanócitos na pele, mucosa, bulbo capilar e olhos. A diminuição dos melanócitos altera tanto a estrutura como a função desses órgãos, e resulta em ausência de pigmentação. Ocorre igualmente em ambos os sexos, em todas as raças, sendo em 50% dos casos em menores de 10 anos. Pode, porém, ter início em qualquer época desde a infância até a velhice (BACCI e ROJAS, 2000). É uma doença crônica, idiopática, acromiante, caracterizada por máculas brancas, marfínicas, de diferentes formas e tamanhos, que se estendem gradualmente (FERNANDES et al, 2001). Há ocorrência familiar entre 30% a 35% dos casos, (BACCI e ROJAS, 2000), com antecedentes em 21% nos familiares da primeira geração, indagando-se herança autossômica dominante de expressividade variável (ROOK, 1986).

Embora o vitiligo possa aparecer em qualquer parte do tegumento, as primeiras manifestações são, em geral, lesões hipo e acrômicas em mãos, pés, face e lábios. Em torno de 50% dos pacientes há anormalidades na pigmentação ocular e 5% desenvolvem diminuição da acuidade visual, visão noturna diminuída e fotofobia.

A doença é comumente progressiva. Repigmentação espontânea pode ocorrer, porém não usualmente. O envolvimento de áreas expostas, como face e mãos, bem como o aparecimento de lesões em genitália externa, causam estresse emocional importante, acarretando dificuldades psicossociais.

Sua etiopatogenia é desconhecida. Muitas hipóteses têm sido estudadas:

- Hipótese auto-imune - Esta hipótese tem sido aventada, devido à alta incidência de doenças auto-ímmunes associadas ao vitiligo, como doenças da tireóide, doença de Addison, hipoparatiroidismo, diabetes mellitus, miastenia grave, uveíte idiopáticas, etc. Presença de auto-anticorpos específicos não melanocitários tem sido demonstrada no soro do paciente com vitiligo. Alguns estudos têm demonstrado anticorpo contra antígeno da superfície do melanócito (NAUGHTON et al., 1983 a; NAUGHTON et al., 1983 b; NAUGHTON et al., 1986). Parece haver correlação entre a extensão da despigmentação e o nível de anticorpos contra melanócitos. Anticorpo

fixado a complemento já foi isolado em paciente com vitiligo associado a alopecia areata, como também associado a endocrinopatias (KOVACS, 1998).

- Hipótese neurogênica - O vitiligo, muitas vezes, segue distribuição dos dermatômos, o que fala a favor desta hipótese. A microscopia eletrônica já demonstrou anormalidades sutis em terminais nervosos, das áreas com vitiligo. Esta teoria iniciou-se há 40 anos atrás, por LERNER, 1959, baseado em casos descritos de pacientes com injúria neural e vitiligo; evidência clínica do vitiligo em dermatômos; e estudos demonstrando aumento da vasoconstrição e aumento da transpiração na área de vitiligo, implicando em aumento da atividade adrenérgica (KOVACS, 1998).
- Teoria autocitotóxica - Haveria destruição de melanócitos por substâncias liberadas a partir dos próprios melanócitos (um mecanismo de auto destruição deixaria de ser inibido) ou a partir de substâncias liberadas por células adjacentes (queratinócitos, células de Langerhans). Um outro mecanismo proposto seria a autotoxicidade que ocorreria através da inibição da *thioredoxin reductase*, presente na membrana do melanócito. Esta enzima, inibida por alta concentração de cálcio extracelular, causaria aumento de radicais superóxidos, que inibiriam a tirosinase (KOVACS, 1998).

A História Clínica da doença caracteriza-se por desenvolver-se em qualquer idade; porém mais de 50% dos casos iniciam-se antes de 20 anos de idade. Máculas hipocrômicas são, em geral, o primeiro sinal, e evoluem para manchas acrômicas, em qualquer parte do tegumento, inclusive fâneros. A periferia da lesão pode tornar-se hiperpigmentada. A principal queixa é em relação à estética, porque o paciente usualmente não apresenta nenhum sintoma. O impacto psicológico atribuído ao vitiligo é variável. Sentimentos de constrangimento e percepção de discriminação são fortemente relatados pelos pacientes, em especial, aqueles com lesões visíveis (KOVACS, 1998; SALZER e SCHALLREUTER, 1995).

Raramente há inflamação, irritação ou eritema precedendo a lesão. Eventos precipitantes como estresse emocional e/ou físico e traumas mecânicos podem estar associados. Deve-se estar atento a antecedentes familiares e antecedentes pessoais ocupacionais (indução química do vitiligo). Entre os fatores desencadeantes pode-se enumerar eventos específicos, tais como situações de perda, acidentes, crises, estresse emocional, doenças, cortes, abrasões, exposição ao sol. O fenômeno de Köebner pode estar presente nesta doença (fenômeno no qual há predisposição à formação de lesão a partir de traumas locais). A *köebnerização* pode ocorrer por escoriações ou lacerações em proeminências ósseas e áreas de atrito ou trauma (BACCI e ROJAS, 2000).

De acordo com KOVACS, 1998; ROOK, 1986; SAMPAIO e RIVITTI, 1998, o vitiligo pode ser dividido, clinicamente, em:

- **Vitiligo generalizado:** é a forma mais comum de apresentação da doença, com acometimento bilateral, simétrico, atingindo face (especialmente áreas periorificiais), pescoço, dorso, superfícies extensoras de proeminências ósseas de membros superiores e inferiores, axilas, orifícios, superfícies mucosas.
- **Vitiligo acrofacial:** apresenta áreas de despigmentação em superfícies acrais (extremidades dos dedos e dorso das mãos e pés) e áreas periorificiais faciais, como olhos, nariz, orelhas e boca.
- **Vitiligo focal:** mácula isolada em determinada localização, não seguindo dermatômos.
- **Vitiligo segmentar:** ocorre em um dermatomo; de distribuição assimétrica. Por seu aparecimento precoce, curso recalcitrante e baixa associação com doenças autoimunes, é considerado um tipo especial de vitiligo.
- **Vitiligo universal:** implica em perda do pigmento em toda a superfície corporal, progressivamente.

O diagnóstico, em geral, não apresenta dificuldades. É importante o exame pela lâmpada de Wood, que, tornando as lesões mais evidentes, permite excluir outras afecções hipocrômicas.

A diagnose diferencial inclui: albinismo; nevo acrômico; acromias de contato por derivados da hidroquinona, usados em indústrias de borracha, em particular, o monobenziléter de hidroquinona; pitiríase alba; hipocromia residual da pitiríase versicolor e da psoríase; hanseníase indeterminada.

A evolução e prognóstico são imprevisíveis. Não há nenhum critério clínico ou laboratorial que os orientem. A repigmentação espontânea não é rara e inicia-se com ilhotas pontuadas nos óstios foliculares, no interior da mancha, ou de modo centrípeto a partir das bordas.

Histologicamente, há diminuição de melanina na epiderme, evoluindo para diminuição progressiva de melanócitos até a ausência deles. Estudos histoquímicos demonstram diminuição e até ausência de células DOPA (+) na camada basal da epiderme.

Estudos de microscopia eletrônica confirmam a diminuição de melanócitos, às vezes com substituição por células de Langerhans. Na periferia da lesão hipocrômica encontram-se anormalidades nos queratinócitos, além de degeneração de melanócitos. Pode haver discreto infiltrado inflamatório dermo-epidérmico à custa de linfócitos e histiócitos (LEVER, 1990).

Em porcentagem variável, o vitiligo pode estar associado a diferentes manifestações, tais como: endocrinopatias como hipo e hipertireoidismo, doença de Addison, diabetes mellitus; alopecia areata; anemia perniciosa; uveítes e irites idiopáticas (em cerca de sete por cento dos doentes com vitiligo ocorre uma uveíte subclínica e eventualmente pode haver lesão na mácula); miastenia grave; síndrome de Vogt-Koyanagi, onde há associação de manchas vitiliginosas, alterações oculares e do sistema nervoso.

O tratamento do vitiligo tem sido insatisfatório. As opções de repigmentação da pele vêm se desenvolvendo vagarosamente e com limitações. Em tratamentos clínicos é comum o uso de psoralenos por via oral combinado com exposição solar ou exposição artificial ultravioleta (PUVA). Um dos mais ativos é o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), produzido sinteticamente. Da raiz de uma planta comum no Brasil Central, “mamica cadela”, *Brosimum guadchudii*, é extraída uma seiva, que contém psoralênicos naturais muito ativos, comercializada como Viticromin®, em solução ou comprimidos. O uso de psoralenos tópicos deve ser criterioso para evitar queimaduras. Alguns pacientes

respondem bem à administração tópica de corticosteróides nas manchas. Há relatos de boa melhora clínica com o uso de aplicação tópica de pseudocatalase com cálcio e curta exposição ao ultravioleta B. Há relatos também, na literatura, de tratamento tópico com Melagenina®, extrato hidroalcoólico de placenta humana, identificado inicialmente por Drs. Miyares Cao e Gonzalez, em Havana, Cuba. Outro avanço recente no tratamento reporta-se ao uso tópico de calcipotriol e 5- fluorouracil, ainda sem resultados definidos (KOVACS, 1998; JIMBOW, 1998; GOLDSTEIN, 1992 a; GOLDSTEIN, 1992 b).

Recentemente, tem-se discutido o tratamento cirúrgico para os casos avançados em que o melanócito já está ausente ou inativo. Diferentes propostas cirúrgicas com auto-enxerto de melanócitos têm sido relatadas (GAUTHIER e SURLEVE-BAZEILLE, 1992; SELMANOWITZ et al., 1977; BONAFE et al., 1983; ONGENAE et al., 2001). Estas técnicas buscam transplantar epiderme normal autóloga para áreas acometidas com a doença. Mini-enxertos utilizando *punchs* na área doadora, como também enxertos obtidos a partir de sucção de bolhas epidérmicas ou enxertos laminares retirados com dermatomo têm sido utilizados desde 1975, porém mais amplamente utilizados a partir de 1983. MACHADO (1985), no Brasil, utilizou técnicas de enxertia com implantes através de *punchs*, porém com alguns inconvenientes como: sobrelevação dos enxertos e falta de fusão dos halos pigmentares, particularmente nas lesões de pequenas dimensões. Em áreas expostas, como a face, por motivos estéticos, a sobrelevação dos enxertos torna-se pouco aceita.

Sharad Mutalik descreveu bons resultados, na Índia, com transplante de enxerto a partir de sucção de bolha epidérmica (MUTALIK, 1993). Falabella utilizou técnicas com obtenção de lâminas epidérmicas da área doadora (FALABELLA et al., 1995 a; FALABELLA et al., 1995 b). OLSSON e JUHLIN (1995) cultivaram melanócitos a partir de área doadora retirada em *shaving* e implantaram as células em área receptora preparada com dermoabrasão, com sucesso.

Tem-se discutido as dificuldades quanto a hipo ou hiperpigmentação, na área doadora, provocada pelo *shaving*. Outra dificuldade encontrada tem sido a diminuição da adesão celular, com morte de células, na área receptora, por excesso de exsudação de fluido, provocado pela dermoabrasão em áreas maiores de 300cm<sup>2</sup>.

LERNER et al. (1987) foram os precursores nos estudos de transplante de melanócitos puros. Cultivaram melanócitos e injetaram, em suspensão, dentro de bolha provocada por sucção em área receptora de pacientes portadores de piebaldismo.

GAUTHIER e SURLEVE-BAZEILLE (1992) apresentaram método simplificado de tratamento, com transplante de melanócitos autólogos, não em cultura, utilizando nas áreas receptoras bolhas provocadas por nitrogênio líquido. O tratamento com melanócitos não em cultura simplificaria a técnica.

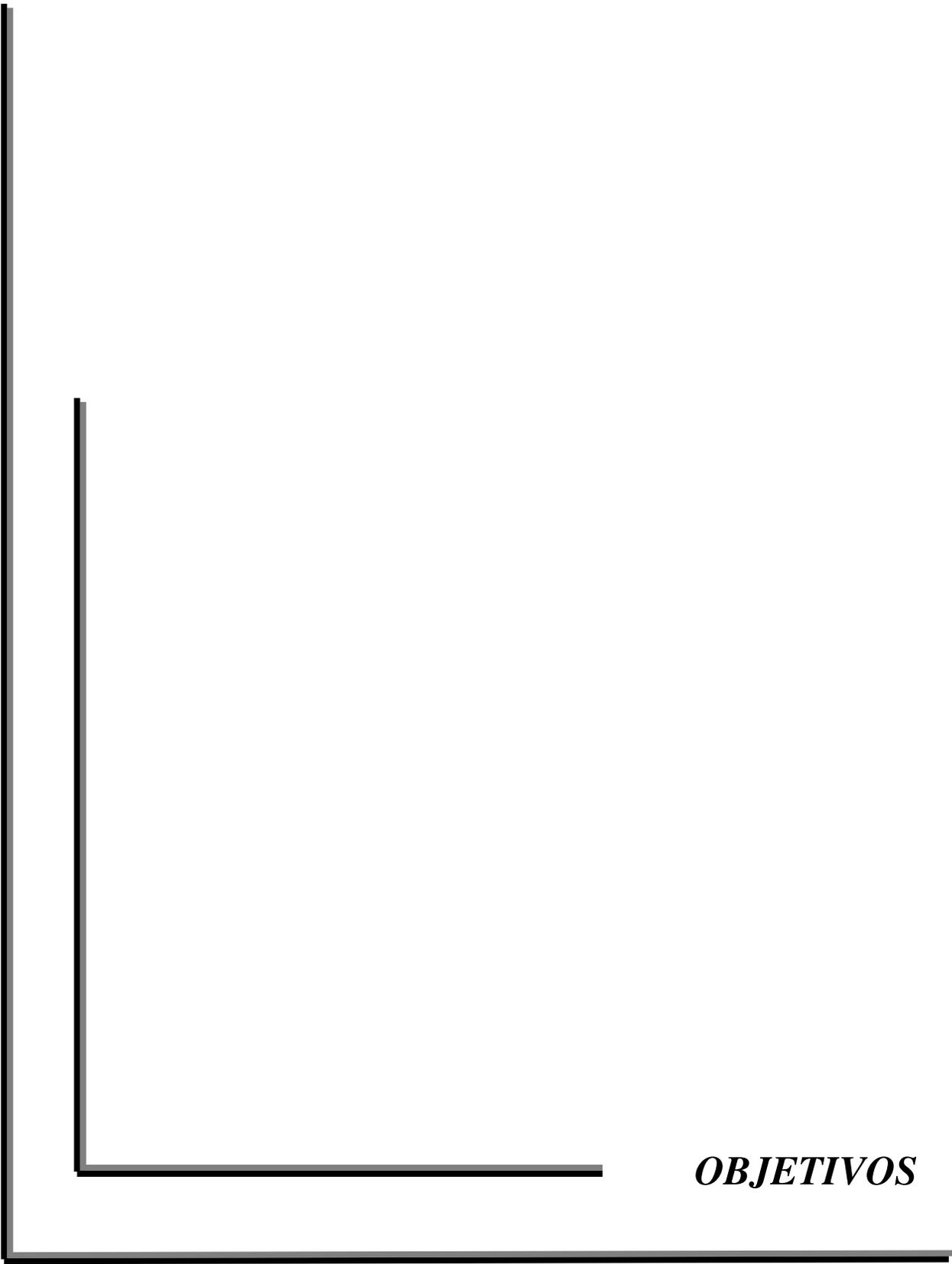
Tem-se observado, na revisão da literatura, diferentes estudos com a preocupação de apresentar técnicas variadas de transplante de melanócitos em casos de vitiligo nos quais esta célula não se encontra mais viável. Nestes casos, estímulos com tratamentos clínicos não surtiriam efeito, por não existirem melanócitos responsivos na área. Portanto tem sido consenso que se utilize tais técnicas somente em vitiligo resistente ao tratamento convencional. Outro cuidado é que se utilize o tratamento cirúrgico somente no vitiligo estável, ou seja, em doença não progressiva, sendo que manteve-se a mesma preocupação neste estudo.

Mundialmente, tem-se preocupado com a apresentação das novas técnicas de transplante, deixando-se em menor ênfase as padronizações das mesmas, bem como padronizações da escolha e preparação das áreas receptoras e doadoras. Observou-se ainda, falta de estudos em relação a grupos - controles e estudos comparando diferentes técnicas.

Neste estudo compararam-se quatro diferentes técnicas cirúrgicas, no mesmo indivíduo, com o objetivo de avaliar a eficácia de cada uma delas. Desta maneira, acompanhou-se o aparecimento e evolução da repigmentação ao longo do tempo, nas diferentes técnicas utilizadas, estabelecendo-se estudos comparativos entre elas.

É importante destacar que usou-se em uma das técnicas abordadas o transplante de melanócitos em cultura, injetando os melanócitos em bolha previamente provocada com nitrogênio líquido na área acromica, sendo este procedimento não utilizado em técnicas já descritas na literatura. A utilização da bolha na área receptora estaria fazendo a função de um frasco de cultura *in vivo*.

A padronização da cultura de melanócitos *in vitro* teve que ser estudada e adequada de acordo com as condições brasileiras (clima, temperatura, umidade do ar, flora bacteriana e fúngica, etc). Houve a preocupação em se estabelecer padrões nas técnicas, na escolha e preparação das áreas receptoras e doadoras, no número de células utilizadas nos tratamentos, para posterior utilização em estudos futuros.



***OBJETIVOS***

## 2.1. OBJETIVO GERAL

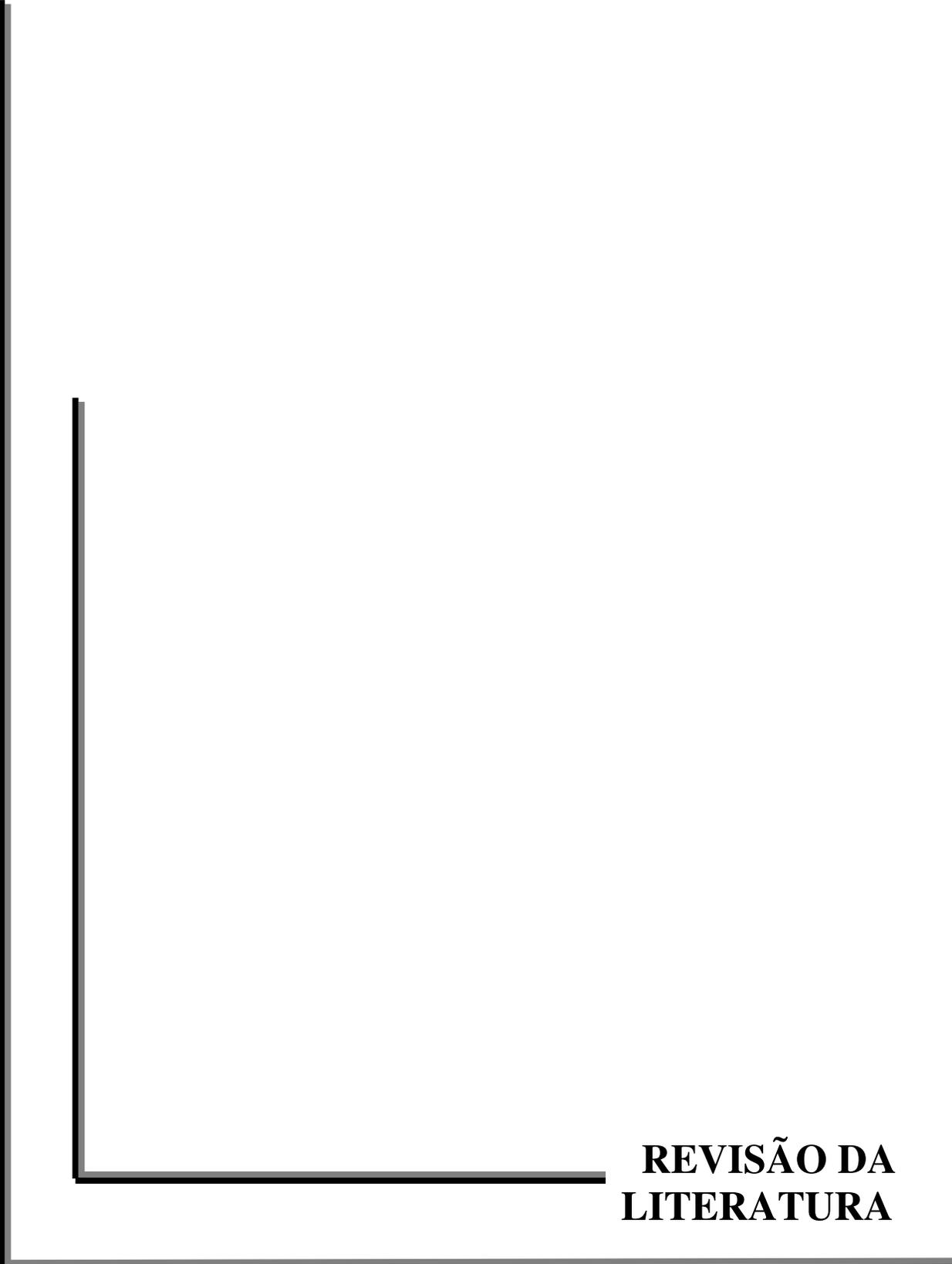
Apresentar e testar modelo de transplante autólogo de melanócitos em cultura para tratamento de áreas acrômicas de doentes de vitiligo, utilizando técnica de enxertia das células em bolha provocada por nitrogênio líquido na área receptora. Avaliar a importância e vantagem deste tratamento. Comparar este tratamento ao transplante autólogo de melanócitos e queratinócitos não em cultura.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Responder às seguintes questões:

- As células cultivadas *in vitro* têm viabilidade normal quanto à pigmentação, ou seja, os grânulos de melanina são ativos para pigmentar a área acrômica?
- Os melanócitos cultivados implantam-se adequadamente na área receptora (área acrômica)?
- O estímulo com nitrogênio líquido na área receptora (apenas crioterapia) agiria no processo de repigmentação? O meio de cultura utilizado (crioterapia mais meio de cultura) estimularia a repigmentação? Ambos (crioterapia e/ou meio de cultura) estariam funcionando como controles/placebos ou teriam alguma função como tratamento?

Em relação aos tratamentos propostos com transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura e transplante de melanócitos em cultura, existiriam diferenças significativas e/ou vantagens entre ambos? Qual o melhor tratamento?



**REVISÃO DA  
LITERATURA**

O tratamento do vitiligo vem demonstrando avanços nas últimas décadas. As terapêuticas já consagradas incluem tratamentos tópicos e orais com psoralenos e radiação ultravioleta (PUVA), uso de corticoterapia tópica e/ou sistêmica, modalidades cosméticas. Mais recentemente, uso tópico de melagenina, catalase, minoxidil e calcipotriol tem sido descritos. Nos últimos quinze anos, desenvolvimento de novas técnicas vem apontando para alternativas de tratamentos cirúrgicos para casos resistentes aos tratamentos convencionais.

A primeira forma de PUVA terapia para vitiligo foi no século XIII, quando egípcios usaram um extrato extraído da planta *Ammi majus linnaeus*, cujo costume de uso manteve-se até meados do século XX, como estudado por EL MOFTY, 1948; FAHMY e ABUSHADY, 1947 a; FAHMY e ABUSHADY, 1947 b.

A literatura indiana descreve em seus primórdios dois tratamentos tópicos chamados *asikni* e *shyama*, que significam “aquele que bronzeia a pele”, descritos por SINGH et al. 1974, em artigo de revisão.

FAHMY e ABUSHADY ( 1947) foram os primeiros a isolar dois componentes ativos da planta *Ammi majus linnaeus*, de onde se originaram os derivados psoralenos.

FOWLKS (1959) estudou a química dos psoralenos. Estudos mais recentes continuaram investigando a eficácia do uso oral ou tópico dos psoralenos: AFRICK e FULTON, 1971; PARRISH et al., 1976; KAO e YU, 1992, compararam o efeito do 8-metoxi-psoraleno (8-MOP) em melanócitos *in vivo* e *in vitro*.

MONTGOMERY (1904) foi o primeiro a usar terapia com luz, na forma de luz “Finsen”.

Uso de fototerapia combinada com psoralenos de uso oral e/ou tópico foi inicialmente descrito por EL MOFTY, 1948. Este tratamento combinado consagrou-se a partir de meados de 1960 com estudos de BECKER, 1967; BUCK et al., 1960; PATHAK, 1962.

O tratamento de vitiligo com corticosteróides foi iniciado por TSUKADA, 1959. FARAH et al., 1967, relataram sucesso no tratamento combinado com psoraleno oral e esteróide tópico. KOGA, 1977, usando vários esteróides tópicos, relatou que face e

pescoço responderam melhor ao tratamento que o restante do corpo; também que vitiligo generalizado respondeu ao tratamento, enquanto vitiligo segmentar, não. Corticosteróide de uso sistêmico e intralesional, bem como uso de ACTH (hormônio corticotrópico supra-renal), foram descritos na literatura com bons resultados na repigmentação, por HERNANDEZ-PEREZ, 1979; GOKHALE e GOKHALE, 1976; VASISTHA e SINGH, 1979; GOLDSTEIN et al., 1992 b; porém com uso muito limitado, pelos efeitos colaterais adversos.

A administração de fenilalanina na dose de 50 a 200 mg/kg, aproximadamente 45 minutos antes da irradiação com UVA, três vezes por semana, foi descrito como eficaz por CORMANE et al., 1983; CORMANE et al., 1985; SCHULPIS et al., 1989. Contra-indicações desta terapia incluem: fenilcetonúria, toxicidade hepática e renal.

Khellin (*furanochromone*), previamente utilizado em angina pectoris e asma, tem sido usado para o tratamento do vitiligo, associado à irradiação UVA (KUVA). ORTEL et al., 1988, descreveu melhora de 70% em seus estudos.

PASRICHA e KHERA, 1994, descreveram o uso sistêmico de levamisole como eficaz no controle da atividade da doença, podendo ser utilizado em associações com tópicos.

A modalidade cosmética de camuflagem, com uso de produtos cosméticos tipo maquiagens, tem sido utilizada em áreas inestéticas como face e colo, como relatado por GOLDESTEIN et al., 1992 a.

SCHALLREUTER et al., 1995, reportaram sucesso no tratamento do vitiligo com a aplicação tópica de pseudocatalase e cálcio, seguida de curta exposição à radiação UVB, com repigmentação após dois a quatro meses de tratamento.

Em recente estudo, SRINIVAS et al., 1990, demonstraram aceleração da repigmentação com uso tópico de minoxidil associado a PUVA, quando comparado ao grupo - controle apenas com PUVA.

Melagenina®, extrato hidro-alcoólico a 50% de placenta humana, foi pioneiramente utilizado em Cuba e, mais recentemente, em outros países, porém não aprovado no Canadá e EUA. O mecanismo de ação proposto é a estimulação da síntese de

melanina, através do estímulo na proliferação dos melanócitos. Utilizado três vezes ao dia, topicamente, associado à exposição à luz natural. Os resultados são controversos na literatura, como descritos por GOLDESTEIN et al., 1992 b; NORDLUNG e HALDER,1990; AZAMBUJA, 1992.

TSUJI e HAMADA, 1983 e MONK, 1985, estudaram uso tópico de fluorouracil, demonstrando repigmentação.

PARSAD et al., 1998, sugeriram tratamento com combinação de PUVA sol e calcipotriol tópico.

Terapêuticas despigmentantes utilizando monobenzil éter de hidroquinona têm sido usadas para casos com vitiligo atingindo mais de 60% de superfície corpórea, como estudos relatados por JIMBOW et al., 1974; MOSHER et al, 1977.

Modalidades cirúrgicas de tratamento em casos de vitiligo estabilizado, não progressivo, vêm sendo estudados mais recentemente. A possibilidade de tratamento de pacientes de vitiligo com enxerto de pele pigmentada em área despigmentada foi primeiramente considerada por SPENCER e TOLMACH, 1952.

Nas décadas de 60 e 70 iniciaram-se trabalhos estudando enxertos de epiderme a partir de bolhas provocadas por sucção em áreas doadoras para serem enxertadas em áreas receptoras acrómicas, como estudado por KHASTALA, 1968. Várias técnicas derivaram destes primordiais estudos, variando forma de obtenção da bolha da área doadora com sucção ou resfriamento por nitrogênio líquido e preparação da área receptora com bolha ou dermoabrasão. KOGA, 1988, estudou casos com enxertos epidérmicos usando tetos de bolhas produzidas por sucção. SUVANPRAKORN et al., 1985, estudaram diferentes formas de obtenção do enxerto, discutindo a suscetibilidade dos melanócitos à exposição prolongada de resfriamento pelo nitrogênio líquido. SUGA et al., 1996, demonstraram o sucesso do tratamento com enxerto epidérmico associado a PUVA.

Técnicas com enxertos de pequenos fragmentos de pele total de área doadora começaram a ser estudados a partir da descrição da técnica de BEHL, 1964, Thiersch-enxerto, delgado fragmento de pele total extraído com um dermatomo. Técnica modificada de Thiersch foi utilizada no vitiligo estável, por BOSE, 1996.

Minienxertos autólogos com espessura total da pele (*full-thickness*), a partir de pequenas e múltiplas biópsias com *punch*(1,2mm) foram descritos inicialmente por FALABELLA, 1983; BEHL, 1985; sendo que os autores preconizaram esta técnica para vitiligo segmentar e localizado, pela dificuldade de obtenção da área doadora. FALABELLA, 1984; FALABELLA, 1988, usou técnica de minienxerto autólogo com espessura parcial (*split-thickness*), com biópsia com *shave* ou dermatomo.

No Brasil, técnicas de enxertia também vêm sendo estudadas (MACHADO, 2000).

OLSSON e JUHLIN, 1997, estudando enxertos epidérmicos em vitiligo e piebaldismo, apresentaram revisão de técnicas cirúrgicas.

Recentes avanços em cultura de células epidérmicas humanas, em especial células pigmentares, tem possibilitado estudos com transplante de melanócitos autólogos em áreas despigmentadas. RHEINWALD e GREEN, 1975, foram os primeiros a descrever enxertos de cultura de células epidérmicas. LERNER et al., 1987 foram os primeiros a descrever transplante de melanócitos autólogos puros.

ANDREASSI et al., 1998; FALABELLA et al., 1989 e FALABELLA et al., 1992, descreveram uma técnica de enxerto de cultura epidérmica, onde a epiderme, após separação enzimática da derme, era mantida em meio de cultura em gaze, sob forma de lâmina, para então ser transplantada. Complicações deste procedimento apontam para pequena expansão das células e aderência da lâmina à gaze.

GAUTHIER e SURLEVE-BAZEILLE, 1992, descreveram técnica de transplante de suspensão de queratinócitos e melanócitos não em cultura para o tratamento de lesões despigmentadas. Esta suspensão, preparada em laboratório, era enxertada na área receptora a partir de formação de bolha com nitrogênio líquido. Os autores definem esta técnica como mais simplificada e salientam a importância de não se separar o melanócito do queratinócito.

O transplante de melanócitos autólogos em cultura vêm sendo estudado nos últimos anos e representa um avanço no tratamento do vitiligo. Autores têm trabalhado no sentido de melhorar a técnica e sua aplicação. OLSSON e JUHLIN, 1992; OLSSON e JUHLIN, 1993; OLSSON e JUHLIN, 1995, estudaram transplante de melanócitos em

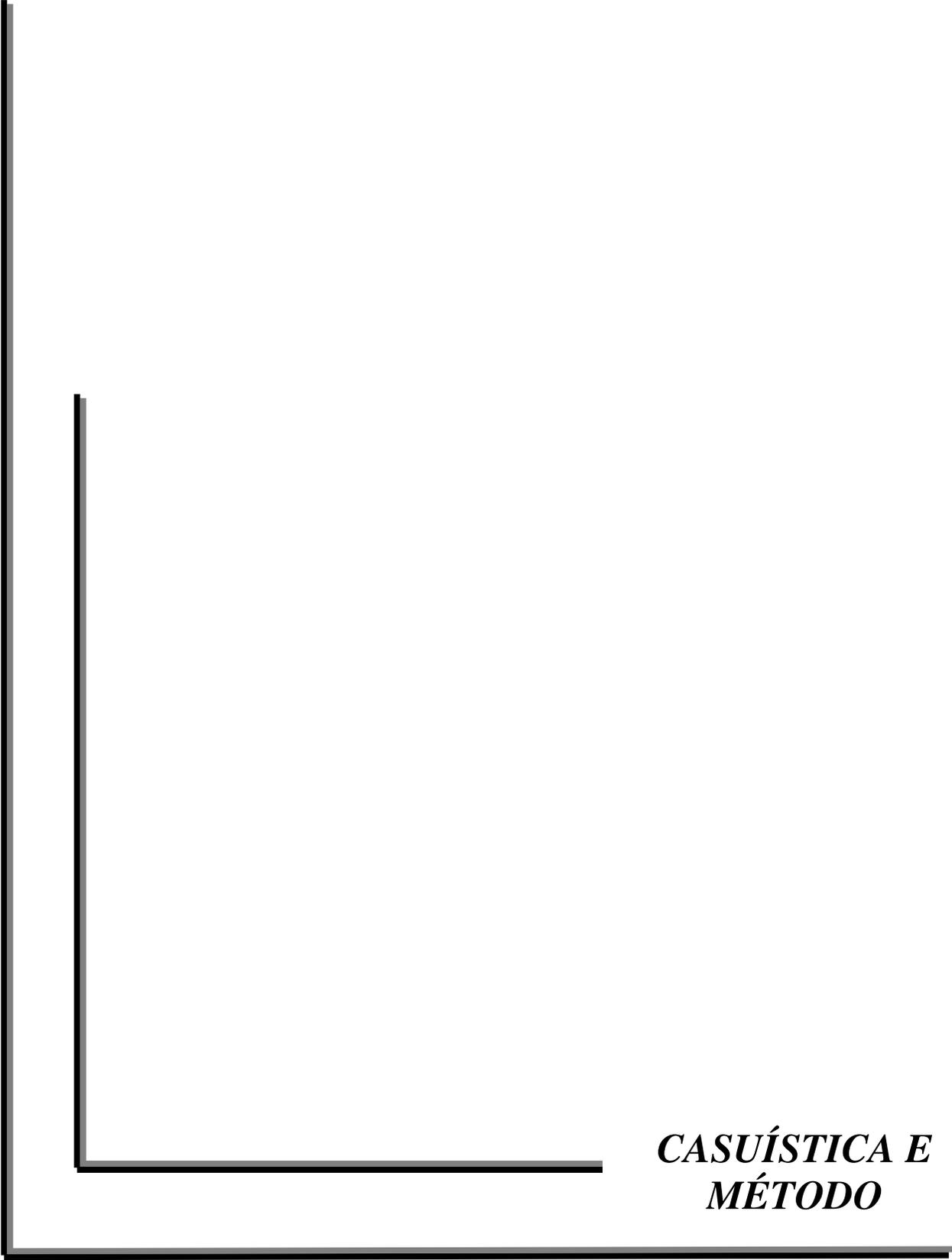
vitiligo. Trabalhos sucessivos vêm mostrando pesquisas nesta área (LÖNTZ et al., 1994; KAUFMANN et al., 1998). NJOO et al., 1998, realizaram um trabalho de revisão sistemática de métodos de transplante autólogo no tratamento de vitiligo.

ONGENAE et al., 1996, estudaram comportamento de melanócitos não em cultura e melanócitos em cultura no tratamento de doenças acrômicas.

ONGENAE et al., 2001, expuseram artigo de revisão, mostrando a evolução e questionamentos sobre suspensão celular autóloga no tratamento de doenças acrômicas.

VAN-GEEL et al., 2001, mostraram evolução do tratamento com técnicas cirúrgicas para o vitiligo, com artigo de revisão. Neste demonstrou-se preferência por dermoabrasão na preparação da área acrômica receptora. Porém, estudos na Itália, GUERRA et al., 2000, têm demonstrado preferência por preparo da área receptora com diadermo-cirurgia (*Timedsurgery*), técnica que envolve eletrocirurgia, na qual haveria remoção íntegra da epiderme, sem afetar papilas dérmicas.

Tem-se observado, na revisão literária, que a questão do tratamento com transplante autólogo de melanócitos é ainda bastante recente, o que representa necessidade de estudos e pesquisas futuras.



***CASUÍSTICA E  
MÉTODOS***

## **4.1. CASUÍSTICA**

A casuística deste trabalho foi constituída de 12 indivíduos, adultos, sendo todos doentes de vitiligo simétrico e generalizado, com a doença estabilizada a mais de um ano, submetidos a transplante de auto-enxerto de células epidérmicas.

Os doentes foram avaliados e seguidos no Serviço de Dermatologia, Ambulatório de Vitiligo do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, no período de janeiro de 2000 a março de 2002.

### **4.1.1. Critérios de inclusão**

Foram selecionados doentes, adultos, com confirmação clínica diagnosticada de vitiligo simétrico, forma generalizada e estabilizada há mais de um ano (com inatividade da doença há no mínimo um ano). Preferencialmente indivíduos com máculas maiores ou iguais a um centímetro quadrado de área, distribuídas simetricamente em membros (braços, antebraços, coxas, pernas) e tronco.

Incluíram-se doentes já tratados previamente com os tratamentos clínicos tradicionais, vias oral e tópico, e que não obtiveram sucesso na resposta terapêutica; considerados casos refratários aos tratamentos convencionais.

No ato da seleção deveriam estar há, no mínimo, três meses sem uso de qualquer medicação com ação na pigmentação.

Os pacientes foram classificados de acordo com o fototipo, segundo FITZPATRICK (1974): Quando expostos ao sol das doze horas por 15 a 30 minutos obtêm as seguintes respostas no que diz respeito a eritema e bronzeamento:

TIPO I: Sempre queima, nunca se bronzeia.

TIPO II: Usualmente queima, bronzeia com dificuldade.

TIPO III: Queimadura discreta eventual, bronzeamento médio.

TIPO IV: Raramente queima, bronzeamento fácil.

TIPO V: Raramente queima, bronzeamento intenso, pele não exposta clara.

TIPO VI: Nunca queima, pele não exposta negra.

Foram incluídos apenas indivíduos saudáveis, sem nenhum outro comprometimento orgânico-metabólico.

Os exames laboratoriais foram normais.

Todos os doentes que preencheram os critérios de inclusão foram submetidos a um protocolo (ANEXO 1), visando esclarecer o perfil desta casuística (idade, sexo, forma clínica, exames laboratoriais, tempo de evolução da doença, tipo de pele, localização das manchas e escolha das áreas receptoras, antecedentes pessoais e familiares, tratamentos anteriores).

#### **4.1.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídos idosos, crianças, gestantes, bem como qualquer adulto com outra doença associada ou usando qualquer tipo de medicamento.

Foram excluídos indivíduos cuja doença não estava controlada há, no mínimo, um ano, ou que estivessem sob qualquer tipo de tratamento para o vitiligo, via oral e/ou tópica, no momento da seleção.

Excluídas as formas de vitiligo acrofacial, focal, segmentar e universal.

Não foram realizados procedimentos em face.

Excluídos os indivíduos com qualquer alteração nos exames laboratoriais.

Excluídos os pacientes com antecedentes pessoais de fenômeno de Köebner, cicatrizes hipertróficas e quelóides.

A exclusão estendeu-se aos doentes que, por qualquer motivo, não referendaram o termo de consentimento pós-informado (ANEXO 3).

O perfil psicológico foi levado em consideração para a exclusão, segundo a orientação de profissionais da área.

#### **4.1.3. Critérios diagnósticos e laboratoriais**

A diagnose de vitiligo estabeleceu-se pelos dados clínicos semiológicos, consagrados pela literatura mundial.

O vitiligo generalizado foi caracterizado por manchas acrômicas, de distribuição simétrica, eutróficas, obedecendo padrão espelhado, sensibilidade preservada, confirmadas ao exame clínico com lâmpada de Wood.

Os exames laboratoriais foram padronizados para todos os doentes e verificados no momento da seleção.

Avaliaram-se os seguintes exames: Hemograma, VHS (Velocidade de Hemossedimentação), Glicemia de jejum, TSH (Hormônio tireo-estimulante), T4 Livre (Tiroxina livre), Perfil de enzimas hepáticas, Exame de Urina tipo I, Protoparasitológico de fezes. A opção por este protocolo de exames deveu-se às doenças mais comumente associadas.

#### **4.1.4. Aspectos éticos**

O projeto deste estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (ANEXO 2).

Todos os indivíduos do estudo receberam ficha de informação sobre o projeto (ANEXO 3) e referendaram termo de consentimento pós-informado (ANEXO 3).

#### **4.1.5. Estudo da casuística: (parâmetros para análise da casuística)**

O protocolo aplicado a este estudo visou montar um perfil dos indivíduos selecionados (ANEXO 1). Foram fornecidos ao sistema de análise os dados de identificação, história clínica, exame clínico dermatológico e exames laboratoriais.

- **Idade**
- **Sexo**
- **Fototipo**

Em relação ao fototipo, usou-se a classificação consagrada por FITZPATRICK (1974).

- **Formas clínicas**
- **Antecedentes pessoais**

Visando observar interações de outras doenças com o vitiligo.

- **Antecedentes familiares**

Visando observar interações familiares.

- **Tratamentos anteriores**

#### **4.1.6. Período de estudo**

O presente estudo foi conduzido de janeiro de 2000 a março de 2002.

## **4.2. METODOLOGIA**

Visando apresentar uma nova proposta terapêutica cirúrgica para o tratamento do vitiligo, nos casos refratários às condutas usuais, e no intuito de avaliar a viabilidade de uma técnica, trabalhou-se concomitantemente com o grupo de indivíduos portadores de vitiligo, a técnica cirúrgica a ser implantada, o trabalho laboratorial de cultura de células.

### **4.2.1. Grupo de indivíduos com vitiligo**

Para cada um dos 12 pacientes selecionados foram escolhidas, aleatoriamente, quatro áreas distintas de manchas acrómicas para o tratamento, ou seja, o mesmo indivíduo teve quatro áreas de tratamentos diferentes, porém concomitantes (áreas receptoras). Portanto, somou-se um total de 48 áreas tratadas em 12 indivíduos.

A escolha priorizou manchas acrómicas em membros superiores e inferiores, tronco e abdome, com área superior a um centímetro quadrado; iniciando a seleção em membro superior direito proximal, seguindo em direção ao cotovelo e continuando em

membro superior esquerdo proximal em direção ao cotovelo; seguindo o mesmo padrão para membros inferiores e tronco. Procurou-se selecionar as manchas em membros distintos, para evitar possível interferência entre os tratamentos. Após a definição das quatro áreas a serem utilizadas, as mesmas foram sorteadas (aleatorização) para receber tratamentos: AC, CM, QM e CC (como descritos a seguir).

Todos os indivíduos receberam roxitromicina, via oral, profilática, na dose de 300 mg/ dia, durante 5 dias.

O estudo de diferentes tratamentos no mesmo indivíduo visou posterior comparação e análise estatística correta. Estas áreas foram divididas em:

- **Tratamento com crioterapia (AC)**

Nas 12 áreas acrômicas selecionadas para este grupo foram realizadas apenas aplicação de nitrogênio líquido. Utilizado aparelho Cry Ac do Brasil. Padronizou-se tempo de congelamento de 15 a 30 segundos e descongelamento variando entre 30 e 60 segundos. Esse procedimento possibilitou aparecimento de bolha, a qual foi mantida sem nenhum outro procedimento, com curativo oclusivo embebido em meio de cultura estéril, como a padronização das demais áreas, até dessecação natural da mesma.

- **Tratamento com crioterapia mais meio de cultura (CM)**

Nas 12 áreas acrômicas deste grupo, efetuou-se crioterapia, utilizando aparelho Cry Ac do Brasil, com padronização do tempo de congelamento e descongelamento como citado anteriormente.

Após 24 horas, com a formação da bolha, tensa e com conteúdo citrino, injetou-se no interior da mesma 0,2 ml de meio de cultura para melanócitos, após aspiração do mesmo volume de conteúdo da bolha. O meio de cultura utilizado foi MMK2 (SIGMA-USA).

Não foi enxertado qualquer tipo de célula neste tratamento; apenas o meio de cultura, e mantido curativo oclusivo com meio de cultura estéril, até dessecação natural da bolha.

- **Tratamento com crioterapia mais transplante de queratinócitos e melanócitos autólogos não em cultura (Q M)**

Nas 12 áreas deste grupo de tratamento, realizou-se procedimento crioterápico com aplicação de nitrogênio líquido na mesma padronização dos dois grupos descritos anteriormente. Durante as 24 horas de formação da bolha, trabalhou-se com a obtenção das células para a enxertia.

As células foram extraídas de um fragmento de pele do próprio paciente, processadas e separadas em laboratório, em ambiente asséptico e favorável. Tais padronizações da área doadora e das técnicas laboratoriais serão descritas em itens seguintes.

Depois de separadas e processadas, as células, agrupadas num concentrado de melanócitos e queratinócitos, foram ressuspensas em meio de cultura para melanócitos MMK2 (SIGMA), num volume de 0,2 ml, e enxertadas dentro da bolha formada, com seu conteúdo previamente aspirado.

Portanto, neste local de tratamento, o indivíduo recebeu transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura, suspensos em meio de cultura MMK2 (Sigma).

Após a enxertia, a bolha foi mantida em curativo com gaze embebida em meio de cultura estéril, com troca em dias alternados, até seu dessecamento natural.

- **Tratamento com crioterapia mais transplante de melanócitos autólogos em cultura (CC)**

Este grupo iniciou o tratamento com a exérese de fragmento da área doadora. Uma só área doadora forneceu células para o grupo de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura (QM), como também para o presente grupo de melanócitos em cultura (CC).

Este fragmento foi retirado cirurgicamente, em fuso, e encaminhado em condições assépticas, ao laboratório de cultura de células.

As células foram processadas e colocadas em cultura numa média de 15 a 21 dias.

Quando as células cultivadas apresentaram-se suficientemente diferenciadas e proliferadas, *in vitro*, efetuou-se, na área receptora, o tratamento crioterápico já descrito.

Após 24 horas, com a formação da bolha, o conteúdo foi parcialmente aspirado e injetado concentrado de melanócitos autólogos em cultura, suspensos em meio de cultura MMK2 (SIGMA), num volume de 0,2 ml.

A bolha que recebeu esta concentração de células foi mantida sob curativo oclusivo asséptico, como já descrito, até dessecação natural da mesma.

#### **4.2.2. Técnicas cirúrgicas**

- **A crioterapia**

Crioterapia realizada com aparelho de nitrogênio líquido Cry Ac do Brasil. A aplicação de nitrogênio líquido teve por função provocar, nas manchas acromicas selecionadas para tratamento, bolhas tensas, de conteúdo citrino.

Estas bolhas tiveram importância fundamental para manter as células enxertadas viáveis. A bolha estaria funcionando como um frasco de cultura *in vivo*.

Tentou-se padronizar um tempo de congelamento e um tempo de descongelamento satisfatórios, de tal forma que a bolha durasse por volta de 10 dias. Se sua vida média fosse muito curta, não haveria tempo hábil suficiente para que as células sedimentassem no assoalho da bolha e conseguissem implantação adequada. Se sua vida média durasse mais que 10 dias, o risco de contaminação e formação de crostas na dessecação aumentaria.

A padronização dos tempos de congelamento e descongelamento também visou à formação de bolha superficial, para que fosse evitado o risco de formação de cicatriz.

A dessecação da bolha deveria ser tênue e natural, sem a interferência do investigador.

Desta forma os tempos estabelecidos foram:

Tempo de congelamento: variando de 15 a 30 segundos.

Tempo de descongelamento: variando de 30 a 60 segundos.

A ilustração que se segue mostra a área receptora, recebendo crioterapia com nitrogênio líquido, no intervalo de tempo de descongelamento.



**Figura 1:** Intervalo de descongelamento



**Figura 2:** Intervalo de descongelamento

A ilustração seguinte mostra a bolha formada e seu dessecamento natural.



**Figura 3:** Bolha formada após 24 horas



**Figura 4:** Dessecamento natural da bolha após 10 dias

- **A cirurgia da área doadora**

Padronizou-se retirada de fuso de pele sã pigmentada de região inguino-crural, medindo 2 cm de comprimento e 1 cm de largura.

Optou-se por esta localização por ser área coberta e por motivos estéticos.

Foi realizada exérese em condições assépticas, com excisão e sutura simples e clivagem dermo-hipodérmica, segundo demonstrado na figura a seguir.



**Figura 5:** Obtenção da área doadora



**Figura 6:** Obtenção da área doadora

A assepsia do local cirúrgico da área doadora foi realizada com água e sabão, seguidos de soro fisiológico. Não se utilizou nenhum outro antisséptico, para evitar-se resíduos no fragmento, o que poderia interferir no processamento das células.

Utilizou-se anestésico local Xylocaína® sem vasoconstritor.

Sutura realizada com ponto simples em fio de nylon 6.0.

Curativo pós-operatório mantido com limpeza local com água e sabão, duas vezes ao dia. Realizada ablação dos pontos no oitavo dia.

#### **4.2.3. Transporte do fragmento da área doadora**

Em condições assépticas, a 0°C, em frasco com meio de cultura MMK2 (SIGMA) ou Solução de Hanks estéril.

Tempo de transporte: máximo de 15 minutos.

#### **4.2.4. Técnicas laboratoriais de preparação das células para o transplante autólogo**

- **Preparação do concentrado celular para o transplante autólogo de melanócitos e queratinócitos não em cultura**

No laboratório, o fragmento da área doadora foi processado em fluxo laminar, de tal forma a ser eliminado o tecido adiposo subjacente, deixando a lâmina dermo-epidérmica embebida em solução de Hanks. Esta lâmina foi fragmentada em pequenos quadrados de 0,2 x 0,2 cm.

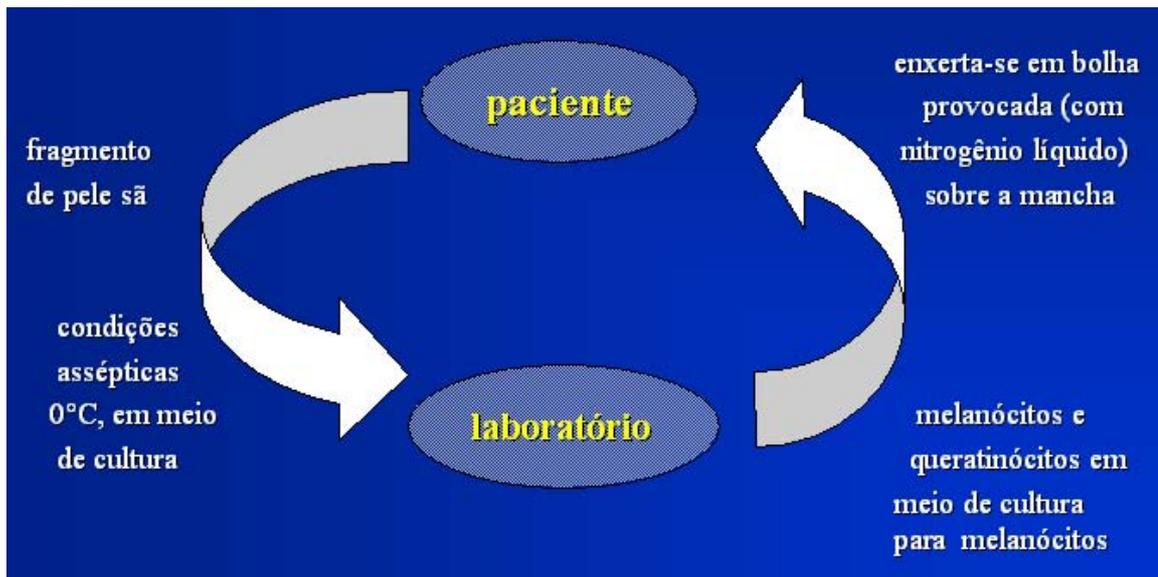
Em placa de Petri, os pequenos fragmentos foram submergidos em solução de Trypsina 2,5%+ EDTA (GIBCO), 10ml, para iniciar-se o processo de tripsinização. O material foi mantido em incubadora de CO<sub>2</sub>, a 37°C por três horas.

Após a digestão enzimática, a neutralização da trypsinase foi feita com 10ml correspondentes de Soro Fetal Bovino (SIGMA). Esta etapa permitiu a desagregação das células epidérmicas da derme.

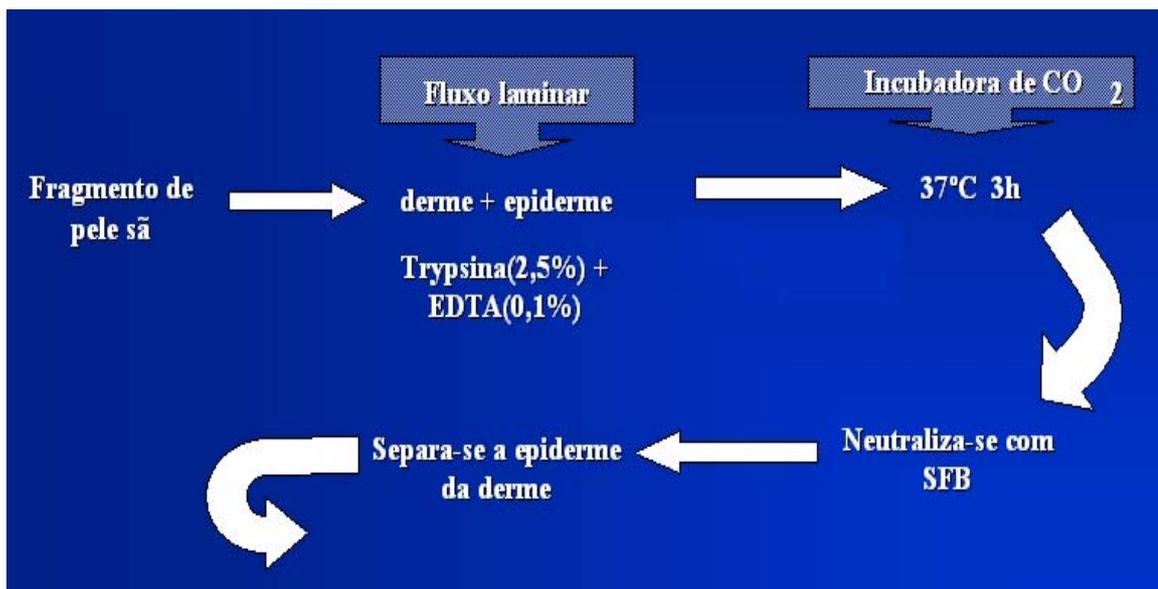
Desprezada a derme, todo o material restante, constituído de células epidérmicas, fibroblastos, restos celulares, foi solubilizado em solução de Hanks e filtrado em filtro de 40 µm de porosidade (FALCON). Desta forma, foi obtido um concentrado de solução de Hanks e células epidérmicas.

Este concentrado foi centrifugado por 10 minutos, a 1200 rpm, a 4°C .

Após este processo, desprezando o sobrenadante, obteve-se um concentrado celular com melanócitos e queratinócitos não em cultura. Este concentrado celular, ressuspenso em 0,2 ml de meio de cultura para melanócitos MMK2 (SIGMA), foi, finalmente, conduzido para ser injetado na bolha. Este processo está ilustrado nas figuras que se seguem:



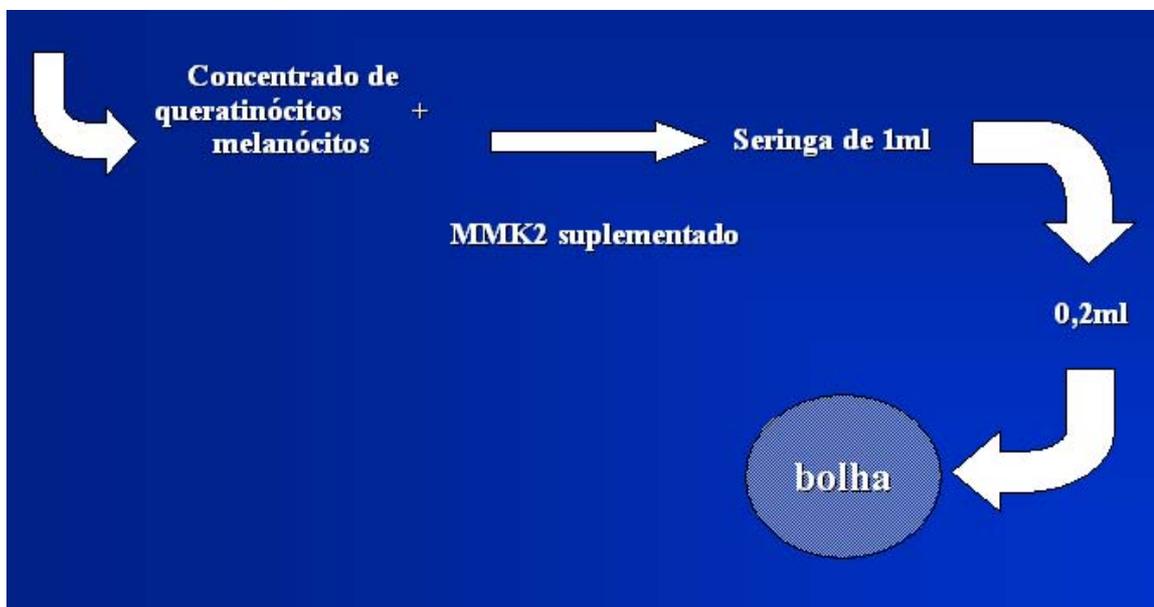
**Figura 7:** Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura



**Figura 8:** Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação



**Figura 9:** Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação



**Figura10:** Esquema de transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura/continuação

- **Preparação das células em laboratório para o transplante autólogo de melanócitos em cultura**

O fragmento da área doadora foi, inicialmente, processado em laboratório, da mesma forma que no grupo anteriormente descrito.

A tripsinização, seguida por neutralização, filtração e centrifugação, levou à obtenção do concentrado celular suspenso em solução de Hanks. Após o sobrenadante ter sido aspirado e desprezado, o concentrado de células no fundo do frasco, constituído por melanócitos e queratinócitos, foi ressuspenso em 1 ml de meio de cultura para melanócitos MMK2 (SIGMA) e levado para o frasco de cultura.

O meio de cultura MMK2 (SIGMA) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA), 1 UI/ml de penicilina (Penicillin - SIGMA), 0,001 mg/ml de estreptomicina (Streptomycin - SIGMA) e 0,02 mM/ml de L- glutamina (L-Glutamine - GIBCO), para receber as células para cultura.

A quantidade de frascos a serem utilizados, bem como o tamanho deles e a quantidade de meio de cultura em cada frasco, foram determinados pela contagem celular, feita com corante *blue trypan*, minutos após a ressuspensão do concentrado celular no meio.

A cultura foi mantida em condições assépticas, em incubadora de CO<sub>2</sub>, a 37°C, com troca do meio em dias alternados.

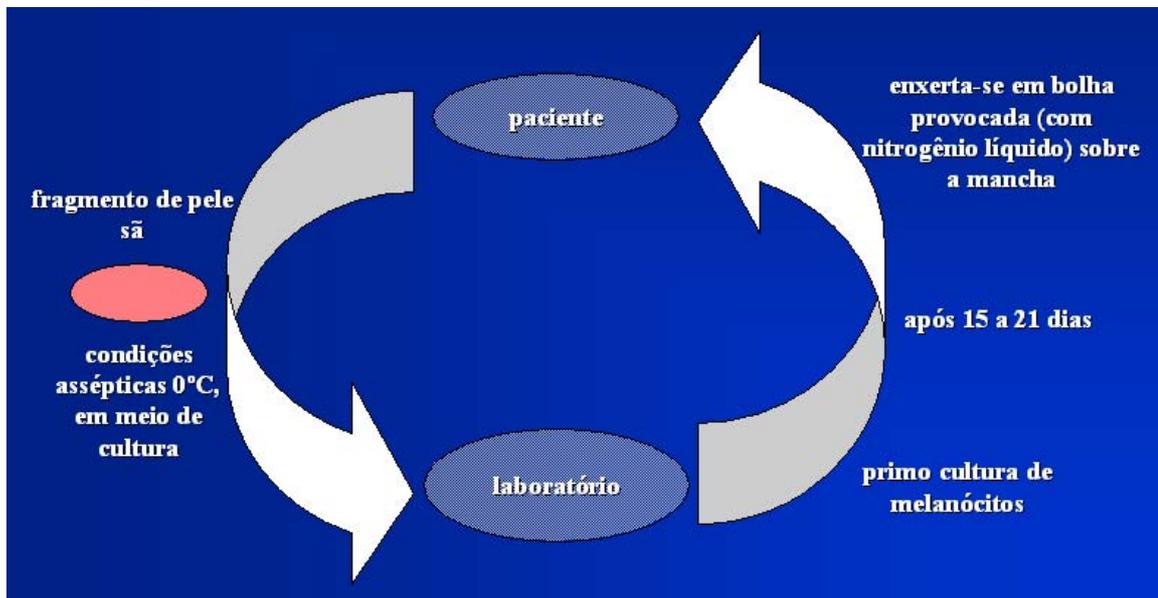
O tempo necessário para proliferação e diferenciação celular, até preenchimento do frasco, variou de 15 a 21 dias.

A diferenciação do crescimento da cultura para a linhagem melanocitária determinou-se devido ao meio de cultura e seus suplementos específicos.

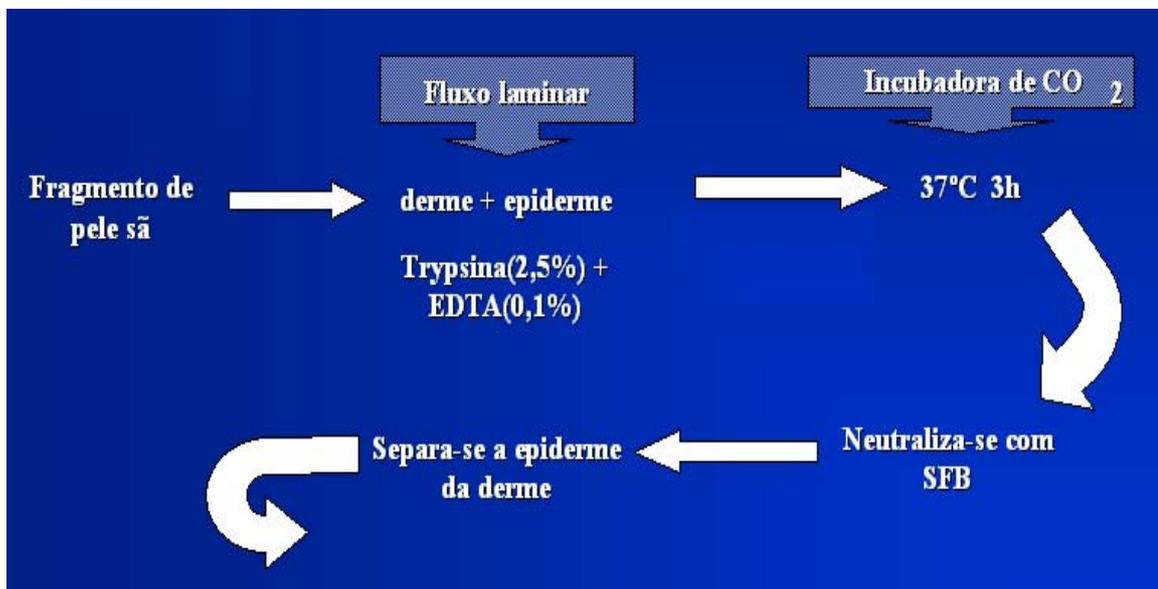
Após uma média de 15 a 21 dias, efetuou-se novo processo de tripsinização, em solução de Trypsina a 0,25% + EDTA (GIBCO), seguido de neutralização e centrifugação. Este novo concentrado celular constituiu-se de melanócitos puros oriundos de primo cultura.

Este concentrado de melanócitos cultivados, ressuspenso em meio de cultura, está pronto para ser injetado na bolha.

As figuras seguintes ilustram o processo descrito acima.



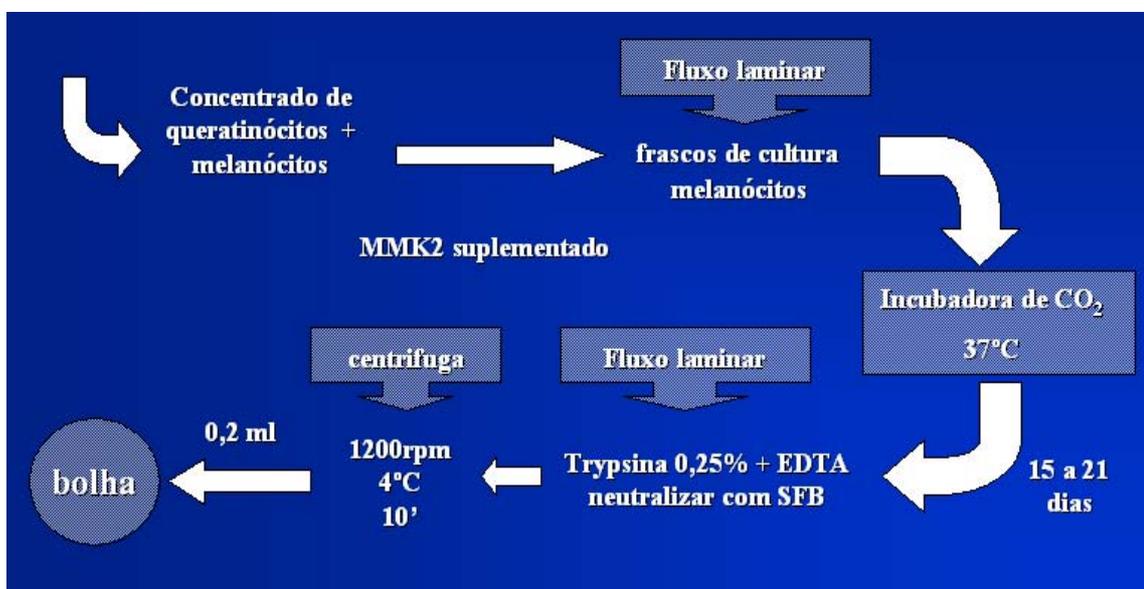
**Figura 11:** Esquema de transplante de melanócitos em cultura



**Figura 12:** Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação



**Figura 13:** Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação



**Figura 14:** Esquema de transplante de melanócitos em cultura/continuação

#### 4.2.5. Transporte das células

As células preparadas no laboratório foram acondicionadas em seringa de 1 ml de insulina, diluídas em 0,2 ml de meio de cultura para melanócitos MMK2 (SIGMA), para enxertia em cada bolha. O transporte foi realizado em condições assépticas, a 0°C, até o paciente. Tempo máximo de transporte: 15 minutos.

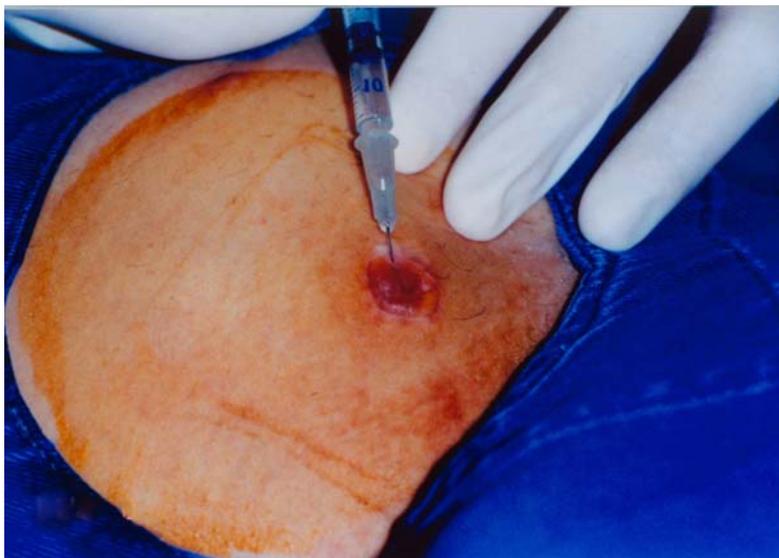
#### 4.2.6. Técnicas de enxertia

Após assepsia no local da bolha pré-formada, com soro fisiológico 0,9%, seu conteúdo foi aspirado parcialmente, com agulha 13x3 30 G ½ e seringa de 1 ml, e desprezado. Pelo mesmo orifício, injetou-se a diluição contendo células mais meio, como descrito no item anterior, com o mesmo padrão de agulha e seringa. O orifício foi ocluído com *Micropore®* estéril. Manteve-se em curativo estéril oclusivo com gaze embebida em meio de cultura para melanócitos. Paciente foi mantido em repouso absoluto por 5 horas, para adequada sedimentação das células no assoalho da bolha.

As figuras a seguir ilustram este procedimento.



**Figura 15:** Bolha com conteúdo aspirado



**Figura 16:** Técnica de enxertia. Injetando conteúdo do transplante

#### **4.2.7. Curativos**

Foram mantidos curativos oclusivos com gazes estéreis, embebidas em meio de cultura para melanócitos MMK2 (SIGMA), com trocas em dias alternados, até dessecação natural da bolha. Após o dessecação total da bolha, os pacientes foram liberados para exposição solar diária de 10 minutos, nas áreas tratadas, sem nenhum medicamento associado.

#### **4.2.8. Padronização das medidas de repigmentação**

As áreas acrómicas selecionadas foram reproduzidas com desenho em papel *contact* transparente no início do tratamento (tempo T0). Redesenhadas após 30, 60 e 90 dias da realização do procedimento, (nos tempos T30, T60 e T90, respectivamente), levando-se em consideração as áreas de repigmentação. Estes desenhos foram realizados nos quatro diferentes grupos de tratamentos.

Estas imagens foram transferidas para um programa computadorizado de análise de imagens (software Image Pro Plus, versão 4.0), com programação de cálculo de áreas. Foram calculadas as medidas das áreas acrômicas em centímetros quadrados, ao longo dos tempos T0, T30, T60 e T90. Trabalhou-se, então, com as porcentagens de redução das áreas acrômicas, ao longo do tempo, para os cálculos estatísticos.

#### **4.2.9. Análise estatística**

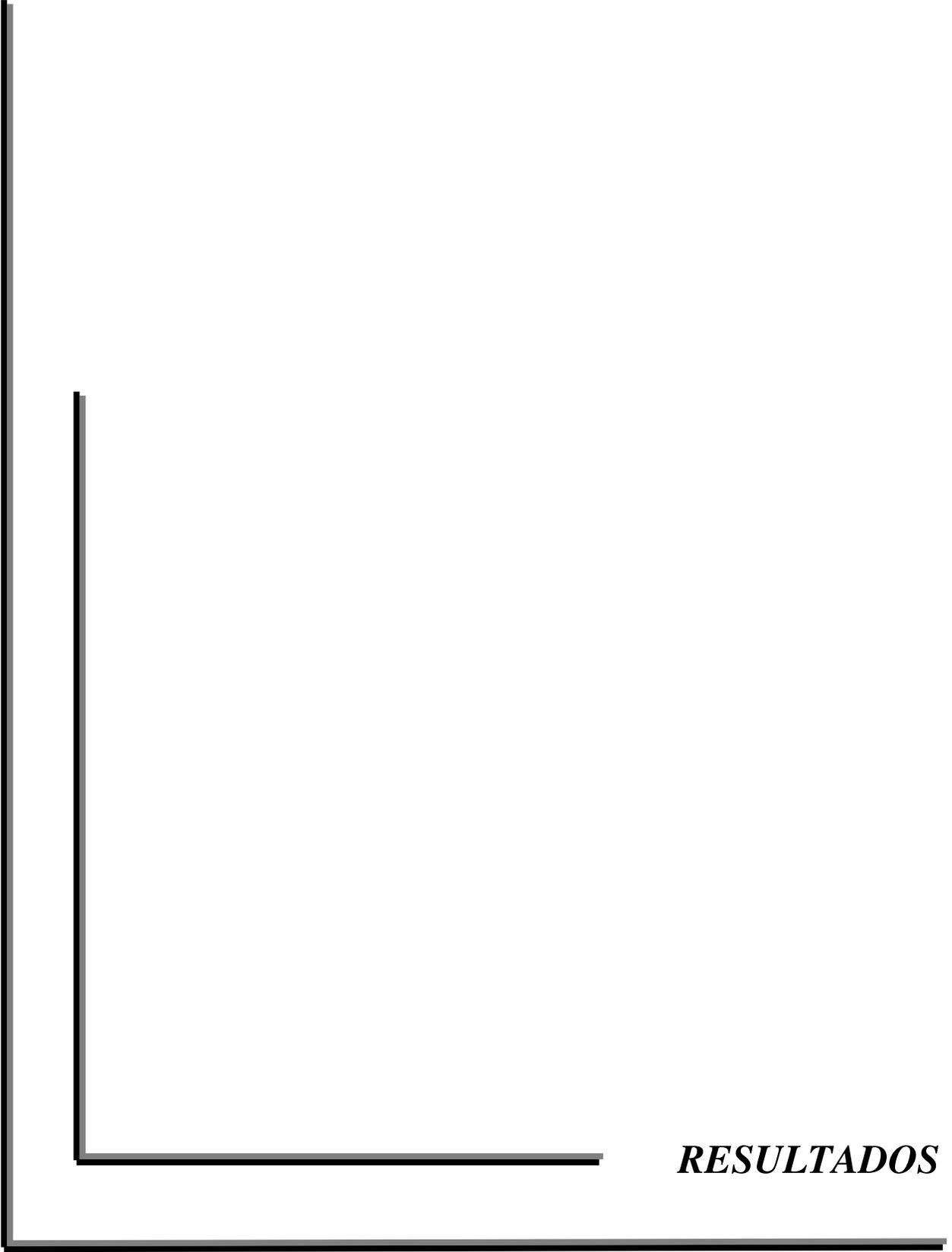
Tratou-se de um estudo clínico, aberto, aleatório, comparativo, visando observar o processo de repigmentação nas áreas tratadas, e seguindo as normas dos seguintes autores: SNEDECOR et al, 1989; COX, 1958; MEAD, 1988; LITTEL et al, 1991; SAS/STAT User`s Guide, 1990.

Foram feitas medidas das áreas acrômicas a serem tratadas, em centímetro quadrado (cm<sup>2</sup>), nos tempos: T0 = início do tratamento; T30 = 30 dias após tratamento; T60 = 60 dias após tratamento; T90 = 90 dias após tratamento. Estas medidas foram estatisticamente comparadas entre si, e em relação aos diferentes tratamentos, ao longo do tempo. Foi observado se o tratamento em questão estaria reduzindo a área inicial acrômica e se existiriam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

O software utilizado na análise estatística foi o SAS System for Windows versão 8.0. Foram calculadas estatísticas descritivas (média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo) e construídos gráficos de médias para cada tratamento em cada um dos tempos.

Para avaliação de cada tratamento, ao longo do tempo, desde T0 até T90, comparando cada tempo em relação ao inicial, foi utilizado o *teste t de Student*.

Para comparação dos tratamentos entre si, foi utilizado um modelo linear generalizado para medidas repetidas com *teste de médias de Tukey*. A variável dependente utilizada no modelo foi a porcentagem de redução da área acrômica ao longo do tempo em relação ao início T0.



***RESULTADOS***

Os resultados dos estudos dos 12 casos tratados foram descritos abaixo.

O caso de número 10 desistiu do tratamento, portanto o mesmo encontra-se nos dados de identificação e história clínica, mas, as análises dos resultados dos tratamentos foram realizadas com 11 casos, num total de 44 áreas tratadas.

## 5.1. IDENTIFICAÇÃO E HISTÓRIA CLÍNICA

Baseados nos critérios de avaliação foram obtidos os seguintes resultados, em relação à **identificação e história clínica**, conforme quadro seguinte:

**Quadro 1:** Descrição dos 12 casos

<b>Caso</b>	<b><u>Idade</u></b> <b>(anos)</b>	<b><u>Sexo</u></b>	<b><u>Tempo doença</u></b> <b>(anos)</b>	<b><u>Fototipo</u></b> <b>(Fitzpatrick)</b>	<b><u>Estabilidade</u></b> <b><u>da doença</u></b> <b>(anos)</b>
<b>1</b>	31	M	16	III	2
<b>2</b>	36	F	5	II	1
<b>3</b>	34	F	32	II	1
<b>4</b>	20	F	15	II	2
<b>5</b>	32	F	7	II	1
<b>6</b>	25	F	6	II	2
<b>7</b>	27	F	20	II	1
<b>8</b>	30	F	9	VI	1
<b>9</b>	47	F	4	II	3
<b>10</b>	25	F	10	II	3
<b>11</b>	33	F	29	III	4
<b>12</b>	28	F	10	II	2

As áreas escolhidas para os diferentes tratamentos estão demonstradas no quadro a seguir. Foram determinadas por escolha aleatória.

**Quadro 2:** Descrição dos 12 casos, em relação às áreas de tratamento

Caso	AC	CM	QM	CC
1	Cotovelo direito	Cotovelo esquerdo	Joelho direito	Joelho esquerdo
2	Punho direito	Braço direito	Punho esquerdo	Coxa esquerda
3	Cotovelo esquerdo	Quadril esquerdo	Perna direita	Pé esquerdo
4	Retroauricular direito	Retroauricular esquerdo	Ombro esquerdo	Intermamária
5	Mão esquerda	Pé esquerdo	Tronco anterior	Cotovelo direito
6	Mento	Mão direita	Antebraço direito	Mão esquerda
7	Abdome	Pé direito	Perna esquerda	Joelho direito
8	Nuca	Quadril direito	Cotovelo direito	Mão esquerda
9	Pé esquerdo	Mão esquerda	Mão direita	Cotovelo direito
10	Cotovelo direito	Antebraço esquerdo distal	Antebraço esquerdo proximal	Joelho direito
11	Antebraço esquerdo	Perna direita	Perna esquerda	Antebraço direito
12	Coxa esquerda	Retroauricular esquerdo	Nuca	Abdome

### **5.1.1. Idade**

Variou de 20 a 47 anos, com média de 30,6 anos (Quadro 1).

### **5.1.2. Sexo**

Predominou o sexo feminino, com 11 mulheres, tendo apenas um indivíduo do sexo masculino (Quadro 1).

### **5.1.3. Fototipo**

Segundo classificação de FITZPATRICK (1974), houve predomínio do fototipo II. A distribuição está representada no Quadro 1.

### **5.1.4. Formas clínicas**

Todos os casos com vitiligo estável há mais de um ano, simétrico e generalizado

(Quadro 1).

### **5.1.5. Antecedentes pessoais**

Todos os casos sem doenças associadas; portanto, com antecedentes pessoais negativos para diabetes mellitus, doenças de tireóide, doenças auto-imunes.

### **5.1.6. Antecedentes familiares**

Os casos selecionados não apresentaram antecedentes familiares de relevância clínica.

Nenhum dos 12 indivíduos selecionados apresentava antecedente familiar de vitiligo.

### **5.1.7. Tratamentos Anteriores**

Todos os pacientes selecionados já haviam esgotado todas as opções terapêuticas clínicas, sem resposta satisfatória.

### **5.1.8. Perfil dos exames laboratoriais**

Todos os exames incluídos no protocolo inicial, como definido na Casuística, foram normais, sendo esta normalidade, inclusive, um dos critérios de inclusão.

## **5.2. TÉCNICAS CIRÚRGICAS**

### **5.2.1. Crioterapia**

A variação de tempo de congelamento e tempo de descongelamento foi preestabelecida em metodologia para todas as 44 áreas tratadas. Variaram da seguinte forma:

Tempo de congelamento: 15 a 30 segundos.

Tempo de descongelamento: 30 a 60 segundos.

O tempo para a formação da bolha e tempo de dessecação da bolha foram avaliados e variaram da seguinte forma:

Tempo para formação da bolha: 12 e 24 horas.

Tempo de dessecação da bolha: 10 a 15 dias.

### **5.2.2. Áreas doadoras**

O tempo cirúrgico variou de 15 a 20 minutos, com excisão e sutura simples como determinado em metodologia.

No oitavo dia, por ocasião do curativo para ablação dos pontos, todos os pacientes apresentaram reepitelização total com excelente cicatrização. Não observamos em

nenhum dos pacientes complicações imediatas, como infecções secundárias e hematomas. Aos 30 dias de evolução, observou-se cicatrização normal com discreto eritema. Aos 60 e 90 dias, a evolução manteve-se sem anormalidades. Não observamos em nenhum paciente, reação acrômica ou alterações tróficas.

### **5.2.3. Transporte do fragmento da área doadora**

Todos os casos foram transportados com sucesso, em condições assépticas, a 0°C, em frasco com meio de cultura MMK2 (SIGMA) ou Solução de Hanks estéril. Não houve nenhum caso de contaminação, nem inviabilidade das células por morte celular.

O tempo de transporte foi de 15 minutos.

## **5.3. TÉCNICAS LABORATORIAIS DE PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS PARA O TRANSPLANTE AUTÓLOGO**

### **5.3.1. Preparação do concentrado celular de queratinócitos e melanócitos não em cultura**

A padronização técnica de preparação do concentrado celular descrita na Metodologia foi resultado de adaptações para os padrões brasileiros.

O meio de cultura MMK2 (SIGMA) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA), 1 UI/ml de penicilina (Penicillin - SIGMA), 0,001mg/ml de estreptomicina (Streptomycin - SIGMA) e 0,02 mM/ml de L- glutamina (L-Glutamine - GIBCO).

Trabalhou-se com um total de células obtidas a partir da área doadora (queratinócitos mais melanócitos), que variou de 1.000.000 a 3.600.000 células totais.

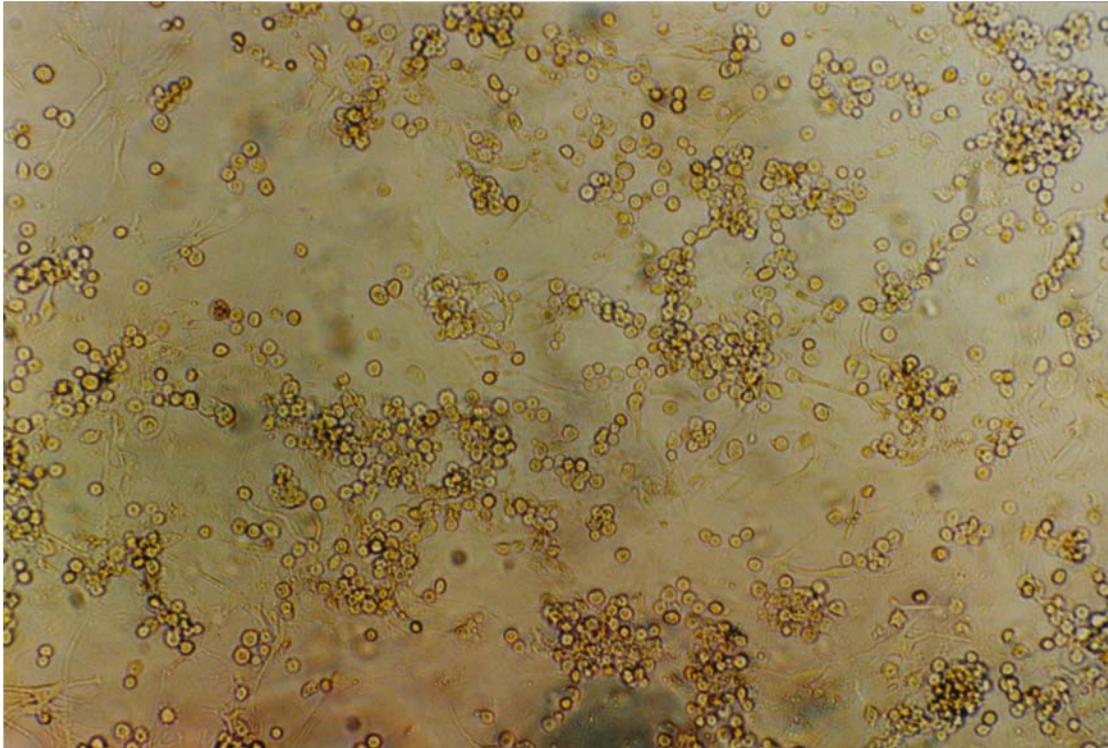
Metade deste total foi conduzido para transplante em área acrômica de tratamento com queratinócitos mais melanócitos não em cultura (QM) e metade conduzido para cultura (CC), como descrito no Quadro 3. Portanto, a quantidade de células a serem utilizadas no tratamento QM variou de 500.000 a 1.800.000 células.

**Quadro 3:** Contagem de células envolvidas nos tratamento

<b>Casos</b>	<b>Total de células obtidas a partir da área doadora</b>	<b>Total de células para QM</b>	<b>Total de células encaminhadas para CC</b>
1	1.800.000 células	900.000 células	900.000 células
2	3.020.000 células	1.510.000 células	1.510.000 células
3	3.500.000 células	1.750.000 células	1.750.000 células
4	1.770.000 células	885.000 células	885.000 células
5	1.000.000 células	500.000 células	500.000 células
6	3.600.000 células	1.800.000 células	1.800.000 células
7	1.500.000 células	750.000 células	750.000 células
8	2.000.0000 células	1.000.0000 células	1.000.000 células
9	1.800.000 células	900.000 células	900.000 células
10	*****	*****	*****
11	1.270.000 células	635.000 células	635.000 células
12	2.000.000 células	1.000.000 células	1.000.000 células

O concentrado destinado ao tratamento QM foi ressuspensão em 0,2 ml de meio de cultura MMK2 (SIGMA), para efetuar-se o transplante.

As células preparadas para o transplante de queratinócitos e melanócitos não em cultura estão ilustradas na próxima figura.



**Figura 17:** Concentrado de queratinócitos e melanócitos não em cultura

### **5.3.2. Cultura de melanócitos autólogos**

A padronização da cultura de melanócitos sofreu várias versões intermediárias, até sua definição final para os padrões brasileiros.

O meio de cultura utilizado MMK2 (SIGMA) foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SIGMA), 1 UI/ml de penicilina (Penicillin - SIGMA), 0,001mg/ml de estreptomicina (Streptomycin - SIGMA) e 0,02 mM/ml de L- glutamina (L-Glutamine - GIBCO), diferentemente dos meios utilizados descritos na literatura.

O concentrado celular obtido a partir da área doadora, para iniciar a cultura, variou de 500.000 a 1.800.000 células, como demonstrado no Quadro 3.

Utilizados frascos de cultura de 25ml ou 75 ml (FALCON).

O concentrado de células semeado no frasco de cultura foi constituído de melanócitos e queratinócitos. O que tem determinado o crescimento exclusivo de melanócitos é o meio de cultura com seus suplementos, preparado para tal.

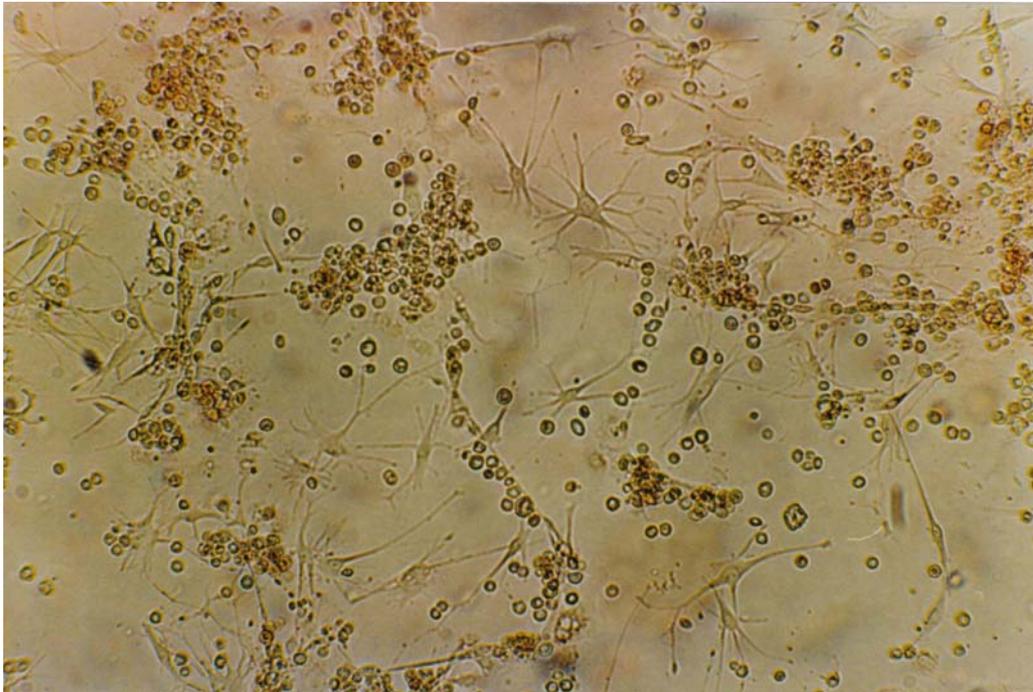
As células, no frasco de cultura, nas suas primeiras 24 horas, têm formatos picnóticos, arredondados e não aderentes ao assoalho do frasco, sobrenadando no meio.

Após 48 a 72 horas aderem-se progressivamente ao assoalho do frasco e aumentam seu diâmetro.

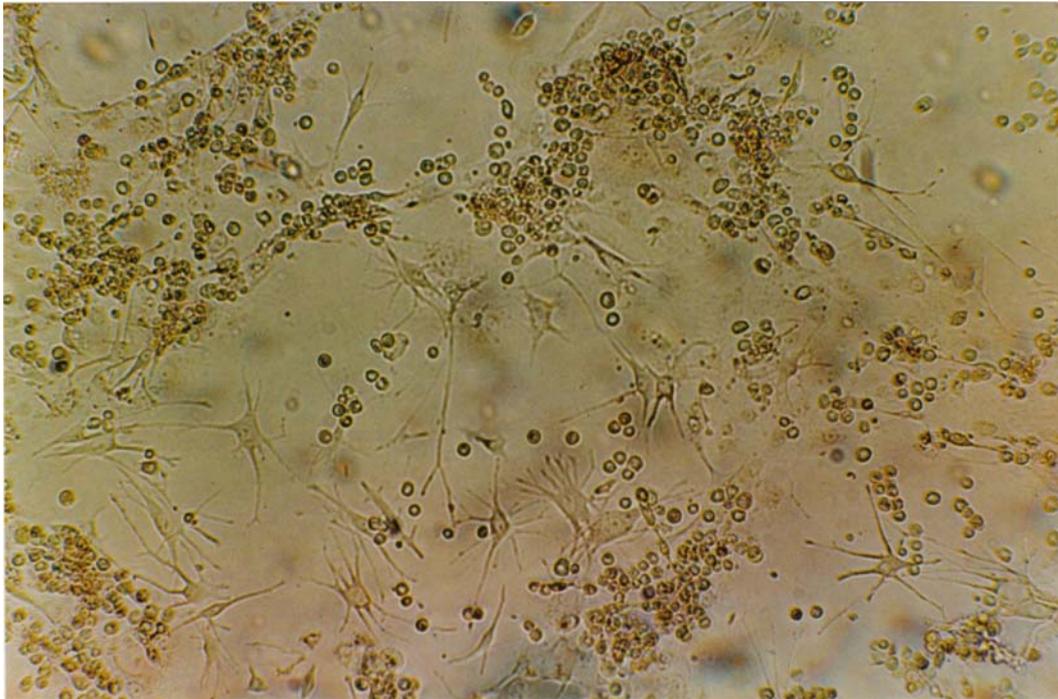
Os melanócitos vão se diferenciando e assumindo aspecto dendrítico, mais tardiamente, por volta do sétimo dia de cultura.

A média de tempo para diferenciação da cultura de melanócitos variou de 15 a 21 dias, o suficiente para “ferrar” o assoalho do frasco.

As figuras que se seguem ilustram os melanócitos em cultura.



**Figura 18:** Melanócitos em cultura



**Figura 19:** Melanócitos em cultura

A contagem de melanócitos a partir da primocultura, após 21 dias, variou de 5 a 10 milhões de células. Foram transplantadas na área de tratamento CC metade deste montante, e a outra metade foi mantida em cultura.

## **5.4. ÁREAS RECEPTORAS**

### **5.4.1. Área receptora de tratamento com apenas crioterapia (AC)**

Houve cicatrização com boa evolução em torno de 15 dias, deixando área eritematosa, que após 30 dias manteve-se com aspecto de pele normal.

A área acrômica inicial não se alterou em nenhum dos casos.

Não houve sinais de repigmentação e a medida da área acrômica ao longo do tempo não apresentou diferenças significativas, conforme ilustrado nas figuras seguintes.



**Figura 20:** Caso11. Tratamiento AC. T0



**Figura 21:** Caso11. Tratamiento AC. T90



**Figura 22:** Caso extra. Tratamiento AC. T0



**Figura 23:** Caso extra. Tratamiento AC.  
T90

#### **5.4.2. Área receptora de tratamento com crioterapia mais meio de cultura (CM)**

Boa evolução na cicatrização, deixando área eritematosa nos primeiros 15 dias, que evoluiu sem anormalidades.

Não houve repigmentação neste grupo.

A medida da área acrômica não se alterou ao longo do tempo, como ilustrado abaixo.



**Figura 24:** Caso 4. Tratamento CM. T0    **Figura 25:** Caso 4. Tratamento CM. T90

#### **5.4.3. Área receptora tratada com crioterapia mais transplante de queratinócitos e melanócitos não em cultura (QM)**

Houve boa cicatrização com dessecamento natural da bolha, deixando área eritematosa local por volta de 15 dias.

O início da repigmentação já pode ser observado no tempo T30 (trinta dias após o tratamento), tornando-se mais evidente após 60 dias de tratamento (T60) e 90 dias de tratamento (T90). Estes resultados foram demonstrados na análise estatística e ilustrados nas figuras abaixo.



**Figura 26:** Caso 1. Tratamento QM. T0



**Figura 27:** Caso 1. Tratamento QM. T30



**Figura 28:** Caso 1. Tratamento QM. T60



**Figura 29:** Caso 1. Tratamento QM. T90



**Figura 30:** Caso 1. Tratamento QM. Com 180 dias após tratamento



**Figura 31:** Caso 12. Tratamento QM. T0



**Figura 32:** Caso 12. Tratamento QM. T0  
(bolha dessecando)



**Figura 33:** Caso 12. Tratamento QM. T60    **Figura 34:** Caso 12. Tratamento QM. T90

#### **5.4.4. Área receptora tratada com crioterapia mais transplante de melanócitos autólogos em cultura (CC)**

Houve boa cicatrização, com dessecamento natural da bolha, deixando área eritematosa local em 15 dias.

O início da repigmentação já pode ser observado no tempo T30 (30 dias após tratamento), tornando-se mais evidente após 60 dias de tratamento (T60) e 90 dias de tratamento (T90).

Os resultados são visualizados na análise estatística e ilustrados nas figuras seguintes.



**Figura 35:** Caso 1. Tratamiento CC. T0



**Figura 36:** Caso 1. Tratamiento CC. T30



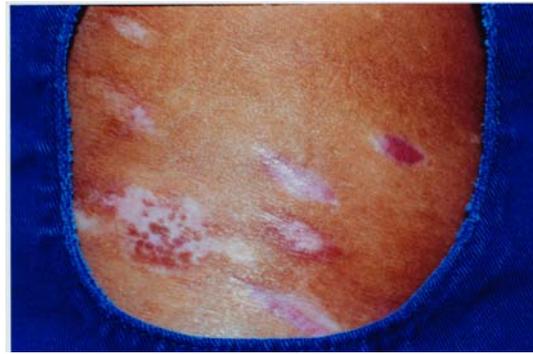
**Figura 37:** Caso1. Tratamiento CC. T60



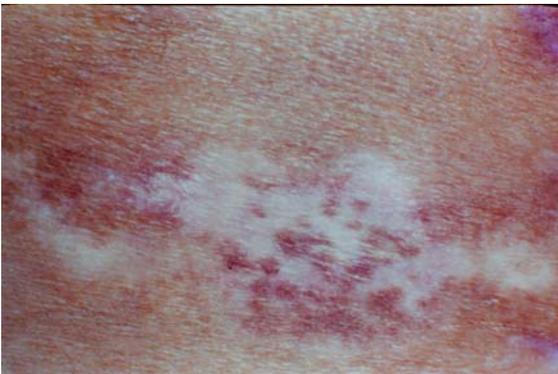
**Figura 38:** Caso 1. Tratamiento CC. T90



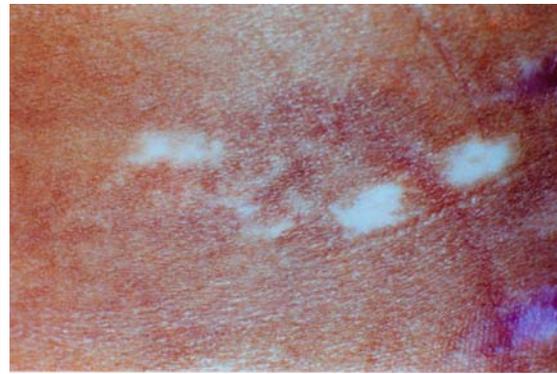
**Figura 39:** Caso 12. Tratamento CC. T0



**Figura 40:** Caso 12. Tratamento CC. T60



**Figura 41:** Caso 12. Tratamento CC. T60



**Figura 42:** Caso 12. Tratamento CC. T90

(maior aumento)

As figuras seguintes ilustram o Caso 11, comparando tratamentos AC e CC, ao longo do tempo.



**Figura 43:** Caso 11. Tratamento AC. T0



**Figura 44:** Caso 11. Tratamento CC. T0



**Figura 45:** Caso 11. Tratamento AC. T60



**Figura 46:** Caso 11. Tratamento CC. T60



**Figura 47:** Caso 11. Tratamento AC. T90 **Figura 48:** Caso 11. Tratamento CC. T90

### **5.5. MEDIDAS DE REPIGMENTAÇÃO**

As medidas das áreas acrômicas selecionadas, em centímetros quadrados, ao longo dos tempos T0, T30, T60 e T90 (0, 30, 60 e 90 dias, respectivamente), nos diferentes tratamentos, foram representadas no Quadro 4. A partir destas medidas foram realizadas as análises estatísticas.

**Quadro 4:** Medidas das áreas acrômicas em cm<sup>2</sup>

<b>Caso</b>	<b>Tratamento</b>	<b>T0</b>	<b>T30</b>	<b>T60</b>	<b>T90</b>
1	AC	5,184543	5,231200	5,272475	5,143516
1	CC	9,188129	8,934243	9,099475	8,054433
1	CM	1,197732	1,211964	1,266662	1,198293
1	QM	9,842878	9,307846	8,868891	7,516108
2	AC	1,549863	1,704483	1,716721	1,718337
2	CC	2,176737	2,099440	0,696911	0,531617
2	CM	2,659089	2,5906	2,628368	2,680302
2	QM	5,758354	5,720329	4,850891	4,830822
3	AC	17,90377	18,28901	17,89206	18,52477
3	CC	25,97992	25,755382	25,746449	24,097687
3	CM	42,46968	42,43992	42,91845	42,34447
3	QM	16,42809	16,305270	15,439465	14,8747489
4	AC	11,99003	11,70618	11,92779	11,72268
4	CC	17,76977	16,102395	14,868125	14,127143
4	CM	12,0185	11,83807	11,84657	11,65421
4	QM	8,251006	7,691790	7,210046	7,085638
5	AC	3,189354	3,024612	3,167574	3,09089
5	CC	5,927006	5,486332	5,4750281	4,776734
5	CM	25,75159	25,60451	25,95165	25,98213
5	QM	6,143971	5,168970	5,039150	4,279414
6	AC	7,496023	7,311016	7,296068	7,159534
6	CC	3,99466	3,749029	3,514714	2,212543
6	CM	1,216004	1,212444	1,202498	1,202314
6	QM	10,04901	9,917986	7,949959	8,952317
7	AC	12,14675	11,92728	11,98803	11,96854
7	CC	13,01403	12,409731	12,187400	11,4756442
7	CM	5,065585	5,067397	5,154987	5,073488
7	QM	5,520549	5,031371	4,871271	4,247273
8	AC	1,299279	1,331374	1,30368	1,305223
8	CC	2,085255	1,694093	1,690336	1,459043
8	CM	13,77862	13,78653	13,82901	13,73805
8	QM	11,82711	11,5724394	11,424399	11,0156896
9	AC	0,7209543	0,6788498	0,7186867	0,7315676
9	CC	1,792674	1,7114749	1,6501	1,6296812
9	CM	2,121564	2,098957	2,161344	2,081344
9	QM	3,669863	3,666872	3,572359	2,9556379
11	AC	2,468381	2,471523	2,413045	2,455103
11	CC	8,695926	8,372620	4,980425	2,4105623
11	CM	5,796475	5,705487	5,686077	5,693388
11	QM	28,75254	27,141096	19,367393	15,071672
12	AC	1,878628	1,903855	1,92417	1,867709
12	CC	14,72664	15,2032119	11,6039279	9,8228713
12	CM	1,26203	1,164403	1,065981	1,069204
12	QM	11,01257	11,137835	10,5786655	9,4983995

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste estudo, 11 dos 12 casos selecionados receberam quatro tratamentos distintos, aleatoriamente distribuídos entre as lesões acrómicas previamente selecionadas: apenas crioterapia (AC); crioterapia mais meio de cultura (CM); transplante de queratinócitos mais melanócitos não em cultura (QM); transplante de melanócitos em cultura (CC).

Realizaram-se as medidas das áreas das lesões (em cm<sup>2</sup>) de cada voluntário.

Estas medidas foram feitas em quatro tempos diferentes (T0, T30, T60 e T90), em que cada intervalo de tempo compreendia um intervalo real de 30 dias entre as medidas.

O objetivo foi verificar a eficácia dos tratamentos ao longo do tempo, isto é, se os tratamentos conseguiriam reduzir a área média acrómica das lesões e se existiriam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, trabalhando-se com a porcentagem de redução da área lesionada.

Os cálculos estatísticos estão demonstrados no ANEXO 4.

### 5.6.1. Comparação dentro de cada tratamento

- **Tratamento AC**

O tratamento AC não apresentou diferenças significativas para as médias das áreas lesionadas ao longo do tempo em relação ao inicial (teste t *Student*, 10gl, P = 0,70, 0,55 e 0,87 para os tempos 30, 60 e 90, respectivamente).

- **Tratamento CM**

O tratamento CM não apresentou diferenças significativas para as médias das áreas lesionadas ao longo do tempo em relação ao inicial para os tempos 60 e 90 (teste t *Student*, 10gl, P = 0,54 e 0,23, respectivamente). Para o tempo 30, foram encontradas diferenças significativas em relação ao inicial (teste t *Student*, 10gl, P = 0,018) com uma ligeira redução da média da área lesionada.

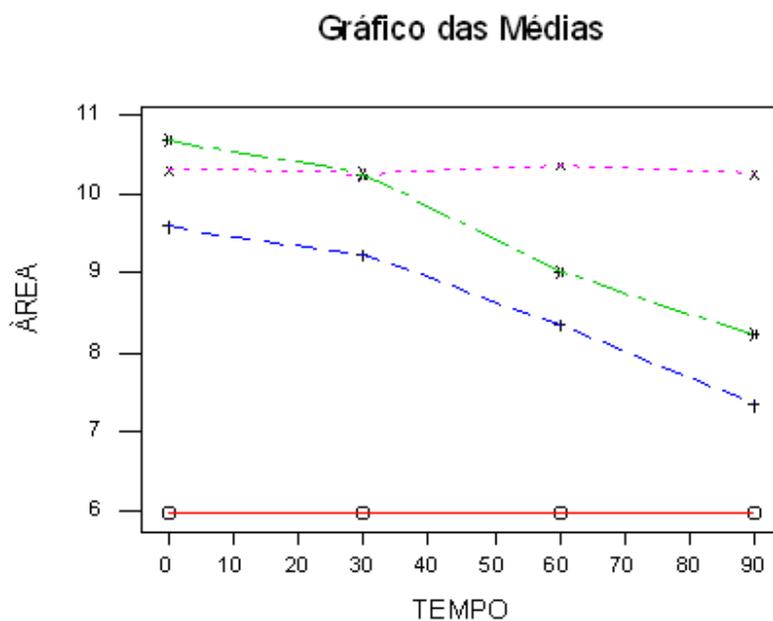
- **Tratamento QM**

O tratamento QM apresentou diferenças significativas para as médias das áreas lesionadas nos tempos 30, 60 e 90 em relação ao inicial (teste t *Student*, 10gl, P = 0,021, 0,064 e 0,055, respectivamente). A média das áreas lesionadas reduziu-se ao longo do tempo.

- **Tratamento CC**

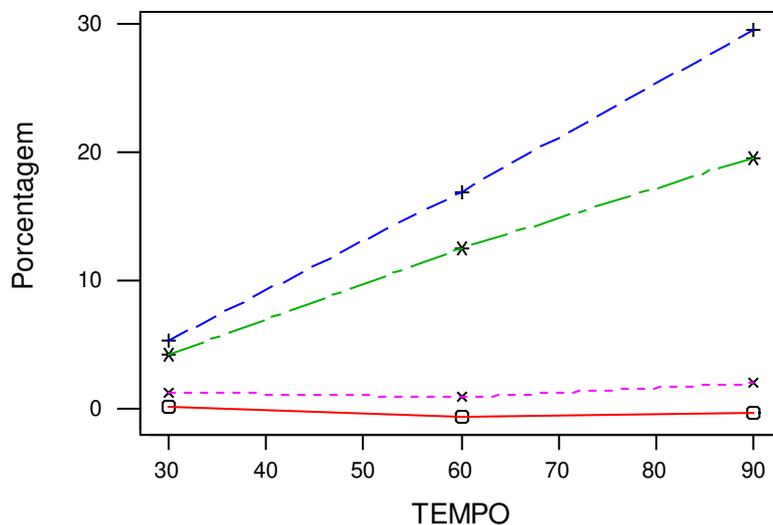
O tratamento CC apresentou diferenças significativas para as médias das áreas lesionadas nos tempos 30, 60 e 90 em relação ao inicial (teste t *Student*, 10gl, P = 0,049, 0,014 e 0,032, respectivamente). A média das áreas lesionadas reduziu-se ao longo do tempo.

Os resultados podem ser visualizados nos gráficos seguintes.



**Gráfico 1:** Gráfico das áreas médias das lesões (cm<sup>2</sup>) por tratamento ao longo do tempo(dias). Em **vermelho** tem-se o tratamento **AC**, em **azul** o tratamento **CC**, em **verde** o tratamento **QM** e em **rosa** o tratamento **CM**

Gráfico das Médias



**Gráfico 2:** Gráfico das médias das porcentagens de redução das áreas lesionadas em relação ao inicial em cada tempo por tratamento. Em **vermelho** tem-se o tratamento **AC**, em **azul** o tratamento **CC**, em **verde** o tratamento **QM** e em **rosa** o tratamento **CM**

### 5.6.2. Comparando os diferentes tratamentos nos tempos em relação à porcentagem de redução das áreas lesionadas

- **Tempo T30**

Os tratamentos CC, QM e CM não diferiram significativamente entre si para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

Os tratamentos QM e CM não diferiram significativamente do tratamento AC para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

O tratamento CC foi superior em média ao tratamento AC (obteve uma porcentagem de redução média maior).

- **Tempo T60**

Os tratamentos CC e QM não diferiram significativamente entre si para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

Os tratamentos AC, QM e CM não diferiram significativamente entre si para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

O tratamento CC foi superior em média aos tratamentos AC e CM (obteve uma porcentagem de redução média maior).

- **Tempo T90**

Os tratamentos CC e QM não diferiram significativamente entre si para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

Os tratamentos CM e AC não diferiram significativamente entre si para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas.

Os tratamentos CC e QM foram superiores para a porcentagem média de redução das áreas lesionadas em relação aos tratamentos CM e AC.

As porcentagens médias de redução para cada tempo estão listadas nas Tabelas 5, 6 e 7, do item 1 do ANEXO 4. A visualização pode ser feita por meio do GRÁFICO 2.

## **5.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROCESSO DE REPIGMENTAÇÃO**

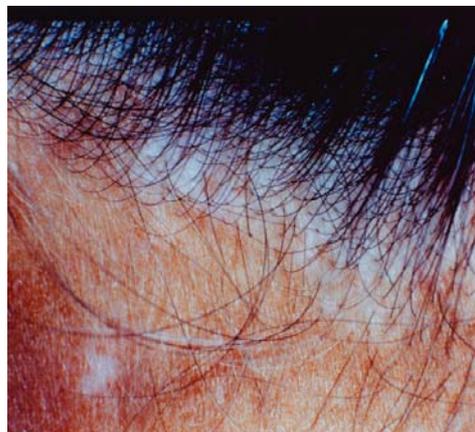
Observaram-se duas formas de início de repigmentação: em pontos foliculares (apenas dois casos) e em pequenas estriações (maioria dos casos), logo nos primeiros 15 dias. Ambas as formas evoluíram em 30 a 60 dias em pigmentação em bloco contínuo central.

A evolução de pigmentação ao longo dos 90 dias se fez da pigmentação central em direção à borda externa, com algumas ilhotas de repigmentação satélites, dentro da mesma mancha.

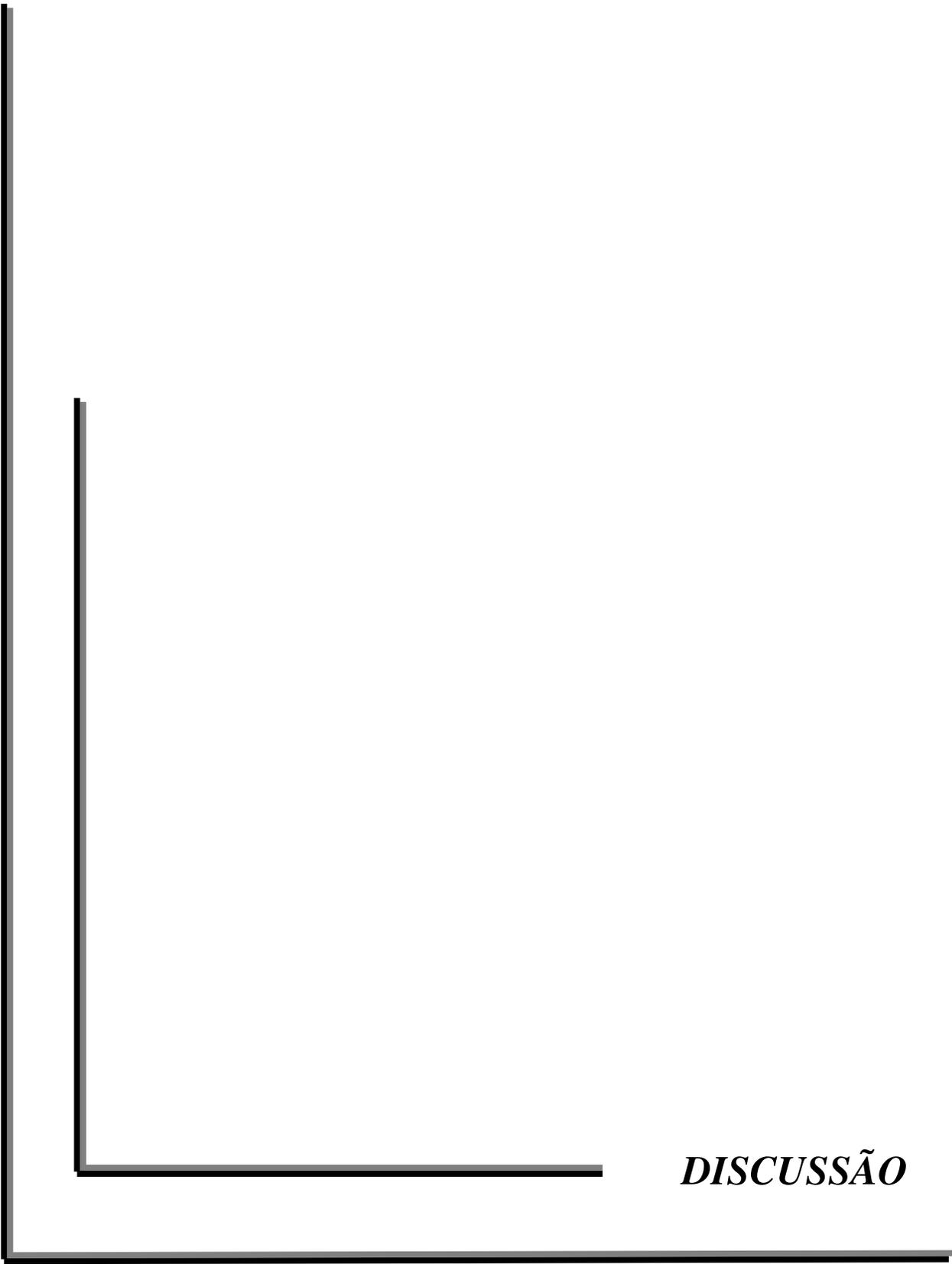
Efeito curioso observado foi a repigmentação de outras manchas acrómicas contíguas à área original tratada, como mostrado na figura seguinte. Este fato foi observado nos tratamentos QM e CC.



**Figura 49:** Caso 12. Tratamento QM. T60. Ilhotas (2) de repigmentação na área originalmente tratada, nuca à direita



**Figura 50:** Caso 12. Tratamento QM. Pigmentação de área contígua



***DISCUSSÃO***

Embora o tratamento do vitiligo tenha se desenvolvido e aperfeiçoado nas últimas décadas, as terapêuticas são ainda insatisfatórias para muitos dos doentes. Isto se deve provavelmente ao fato de que a etiopatogenia seja ainda desconhecida. Mundialmente tem-se pesquisado e tem-se discutido a respeito do tratamento para esta enfermidade. SINGH et al., 1974, em trabalho de revisão, encontraram na literatura indiana, em seus primórdios, descrições de tratamentos tópicos, mostrando preocupações com este assunto já nesta época. FAHMY e ABUSHADY, 1947 a, foram os primeiros a isolar dois componentes ativos da planta *Ammi majus linnaeus*, da qual se originaram os derivados psoralenos. FOWLKS, 1959, estudou a química dos psoralenos. Estudos mais recentes continuaram investigando a eficácia do uso oral ou tópico dos psoralenos e outras terapêuticas, como discutido no item REVISÃO DA LITERATURA. Inúmeras publicações mundiais, ao longo dos anos, têm mostrado a preocupação dos pesquisadores com tal enfermidade.

Nos casos da doença em evolução ativa, várias modalidades do tratamento clínico, como PUVA, corticoterapia local, psoralenos administrados oral e topicamente, melagenina® e outros têm evoluído com respostas satisfatórias, mesmo que incompletas.

Métodos cirúrgicos têm se desenvolvido como excelente opção para pacientes com a doença estável e com resposta insatisfatória ao tratamento clínico. Todas as técnicas cirúrgicas têm se resumido no mesmo princípio básico: o transplante autólogo de melanócitos de uma área doadora pigmentada para uma região com melanócitos ausentes. Estudos nesta direção vêm se desenvolvendo desde as décadas de 60 e 70, utilizando, em princípio, enxertos de epiderme a partir de bolha provocada por sucção e minienxertos; e, mais recentemente, transplante de células epidérmicas.

Embora, teoricamente, seja necessária apenas a existência de área pigmentada doadora para que se proceda o transplante autólogo de melanócitos em um indivíduo portador de vitiligo, tem-se encontrado unanimidade entre os autores, quanto à necessidade de se estabelecer alguns pré-requisitos para que este paciente seja eleito para o procedimento cirúrgico. O vitiligo deve estar estável por, no mínimo, 1 ano, e ser resistente aos tratamentos convencionais. Esta estabilidade tem sido consenso na literatura. O paciente deve ter antecedentes pessoais negativos para fenômeno de Köebner, cicatrizes

hipertróficas e quelóides. Pelo fato de que os resultados não podem ser garantidos como cem por cento satisfatórios, o paciente deve estar suficientemente esclarecido do ponto de vista técnico e psicologicamente preparado (VAN-GEEL et al., 2001; ONGENAE et al., 2001).

Neste presente estudo, após considerarem-se os pré-requisitos descritos acima, padronizaram-se e aplicaram-se quatro diferentes tratamentos cirúrgicos para cada paciente, de tal forma a se estabelecer uma comparação entre eles.

Foram iniciadas as atividades pela implantação do Laboratório de Cultura de Células Epidérmicas e padronização das técnicas de cultura para a realidade brasileira. Alterações específicas em relação ao meio de cultura utilizado, suplementação, tempo e forma de tripsinização, tempo de expansão da cultura, forma de obtenção das células da primocultura para a enxertia e para cultura secundária foram estabelecidas.

O meio de cultura originariamente utilizado MMK2 (SIGMA) teve suplementação adicional com 10% de Soro Fetal Bovino (SIGMA), 1 UI/ml de penicilina (Penicillin - SIGMA), 0,001mg/ml de estreptomicina (Streptomycin - SIGMA) e 0,02 mM/ml de L- glutamina (L-Glutamine - GIBCO). Sem a adição do antibiótico ao meio, foram contaminadas várias culturas durante a fase experimental, por bactérias da própria flora da pele da área doadora. A tripsinização, habitualmente descrita na literatura com tripsina a 0,25% no momento de preparo do fragmento da área doadora, foi utilizada a 2,5% para que as células se desagregassem de forma adequada sem, com isto, prejudicar a viabilidade das mesmas. Nos procedimentos nos quais foi utilizada tripsina mais diluída, as células epidérmicas não se desprenderam da derme. Na preparação dos melanócitos em cultura para a enxertia, para desagregação das células do assoalho do frasco, conseguiu-se manter a tripsina a 0,25%.

Em relação à área doadora, trabalhos descritos na literatura, como a revisão realizada por VAN-GEEL et al., 2001; NJOO et al., 1998, têm chamado a atenção da possibilidade de que a obtenção do fragmento com *punch* ou dermatomo possa provocar despigmentação desta região, devido ao fenômeno de Koebner. As regiões doadoras mais utilizadas, em trabalhos já descritos, foram glúteo, coxa e couro cabeludo. Além de

dermátomo e *punch*, têm sido utilizados como formas de coleta, biópsia *em shave* e obtenção de teto de bolhas provocadas por sucção ou nitrogênio líquido.

Neste trabalho, optou-se por excisão e sutura simples, para minimizar os riscos de despigmentação e permitir cicatrização esteticamente favorável. Outro ponto levado em consideração para escolha desta técnica foi o fato de a mesma poder manter melhor integridade das células, por serem extraídas com menor trauma local.

Em relação à localização, optou-se por região inguinocrural por ser área coberta e por razões estéticas.

Na preparação da área receptora, vários autores vêm utilizando diferentes técnicas que incluem: dermoabrasão com esfoliação superficial, abrasão a laser com anestésico local, indução de bolha com sucção ou nitrogênio líquido. Os efeitos adversos descritos variam: infecção secundária, hipopigmentação local, ulcerações, etc. (NJOO et al., 1998; GUERRA et al., 2000).

Optou-se por preparação da área receptora com bolhas provocadas por nitrogênio líquido a partir dos estudos de GAUTHIER e SURLEVE-BAZEILLE, 1992, que prepararam a área receptora desta forma para o transplante de melanócitos não em cultura, com excelentes resultados. Não se encontrou descrição na literatura de preparação da área receptora com a crioterapia para o transplante de melanócitos em cultura, porém julgou-se tal técnica interessante, desde que os tempos de congelamento e descongelamento estivessem bem dimensionados, minimizando, assim, os efeitos adversos. A bolha, por sua vez, representaria um frasco de cultura *in vivo* para as células, protegendo-as com mais eficiência.

Em relação à localização anatômica das áreas receptoras, foram respeitadas orientações estabelecidas mundialmente: evitar-se áreas consideradas de difícil implantação, como extremidades de mãos e pés, cotovelos, pela dificuldade técnica do local (ONGENAE et al., 2001).

Neste trabalho, o objetivo principal foi atingido, na medida em que conseguiu-se demonstrar que a técnica de transplante de células epidérmicas foi eficiente e capaz de repigmentar com sucesso as áreas acrómicas, sem efeitos adversos importantes.

A adesão celular na área receptora, que representava uma preocupação para o atual estudo, foi satisfatória e sem dificuldades limitantes. Esta preocupação advinha do fato de não haver na literatura transplante de melanócitos em cultura, enxertados em bolhas nas áreas receptoras de vitiligo, e sim apenas em áreas receptoras preparadas com dermoabrasão.

Conseguiu-se demonstrar, com êxito, que os procedimentos com apenas crioterapia (AC) e crioterapia mais meio de cultura (CM), funcionaram como placebo; ou seja, o estímulo provocado pelo nitrogênio líquido e/ou o meio de cultura puro não foram suficientes para induzir pigmentação. Uma das questões foi justamente saber se somente a crioterapia e/ou os substratos existentes no meio de cultura não seriam os responsáveis pela repigmentação. Porém, não houve repigmentação, estatisticamente significativa, em ambos os grupos AC e CM. Concluiu-se, portanto, que estes dois tipos de procedimento podem realmente ser nomeados como controles e considerados placebos. Tem-se discutido na literatura mundial o aparecimento de certa pigmentação decorrente dos procedimentos com dermoabrasão em associação com PUVA, que seria resultado de reação pós- inflamatória, e não por difusão da melanina, descrita como pigmentação pós-inflamatória (ONGENAE et al., 2001). Este fato não foi encontrado nos casos dos grupos AC e CM, pós- crioterapia.

O sucesso dos resultados dos grupos QM e CC, com repigmentação satisfatória, provou que os procedimentos em laboratório, com processamento do concentrado de células (QM) e cultura de melanócitos (CC) não inviabilizaram as células. As mesmas mantiveram-se íntegras e funcionais, com grânulos de melanina ativos o suficiente para promoverem a repigmentação.

Ambos os grupos (QM) e (CC) responderam de forma bastante semelhante. A repigmentação iniciou-se em discretas estriações (maioria dos casos) e em pigmentações foliculares. Após 30 dias já se pôde observar início de repigmentação, que foi crescente ao longo dos 90 dias. Os tratamentos QM e CC apresentaram diferenças significativas para as médias das áreas lesionadas nos tempos T30, T60 e T90 em relação ao inicial T0. As médias das áreas lesionadas reduziram-se ao longo do tempo.

Apesar de se poder observar nos Gráficos 1 e 2 uma tendência melhor da curva CC em relação à curva QM, parecendo ser o tratamento CC mais eficiente, isto não se confirmou estatisticamente. Ambas não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si até o tempo de 90 dias. Estudos futuros deverão ser realizados, acompanhando estes casos além dos 90 dias para se observar se as tendências das curvas se mantêm.

A concentração de células enxertadas também tem representado um motivo de discussão nos estudos mundiais, embora a densidade melanocitária raramente tenha sido citada nos trabalhos publicados. Tem sido determinada uma concentração de melanócitos em cultura para a enxertia, na ordem de 500 a 6000 melanócitos/ mm<sup>2</sup>. Melhores resultados parecem ser obtidos com densidades maiores, porém com chances de hiperpigmentação (LERNER et al., 1987; LÖNTZ et al., 1994; OLSSON e JUHLIN , 1993). A densidade limítrofe inferior para indução de pigmentação seria 190 melanócitos/ mm<sup>2</sup>, como descrito por OLSSON e JUHLIN , 1998. Neste estudo utilizou-se densidade elevada de melanócitos, acima dos índices mínimos descritos na literatura, porém sem efeitos adversos, como hiperpigmentação.

Outra discussão da literatura tem sido o uso ou não de exposição à radiação ultravioleta após o transplante, sendo que ainda não houve consenso nem estudos suficientes a este respeito (ONGENAE et al., 2001; FALABELLA et al. 1992). Optou-se por exposição solar diária de 10 minutos, nas áreas tratadas, após dessecação total das bolhas. Escolheu-se este procedimento, pois todos os casos já haviam sido classificados como refratários aos tratamentos convencionais e já haviam sido submetidos a tratamentos com PUVA, sem sucesso.

Fato interessante observado nos casos analisados foi a repigmentação de áreas acrômicas contíguas às áreas tratadas. Áreas próximas à área originalmente tratada, nos grupos (QM) e (CC), iniciaram processo espontâneo de repigmentação, no mesmo tempo de início da repigmentação da área tratada. Optou-se por denominar este fenômeno de *Fenômeno de Köebner reverso*. Não se encontraram fatos semelhantes descritos na literatura, nem foi possível explicar como se desenvolveu tal estímulo na pigmentação. Uma hipótese aventada seria a de que citoquinas da área doadora estariam provocando o estímulo em melanócitos adjacentes à área receptora. Esta questão mantém-se em aberto.

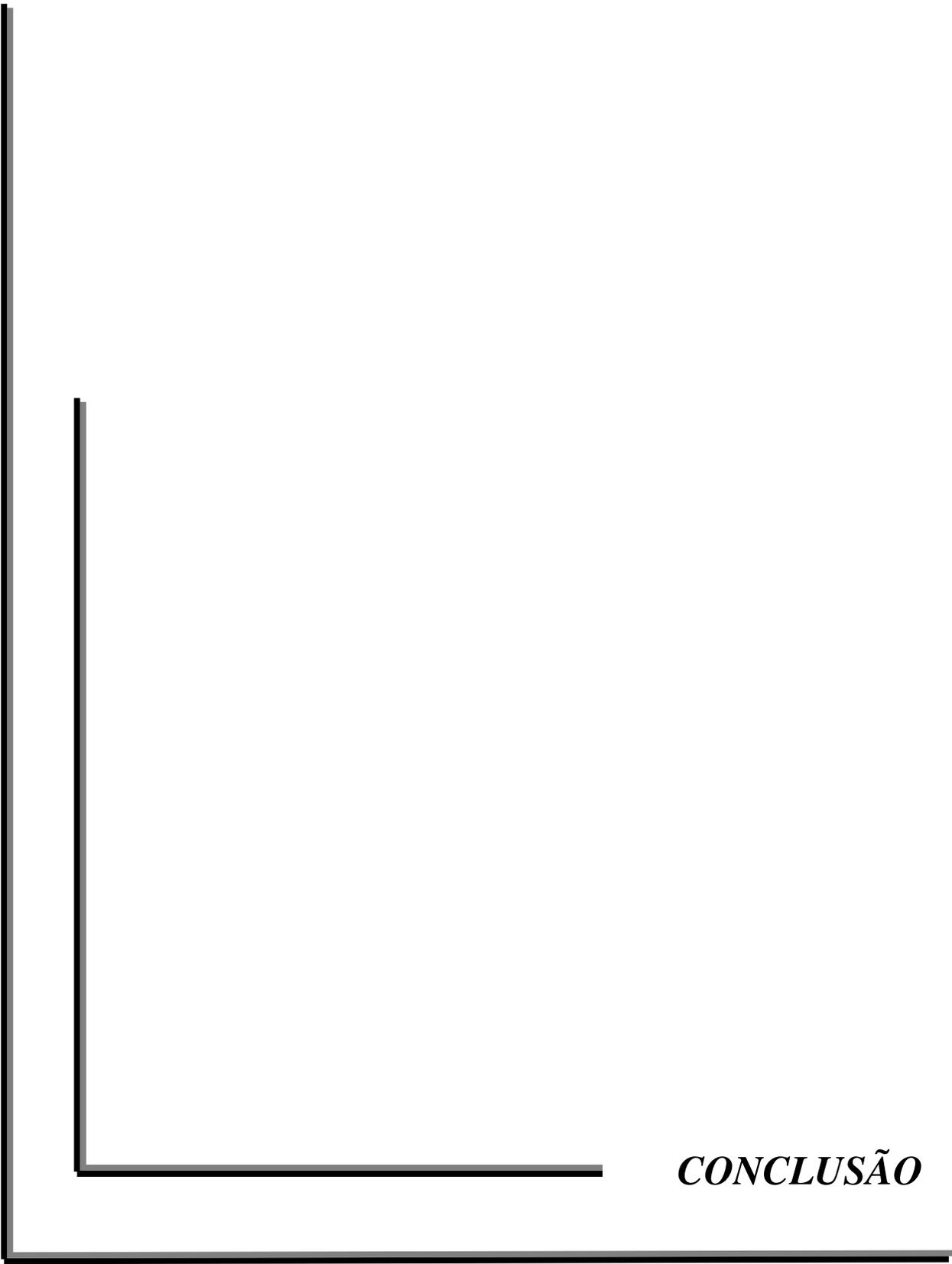
As técnicas utilizadas neste trabalho, com transplante de melanócitos/queratinócitos não em cultura (QM) e transplante de melanócitos em cultura (CC) permitiram maior utilização das células, ampliando o total de áreas tratadas, quando comparadas às técnicas de minienxertos. As técnicas de minienxertos, apesar de serem mais simples e econômicas, trazem inconvenientes como hiperpigmentação, incompatibilidade do tom da cor das áreas doadora/receptora, elevação da área enxertada, cicatrização insatisfatória da área doadora e, principalmente, limitação da extensão da área doadora (VAN-GEEL et al., 2001).

Embora o transplante de melanócitos/queratinócitos não em cultura (QM) tenha sido tão eficiente quanto o transplante de melanócitos em cultura (CC), justificou-se a realização deste segundo, porque, apesar de ser uma técnica mais sofisticada, permitiu estocagem das células (crioestocagem), para uso posterior em manchas acromicas remanescentes, dispensando retirada de novas áreas doadoras, como descrito por OLSSON et al., 1994.

Tem-se observado, em alguns trabalhos, a argumentação quanto à necessidade do transplante de melanócitos associados aos queratinócitos, porque estes sustentariam o crescimento daqueles (VAN-GEEL et al., 2001; GAUTHIER e SURLEVE-BAZEILLE, 1992). Não foi comprovada tal necessidade neste estudo, uma vez que ambos os grupos de tratamento QM e CC comportaram-se de forma bastante semelhante.

Julgou-se de extrema importância a seleção correta dos doentes para o transplante de melanócitos. Devem apresentar vitiligo estável, não progressivo, não excedendo 30% da área corpórea, resistentes aos tratamentos convencionais. Deve-se evitar as localizações acrais. Os indivíduos devem estar altamente motivados e psicologicamente receptivos ao tratamento. Muitos dos pacientes relataram que a perspectiva de novos tratamentos trouxe a eles novo alento de vida, devido às limitações sociais impostas pela doença.

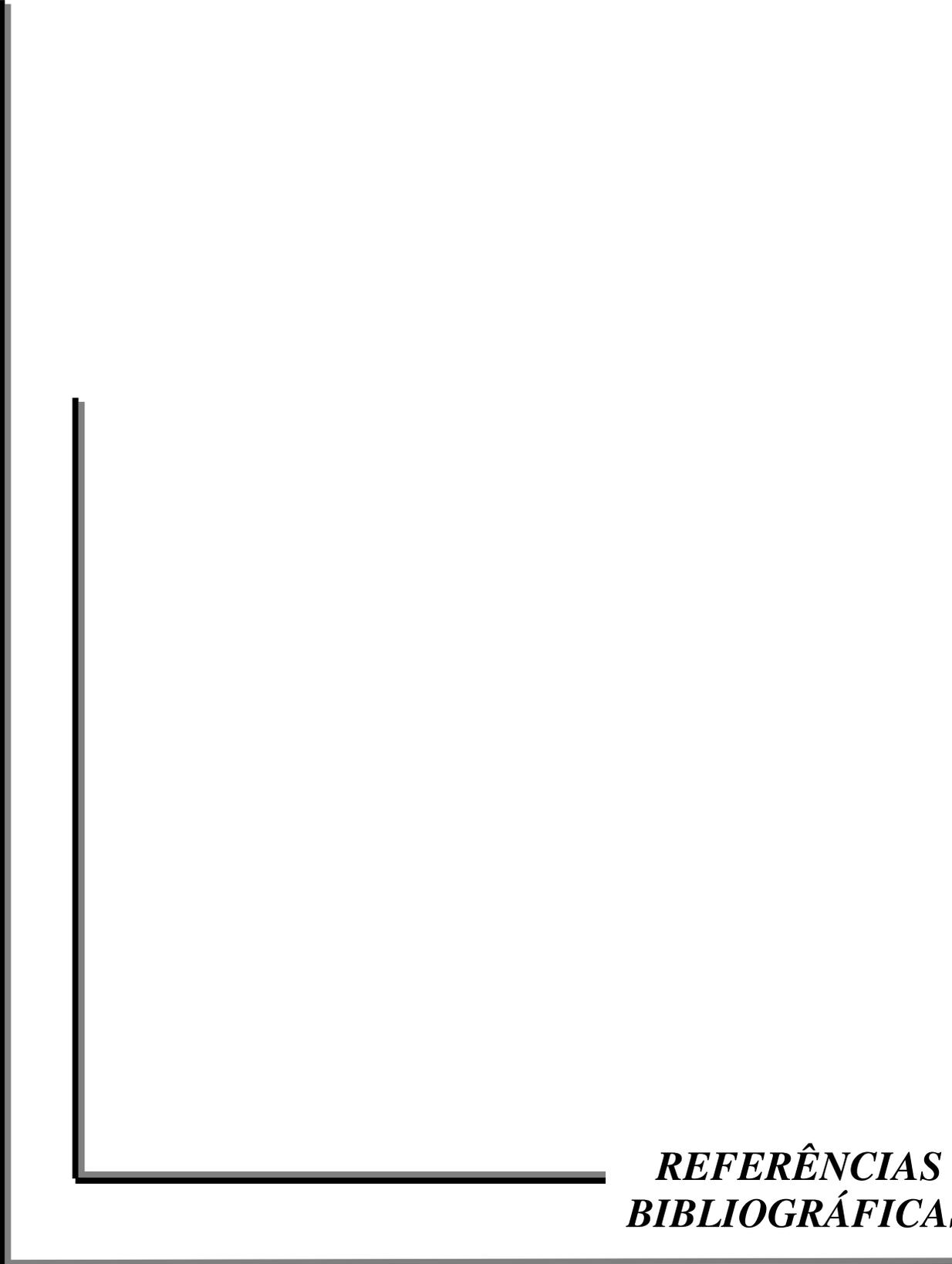
Finalizando, sabe-se que, com estas técnicas cirúrgicas, não se alcança a cura etiológica, porém pode-se estar a caminho, a partir destas investigações. Apesar da técnica ser sofisticada e restrita, surge como uma estratégia terapêutica do futuro.



*CONCLUSÃO*

Dos dados observados e discutidos, concluiu-se:

- Conseguiu-se demonstrar e aplicar, com sucesso, modelo de transplante autólogo de melanócitos em cultura para tratamento de áreas acrômicas de vitiligo. Utilizou-se técnica de enxertia das células em bolha provocada por nitrogênio líquido na área receptora. Esta técnica foi desenvolvida visando padrões deste país.
- Este estudo permitiu avanços no tratamento cirúrgico do vitiligo, com perspectivas inovadoras na terapêutica desta doença.
- Comprovou-se viabilidade normal quanto à pigmentação das células cultivadas *in vitro*.
- Comprovou-se implantação adequada dos melanócitos cultivados na área receptora.
- O estímulo com nitrogênio líquido na área receptora e o meio de cultura utilizado não estimularam a repigmentação. Os grupos de tratamento de apenas crioterapia e crioterapia mais meio de cultura funcionaram como grupos controles ou placebos.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com transplante de melanócitos e queratinócitos não em cultura e melanócitos em cultura. Porém o tratamento com transplante de melanócitos em cultura abre novas perspectivas de pesquisa, inclusive com crioestocagem.
- A perspectiva de novos tratamentos tem trazido alento de vida aos portadores de vitiligo, devido às limitações sociais impostas pela doença. Com estas técnicas cirúrgicas, não se alcança a cura etiológica, porém pode-se estar a caminho, a partir destas investigações. Apesar da técnica ser sofisticada e restrita, surge como uma estratégia terapêutica do futuro.



*REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS*

- AFRICK J.; FULTON J. Treatment of vitiligo with topical trimethylpsoralen and sunlight. **Br J Dermatol**, 84: 151-6, 1971.
- ANDREASSI L; PIANIGIANI E; ANDREASSI A.; TADDEUCCI P.;BIAGIOLI M. A new model of epidermal culture for the surgical treatment of vitiligo. **Int J Dermatol**, 37: 595-8, 1998.
- AZAMBUJA R. D. Melagenina and vitiligo. **Dermatology**, 184: 153-60, 1992.
- BACCI A.M.; ROJAS R. Evaluation in vitiligo patients treated with 50% human placenta hydroalcoholic extract. **An bras dermatol**, 75(1): 21-9, 2000.
- BECKER S. Psoralen phototherapeutic agents. **JAMA**, 202: 120-2, 1967.
- BEHL P. Treatment of vitiligo with homologous thin Thiersch's skin grafts. **Curr Med Pract**, 8: 218-21, 1964.
- BEHL P. Repigmentation of segmental vitiligo by autologous minigrafting. **J Am Acad Dermatol**, 12: 118-9, 1985.
- BONAFE J.L.; LASSERE J.; CHAVOIN J.P. Pigmentation induced in vitiligo by normal skin grafts and PUVA stimulation: a preliminary study. **Dermatologica**, 166: 113-6, 1983.
- BOSE S.K. Modified Thiersch grafting in stable vitiligo. **J Dermatol**, 23: 362-4, 1996.
- BUCK H.; MAGNUS I.; PORTER A. The action spectrum of 8-methoxypsoralen for erythema in human skin. **Br J Dermatol**, 72: 249-55, 1960.
- CORMANE R.H.; SIDDIQUI A.H.; NENGERMAN I.M. Photochemotherapy of vitiligo with oral phenylalanine. **J Invest Dermatol**, 80: 367, 1983.
- CORMANE R.; SIDDIQUI A.; WESTERHOF W. Phenylalanine and UVA light for the treatment of vitiligo. **Arch Dermatol Res**, 277: 126-30, 1985.
- COX D.R. **Planning of experiments**. John Wiley & Sons, Inc, 1958.
- EL MOFTY A. A preliminary clinical report on the treatment of leukoderma with *Ammi majus* Linn. **J Royal Egypt Med Assoc**, 31: 651-5, 1948.
- FAHMY I.R.; ABUSHADY H. A crystalline principle from *Ammi majus* L. **Nature**, 160: 468-9, 1947 a..

- FAHMY I.R.; ABUSHADY H. Ammi majus Linn. Pharmacognostical study and isolation of crystalline constituent, ammoidin. **Q J Pharm Pharmacol**, 20:281, 1947 b.
- FALABELLA R. Repigmentation of segmental vitiligo by autologous minigrafting. **J Am Acad Dermatol**, 9:514-21, 1983.
- FALABELLA R. Repigmentation of leukoderma by autologous epidermal grafting. **J Dermatol Surg Oncol**, 10: 136-44, 1984.
- FALABELLA R. Treatment of localized vitiligo by autologous minigrafting. **Arch Dermatol**, 124: 1649-55, 1988.
- FALABELLA R.; ESCOBAR C.; BORRETO I. Transplantation of in vitro cultured epidermis bearing melanocytes for repigmenting vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, 21: 257-64, 1989.
- FALABELLA R.; ESCOBAR C.; BORRETO I. Treatment of refractory and stable vitiligo by transplantation of in vitro cultured epidermal autografts bearing melanocytes. **J Am Acad Dermatol**, 26: 230-6, 1992.
- FALABELLA R.; ARMNATEGUI A.; BARONA M.I.; ALZATE A. The minigrafting test for vitiligo: detection of stable lesions for melanocyte transplantation. **J Am Acad Dermatol**, 32: 228-32, 1995 a.
- FALABELLA R.; BARONA M.; ESCOBAR C.; BORRERO I.; ARRUNATEGUI A. Surgical combination therapy for vitiligo and piebaldism. **Dermatol Surg**, 21: 852-7, 1995 b.
- FARAH F.; KURBAN A.; CHAGLASSIAN H. The Treatment of vitiligo with psoralens and traimcinilone by mouth. **Br J Dermatol**, 79: 89-91, 1967.
- FERNANDES N.; DIOGO C.; PEREZ M.; LIMA M.C. Childhood vitiligo: a therapeutic analysis of 95 cases. **An Bras Dermatol**, 76(5): 575-81, 2001.
- FITZPATRICK T.B. **Dermatology in general medicine**, 2nd ed.. Mc Graw Hill Book Company, p. 131, 1974.
- FITZPATRICK T.B. Hypomelanosis. **J South Med Assu**, 57: 995, 1964.
- FOWLKS W. The chemistry of the psoralens. **J Invest Dermatol**, 32: 249-53, 1959.

GAUTHIER Y.; SURLEVE-BAZEILLE J. E. Autologous grafting with noncultured melanocytes: A simplified method for treatment of depigmented lesions. **J Am Acad Dermatol**, 26: 191-4, 1992.

GOKHALE B.; GOKHALE T. Corticotrophin and vitiligo (preliminary observations). **Br J Dermatol**, 95:329, 1976.

GOLDSTEIN E.; HABERMAN H.F.; MENON I.A. Non-psoralen treatment of vitiligo. Part I. Cosmetics, systemic coloring agents, and corticosteroids. **Int J Dermatol**, 31: 229-36, 1992 a..

GOLDSTEIN E.; HABERMAN H.F.; MENON I.A. Non-psoralen treatment of vitiligo. Part II. Less commonly used and experimental therapies. **Int J Dermatol**, 31: 314-9, 1992 b.

GUERRA L.; CAPURRO S.; MELCHI F. Treatment of “stable” vitiligo by Timesurgery and transplantation of cultured epidermal autografts. **Arch Dermatol**, 136: 1380-9, 2000.

HERNANDEZ-PEREZ E. Vitiligo treated with ACTH. **Int Soc Tropic Dermatol**, 18: 578-9, 1979.

JANNIGER C.K. Childhood vitiligo. **Cutis**, 51: 25-8, 1993.

JIMBOW K.; OBATA H.; PATHAK M. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. **J Invest Dermatol**, 62: 436-49, 1974.

JIMBOW K. Vitiligo. **Dermatologic Clinics**, 16(2): 399-47, 1998.

KAO C.; YU H. Comparison of the effect of 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus UVA (PUVA) on human melanocytes in vitiligo vulgaris and in vitro. **J Invest Dermatol**, 98: 734-40, 1992.

KAUFMANN R.; GREINER D.; KIPPENBERGER S.; BERND A. Grafting of in vitro cultured melanocytes onto laser-ablated lesions in vitiligo. **Acta Derm Venereol (Stockh)**, 78: 136-38, 1998.

KHASTALA U. Suction blister device for separation of viable epidermis from dermis. **J Invest Dermatol**, 50: 129-37, 1968.

KOGA M. Vitiligo: a new classification and therapy. **Br J Dermatol**, 97: 255-61, 1977.

- KOGA M. Epidermal grafting using the tops of suction blisters in the treatment of vitiligo. **Arch Dermatol**, 124: 1656-8, 1988.
- KOVACS S.O. Vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, 38(5): 647-66, 1998.
- LEIDER M. **A dictionary of dermatological words, terms and phrases**. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1968.
- LERNER A.B. Vitiligo. **J Invest Dermatol**, 32: 285-310, 1959.
- LERNER A.B.; HALABAN R.; KLAUS S.N.; MOELLMANN G.E. Transplantation of human melanocytes. **J Invest Dermatol**, 89: 219-24, 1987.
- LEVER W.; LEVER G.S. **Histopathology of the Skin.**, 7th ed.. Philadelphia: JB Lippincott Company, p. 490, 1990.
- LITTEL A.; RAMON C. **SAS System for linear models**, 3th ed.. SAS Institute Inc., 1991.
- LÖNTZ W.; OLSSON M.J.; MOELLMANN G.; LERNER A. Pigment cell transplantation for treatment of vitiligo: A progress report. **J Am Acad Dermatol**, 30: 591-7, 1994.
- MACHADO C.S. Implantes cutâneos em vitiligo. **Med Ibero Lat Amer**, 13: 243-6, 1985.
- MACHADO C.S. **Vitiligo: Áreas tratadas por enxertia com raspado cutâneo e estudo da reação de polimerase em cadeia de RNA mensageiro de tirosinase por transcritase reversa**. São Paulo, 2000 (Tese - Doutorado- Universidade Federal de São Paulo).
- MEAD R. **The Designs of Experiments. Statistical principles for practical application**. Cambridge: University Press, 1988.
- MONK B. Topical fluorouracil in vitiligo. **Arch Dermatol**, 121: 25-26, 1985.
- MONTGOMERY D. Vitiligo treated with finsen lighth. **J Cutan Urin Dis**, 22: 17-9, 1904.
- MOSHER D.; PARRISH J.; FITZPATRICK T. Monobenzylether of hydroquinone. **Br J Dermatol**, 97: 669-79, 1977.
- MUTALIK S. Transplantation of melanocytes by epidermal grafting. An indian experience. **J Dermatol Surg Oncol**, 19: 231-4, 1993.
- NAIR B.K. Vitiligo: a retrospect. **Int J Dermatol**, 17: 755-7, 1978.

NAUGHTON G.; EISINGER M.; BYSTRYN J. Antibodies to normal human melanocytes in vitiligo. **J Exp Med**, 158: 246-51, 1983 a.

NAUGHTON G.; EISINGER M.; BYSTRYN J. Detection of antibodies to melanocytes in vitiligo by specific immunoprecipitation. **J Invest Dermatol**, 81: 540-2, 1983 b.

NAUGHTON G.; REGGIARDO D.; BYSTRYN J. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, 15: 978-81, 1986.

NJOO M.D.; WESTERHOF W.; BOS J.D.; BOSSUYT P.M.M. A systematic review of autologous transplantation methods in vitiligo. **Arch Dermatol**, 134: 1543-9, 1998.

NORDLUND J.J.; HALDER R. Melagenina: An analysis of published and other available data. **Dermatologica**, 181: 1-4, 1990.

OLSSON M.J.; JUHLIN L. Melanocyte transplantation in vitiligo. **Lancet**, 340: 981, 1992.

OLSSON M.J.; JUHLIN L. Repigmentation of vitiligo by transplantation of cultured autologous melanocytes. **Acta Derm Venereol (Stockh)**, 73: 49-51, 1993.

OLSSON M.J.; MOELLMANN G.; LERNER A.B.; JUHLIN L. Vitiligo: Repigmentation with cultured melanocytes after cryostorage. **Acta Derm Venereol**, 74: 226-8, 1994.

OLSSON M.J.; JUHLIN L. Transplantation of melanocytes in vitiligo. **Br J Dermatol**, 132: 587-91, 1995.

OLSSON M.J.; JUHLIN L. Epidermal sheet grafts for repigmentation of vitiligo and piebaldism, with a review of surgical techniques. **Acta Derm Venereol (Stockh)**, 77: 463-6, 1997.

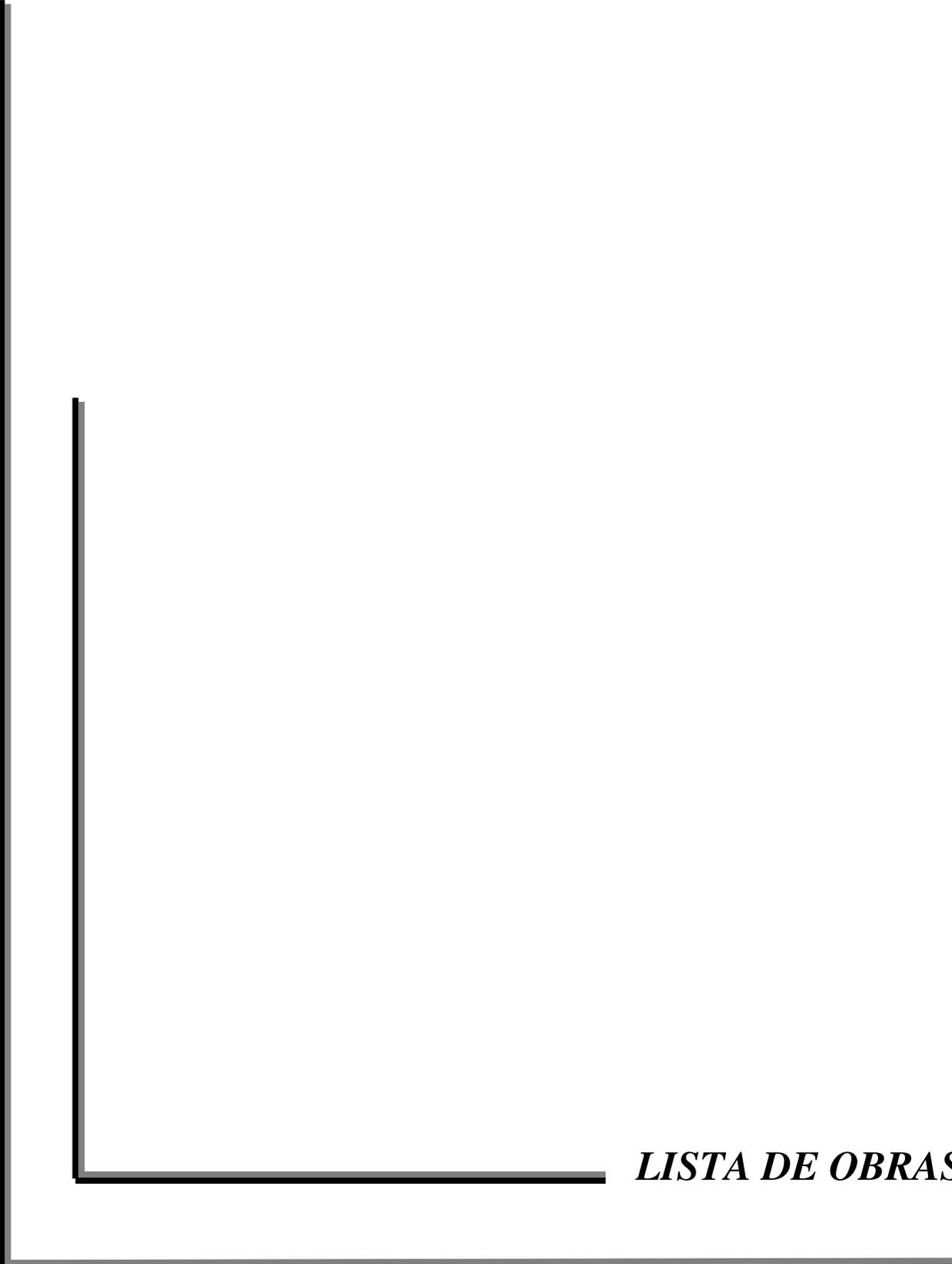
OLSSON M.J.; JUHLIN L. Leucoderma treated by transplantation of a basal cell layer enriched suspension. **Br J Dermatol**, 138: 644-8, 1998.

ONGENAE K.; VAN-GEEL N.; NAEYAERT J.M. Autologous cellular suspensions and sheets in the treatment of achromic disorders: the need for future controlled studies. **Dermatology**, 202(2): 158-61, 2001.

ONGENAE K.; DE MIL M.; NAEYAERT J.M. Noncultured and cultured melanocytes in the treatment of achromic epidermal disorders. **J Invest Dermatol**, 107: 510, 1996.

- ORTEL B.; TANEW A.; HONIGSMANN H. Treatment of vitiligo with khellin and ultraviolet A. **J Am Acad Dermatol**, 18: 693-701, 1988.
- PARRISH J.; FITZPATRICK T.; SHEA C. Photochemotherapy of vitiligo. **Arch Dermatol**, 112: 1531-4, 1976.
- PARSAD D.; SAINI R.; VERMA N. Combination of PUVA sol and topical calcipotriol in vitiligo. **Dermatology**, 197(2): 167-70, 1998.
- PASRICHA J.S.; KHERA V. Effect of prolonged treatment with levamisole on vitiligo with limited and slow-spreading disease. **Int J Dermatol**, 33: 584-87, 1994.
- PATHAK M. Mechanism of psoralen photosensitization and in vivo biological action spectrum of 8-methoxypsoralen. **J Invest Dermatol**, 37: 397-407, 1962.
- RHEINWALD J.; GREEN H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, 6: 331-4, 1975.
- ROOK A.; WILKINSON D.S.; EBLING F.J.G.; CHAMPION R.H.; BURTON J.L. **Textbook of Dermatology**, 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, vol 2, p. 1591, 1986.
- SALZER B.A.; SCHALLREUTER K.U. Investigation of personality structure in patients with vitiligo and a possible association with impaired catecholamine metabolism. **Dermatology**, 190: 109-15, 1995.
- SAMPAIO S.; RIVITTI E. **Dermatologia**, 1ª edição. São Paulo: Ed. Artes Médicas, p. 270, 1998.
- SAS/STAT. **User`s Guide**, Version 6, vol. 2, 4th ed., SAS Institute Inc., 1990.
- SCHALLREUTER K.U.; WOOD J.M.; LEMKE K.R. Treatment of vitiligo with a topical application of pseudocatalase and calcium in combination with short-term UVB exposure: A case study on 33 patients. **Dermatology**, 190: 223-29, 1995.
- SCHULPIS C.H.; ANTONIOU C.; MICHAS T. Phenylalanine plus ultraviolet light: preliminary report of promising treatment for childhood vitiligo. **Pediatr Dermatol**, 6: 332-5, 1989.

- SELMANOWITZ E.J.; RABINOWITZ A.D.; ORENTREICH N. Pigmentary correction of piebaldism by autografts: procedures and clinical findings. **J Dermatol Surg Oncol**, 3:615-22, 1977.
- SINGH G.; ANSARI Z.; DWIVELDI R. Vitiligo in ancient Indian medicine. **Arch Dermatol**, 109: 913, 1974.
- SNEDECOR W.; GEORGE W.; COCHRAN W.G. **Statistical Methods**, 8th ed. Iowa State: University Press, 1989.
- SPENCER G.A.; TOLMACH J.A. Exchange grafts in vitiligo. **J Invest Dermatol**, 19: 1-5, 1952.
- SRINIVAS C.; SHENOI S.; BLACHANDRAN C. Acceleration of repigmentation in vitiligo by topical minocidil in patients on photochemotherapy. **Int J Dermatol**, 29: 14-5, 1990.
- SUGA Y.; BUTT K.I.; TAKIMOTO R. Successful treatment of vitiligo with PUVA-pigmented autologous epidermal grafting. **Int J Dermatol**, 35: 518-22, 1996.
- SUTTON R.L. On definition of vitiligo. **Arch Dermatol**, 91: 288, 1965.
- SUVANPRAKORN P.; DEE-ANANLAP S.; PONGSOMBOON C. Melanocyte autologous grafting for treatment of leukoderma. **J Am Acad Dermatol**, 13: 968-74, 1985.
- TSUJI T.; HAMADAT. Topically administered fluorouracil in vitiligo. **Arch Dermatol**, 119: 722-7, 1983.
- TSUKADA S. Treatment of vitiligo. **Rinsho Derma (Tokyo)**, 1:105, 1959.
- VAN-GEEL N.; ONGENAE K.; NAEYAERT J.M. Surgical techniques for vitiligo: a review. **Dermatology**, 202: 162-6, 2001.
- VASISTHA L.K.; SINGH G. Vitiligo and intralesional steroids. **Indian J Med Res**, 69: 308-11, 1979.



*LISTA DE OBRAS*

ARRUNATEGUI A.; ARROYO C.; GARCIA L.; COVELLI C. Melanocyte reservoir in vitiligo. **Int J Dermatol**, 33: 484-7, 1994.

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

BESSOU S.; SURLEVE-BAZEILLE J.E.; PAIN C. Ex vivo study of skin phototypes. **J Invest Dermatol**, 107: 684-88, 1996.

BRYSK M.; NEWTON R.; RAJARAMAN S. Repigmentation of vitiliginous skin by cultured cells. **Pigment Cell Res**, 2: 202-7, 1989.

GUILLO LA.; MONTEIRO H.P. Interaction of 8-methoxypsoralen with cultured normal human epidermal melanocytes. **An Bras Dermatol**, 73(3): 197-202, 1998.

GUPTA S.; SHROFF S.; GUPTA S. Modified technique of suction blistering for epidermal grafting in vitiligo. **Int J Dermatol**, 38: 306-9, 1999.

HALDER R.M.; GRIMES P.E.; COWAN C.A. Childhood vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, 16: 948-54, 1987.

HANN S.K.; IM S.; BONG H.W.; PARK Y.K. Treatment of stable vitiligo with autologous epidermal grafting and PUVA. **J Am Acad Dermatol**, 32: 943-8, 1995.

KAHN A.M.; COHEN M.J.; KAPLAN L.; HIGHTON A. Vitiligo: Treatment by dermabrasion and epithelial sheet grafting - a preliminary report. **J Am Acad Dermatol**, 28: 773-4, 1993.

KHALID M.; MUJTABA G. Response of segmental vitiligo to 0.05% clobetasol propionate cream. **Int J Dermatol**, 37: 701-8, 1998.

KIM H.Y.; KANG K.Y. Epidermal grafts for treatment of stable and progressive vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, 40: 412-7, 1999.

KIM S.M.; LEE H.S.; HANN S.K. The efficacy of low-dose oral corticosteroids in the treatment of vitiligo patients. **Int J Dermatol**, 38: 546-50, 1999.

KNOELL K.A.; SCHREIBER A.J.; MILGRAUM S. Treatment of vitiligo with the ultrapulse carbon dioxide laser in patients concomitantly receiving oral psoralen plus UVA therapy. **Arch Dermatol**, 133: 1605-6, 1997.

MUTALIK S.; GINZBURG A. Surgical management of stable vitiligo: A review with personal experience. **Dermatol Surg**, 26: 248-54, 2000.

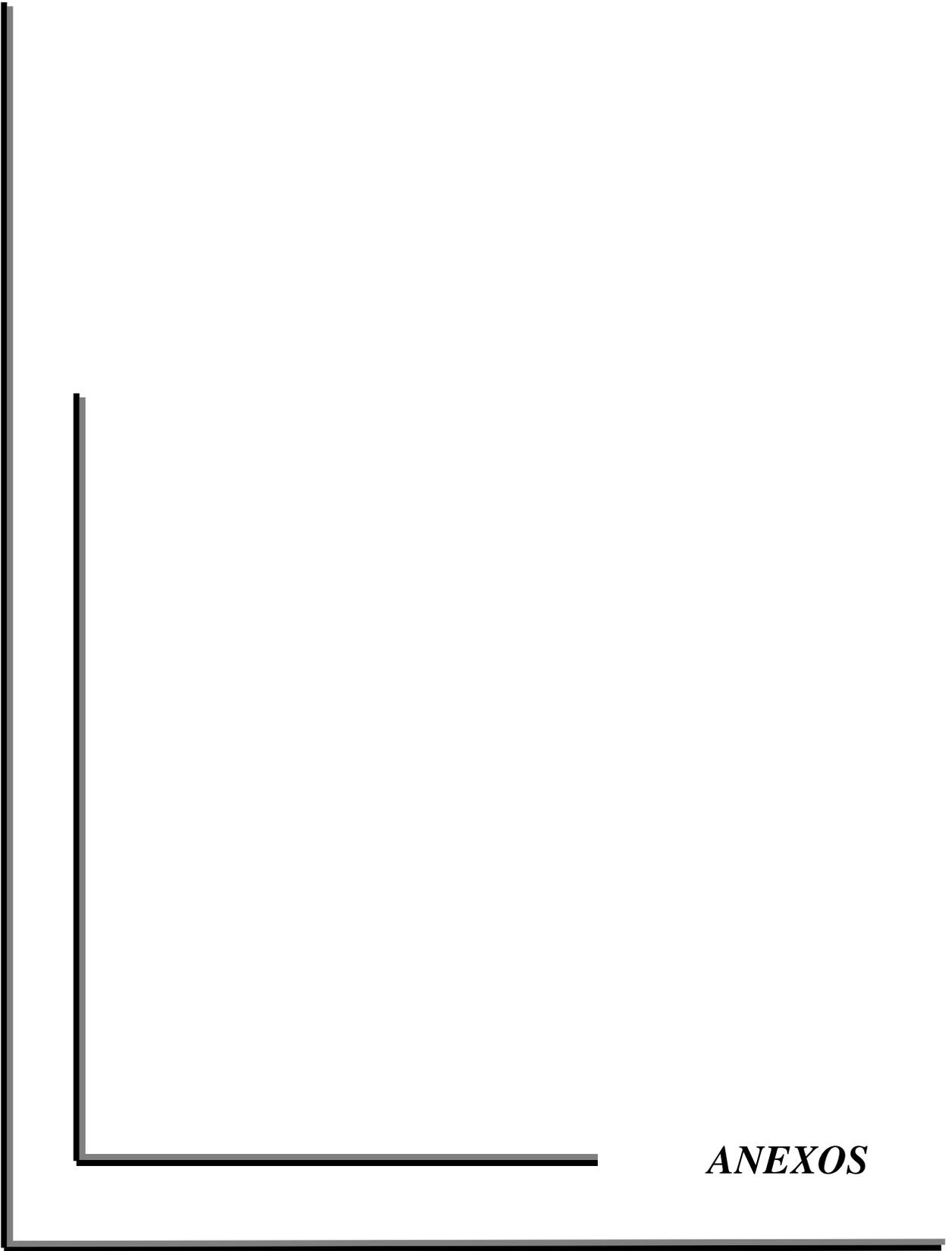
NORDLUND J.J.; LERNER A.B. Vitiligo – It is important (Editorial). **Arch Dermatol**, 118: 5-8, 1982.

SHARMA S.K. Vitiligo. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, 54: 99-201, 1988.

WESTERHOF W. Vitiligo – A window in the darkness. **Dermatology**, 190: 181-2, 1995.

XUNQUAN L.; CHANGGENG S.; PEIYING J. Treatment of localized vitiligo with ulobetasol cream. **Int J Dermatol**, 29: 295-7, 1990.

ZACHARIAE H.; ZACHARIAE C.; DELEURAN B. Autotransplantation in vitiligo: treatment with epidermal grafts and cultured melanocytes. **Acta Derm Venereol (Stockh)**, 73: 46-8, 1993.



*ANEXOS*

## **Anexo 1 – Protocolo de inclusão**

CASO N°

NOME :

H.C. :

IDADE :                      SEXO :                      FOTOTIPO:

VITILIGO ESTÁVEL HÁ                      ANOS.

TRATAMENTOS ANTERIORES :

TIPO DE VITILIGO :

EXAMES LABORATORIAIS:

ÁREAS ACOMETIDAS :

ÁREA DOADORA :

ÁREAS RECEPTORAS :

PROCEDIMENTO REALIZADO EM :    /    /    (1º dia)

BOLHAS Nitrogênio líquido :    TEMPO de CONGELAMENTO:

TEMPO de DESCONGELAMENTO:

INTERVALO DE TEMPO ATÉ APARECIMENTO DA BOLHA:

PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS : N° TOTAL DE CÉLULAS:

{                      }P/ CULTURA

{                      }P/ POOL DE CÉLULAS

DURAÇÃO DAS BOLHAS :

INÍCIO DA REPIGMENTAÇÃO {           dias} P/ CULTURA

{           dias} P/ POOL DE CÉLULAS

OBS. :

## **Anexo 2 – Aprovação da Comissão de Ética**

(Documento original em posse da pesquisadora)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER: N<sup>o</sup> 121/98

**PESQUISA:** COMPORTAMENTO DO TRANSPLANTE DE MELANÓCITOS NO TRATAMENTO DO VITILIGO: UM PROGRESSO TERAPÊUTICO?

**PESQUISADOR:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Beatriz Puzzi Taube

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, após acatar os pareceres dos membros-relatores, aprova a pesquisa supracitada bem como o Consentimento Pós Informação por estarem contempladas as Resoluções 196/96 e 251/97.

CEP/FCM, 25/09/98

Prof. Dr. FORTUNATO ANTONIO BADAN PALHARES

PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

FCM/ UNICAMP

### **Anexo 3 – Informação sobre o projeto e termo de consentimento pós- informado**

Este estudo propõe uma nova opção terapêutica para o vitiligo.

É uma proposta cirúrgica, que envolve os riscos inerentes a uma cirurgia de pequeno porte, sob anestesia local, bem como riscos de alterações de cicatrização pela crioterapia.

Você receberá antibioticoterapia profilática.

Serão utilizadas quatro diferentes técnicas, que não serão de seu conhecimento.

Os resultados permanecem em aberto, por tratar-se de técnicas novas e recentes. A expectativa do tratamento é a de que haja repigmentação.

Será retirado fragmento de pele sã, que servirá como área doadora.

Todas as suas dúvidas serão esclarecidas previamente.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA O PACIENTE DO PROJETO:  
COMPORTAMENTO DO TRANSPLANTE DE MELANÓCITO NO TRATAMENTO  
DE VITILIGO: UM PROGRESSO TERAPÊUTICO?

Eu li as informações acima e entendi o propósito do estudo, bem como os riscos e benefícios potenciais de minha participação neste estudo. Eu tenho a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas perguntas têm sido respondidas de maneira que eu entenda.

Eu entendo que posso descontinuar minha participação deste estudo a qualquer tempo e que ao fazê-lo não estarei afetando meus cuidados médicos futuros.

A minha assinatura a seguir indica que eu consenti voluntariamente minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia deste consentimento informado.

Eu concordo em participar do projeto acima citado.

Nome do paciente:

R.G. n°

DN:

Endereço:

HC n°:

Assinatura do paciente:

data:

Eu, abaixo assinado, expliquei e discuti integralmente os detalhes relevantes deste estudo com o paciente acima citado e/ou com seu representante legal, usando uma linguagem compreensível e apropriada. Eu acredito ter informado completamente o participante da natureza deste estudo e seus possíveis benefícios e riscos e acredito que o paciente tenha entendido esta explicação.

Nome do médico investigador:

Assinatura do médico investigador:

Data:-----/-----/-----

## Anexo 4 - Análise estatística dos dados

### 1. Estatísticas descritivas e gráficos

Tabela 1 - Estatísticas descritivas para as áreas das lesões por produto no tempo T0

TEMPO=0						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	5.9843250	5.7042938	0.7209543	17.9037700	3.1893540
CC	11	9.5773406	7.6903029	1.7926740	25.9799200	8.6959260
CM	11	10.3033517	13.0717260	1.1977320	42.4696800	5.0655850
QM	11	10.6596310	6.9902660	3.6698630	28.7525400	9.8428780

Tabela 2 - Estatísticas descritivas para as áreas das lesões por produto no tempo T30

TEMPO=30						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	5.9617621	5.7240746	0.6788498	18.2890100	3.0246120
CC	11	9.2289047	7.5838622	1.6940926	25.7553815	8.3726202
CM	11	10.2472984	13.0595189	1.1644030	42.4399200	5.0673970
QM	11	10.2419822	6.7004521	3.6668720	27.1410960	9.3078456

Tabela 3 - Estatísticas descritivas para as áreas das lesões por produto no tempo T60

TEMPO=60						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	5.9654818	5.6604568	0.7186867	17.8920600	3.1675740
CC	11	8.3466265	7.4691150	0.6969112	25.7464494	5.4750281
CM	11	10.3374179	13.2145820	1.0659810	42.9184500	5.1549870
QM	11	9.0156810	4.9096800	3.5723594	19.3673930	7.9499590

Tabela 4 - Estatísticas descritivas para as áreas das lesões por produto no tempo T90

TEMPO=90						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	5.9716245	5.7753495	0.7315676	18.5247700	3.0908900
CC	11	7.3452690	7.2050506	0.5316174	24.0976869	4.7767337
CM	11	10.2470175	13.0818975	1.0692040	42.3444700	5.0734880
QM	11	8.2116109	4.1654513	2.9556379	15.0716720	7.5161080

Tabela 5 - Estatísticas descritivas para as porcentagens de redução das áreas lesionadas por produto do tempo 30 em relação ao inicial.

----- TEMPO=30 -----						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	0.0617625	4.3427581	-9.9763657	5.8401066	-0.1272899
CC	11	5.3235395	5.5555339	-3.2361211	18.7584924	4.5294962
CM	11	1.2818629	2.3682683	-1.1882458	7.7357115	0.5711492
QM	11	4.2142915	5.0051274	-1.1374729	15.8692318	2.1532784

Tabela 6 - Estatísticas descritivas para as porcentagens de redução das áreas lesionadas por produto do tempo 60 em relação ao inicial.

----- TEMPO=60 -----						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	-0.6751890	3.6667067	-10.7659838	2.6674811	0.3145276
CC	11	16.9324582	21.6569391	-8.7816301	67.9836746	12.0146896
CM	11	0.8673905	5.3187338	-5.7550437	15.5344168	-0.3657115
QM	11	12.5057230	9.0495343	2.6568730	32.6411058	11.7611056

Tabela 7 - Estatísticas descritivas para as porcentagens de redução das áreas lesionadas por produto do tempo 90 em relação ao inicial.

----- TEMPO=90 -----						
TRAT	N Obs	Média	D.Padrão	Min	Max	Mediana
AC	11	-0.2804397	4.1202390	-10.8702511	4.4889003	0.5812220
CC	11	29.5495382	25.4515283	-2.0643575	75.5773251	20.4990104
CM	11	1.9821415	4.5725364	-0.8952457	15.2790346	0.2948221
QM	11	19.5731850	11.5925560	6.8606819	47.5814241	16.1075821

Gráfico das Médias

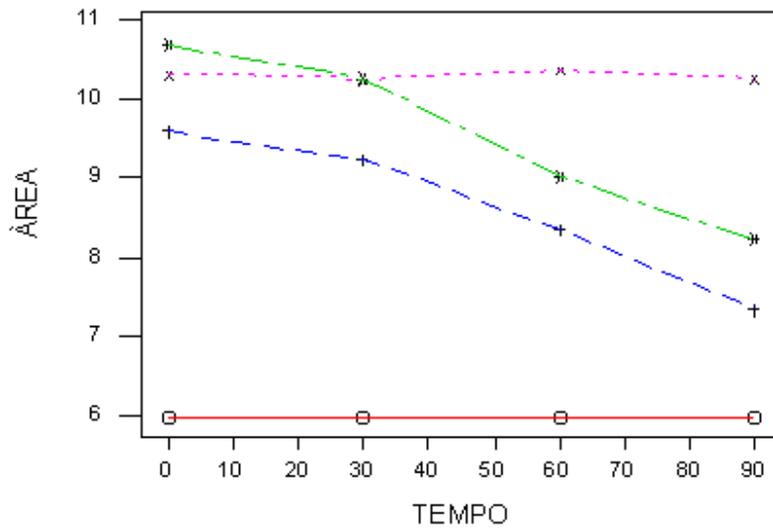


Figura 1 - Gráfico das áreas médias das lesões em  $\text{cm}^2$  por tratamento ao longo do tempo. Em vermelho tem-se o tratamento AC, em azul o tratamento CC, em verde o tratamento QM e em rosa o tratamento CM.

Gráfico das Médias

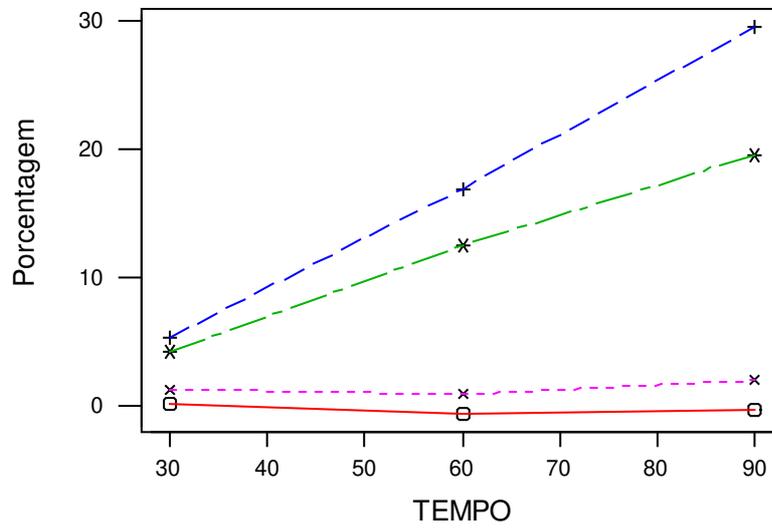


Figura 2 - Gráfico das médias das porcentagens de redução das áreas lesionadas em relação ao inicial em cada tempo por tratamento. Em vermelho tem-se o tratamento AC, em azul o tratamento CC, em verde o tratamento QM e em rosa o tratamento CM.

**2. Comparação das médias das áreas lesionadas para cada tratamento individualmente nos tempos analisados em relação ao inicial**

Statistics								
Variable	N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev	Upper CL Std Dev	Std Err
DACT30	11	-0.15	-0.023	0.1053	0.133	0.1904	0.3341	0.0574
DCCT30	11	-0.696	-0.348	-88E-5	0.3615	0.5173	0.9079	0.156
DCMT30	11	-0.101	-0.056	-0.012	0.0462	0.0662	0.1161	0.02
DQMT30	11	-0.759	-0.418	-0.076	0.355	0.5081	0.8916	0.1532
DACT60	11	-0.088	-0.019	0.0505	0.0721	0.1032	0.1811	0.0311
DCCT60	11	-2.153	-1.231	-0.308	0.9597	1.3735	2.4104	0.4141
DCMT60	11	-0.087	0.0341	0.1555	0.1263	0.1808	0.3173	0.0545
DQMT60	11	-3.403	-1.644	0.1155	1.83	2.619	4.5963	0.7897
DACT90	11	-0.183	-0.013	0.1573	0.1768	0.2531	0.4442	0.0763
DCCT90	11	-3.521	-2.232	-0.943	1.3406	1.9186	3.3671	0.5785
DCMT90	11	-0.156	-0.056	0.0429	0.1033	0.1478	0.2593	0.0446
DQMT90	11	-4.971	-2.448	0.0751	2.6242	3.7557	6.591	1.1324

T-Tests			
Variable	DF	t Value	Pr >  t
DACT30	10	-0.39	0.7025
DCCT30	10	-2.23	0.0495
DCMT30	10	-2.81	0.0185
DQMT30	10	-2.73	0.0213
DACT60	10	-0.61	0.5583
DCCT60	10	-2.97	0.0140
DCMT60	10	0.62	0.5460
DQMT60	10	-2.08	0.0640
DACT90	10	-0.17	0.8711
DCCT90	10	-3.86	0.0032
DCMT90	10	-1.26	0.2348
DQMT90	10	-2.16	0.0559

### 3. Comparando os tratamentos nos tempos em relação a porcentagem de redução das áreas lesionadas

```

The GLM Procedure
Class Level Information
Class          Levels    Values
TRAT           4         AC CC CM QM
VOL            11        1 2 3 4 5 6 7 8 9 11 12

Number of observations    44

The GLM Procedure
Repeated Measures Analysis of Variance
Repeated Measures Level Information
Dependent Variable      T30      T60      T90
Level of time           30      60      90

Partial Correlation Coefficients from the Error SSCP Matrix / Prob > |r|

DF = 30          T30          T60          T90
T30              1.000000      0.346103      0.315946
                  0.0565          0.0834
T60              0.346103      1.000000      0.880555
                  0.0565          <.0001
T90              0.315946      0.880555      1.000000
                  0.0834          <.0001

E = Error SSCP Matrix
time_N represents the contrast between the nth level of time and the last

          time_1      time_2
time_1    5264.6      1506.4
time_2    1506.4      1326.7

Partial Correlation Coefficients from the Error SSCP Matrix of the
Variables Defined by the Specified Transformation / Prob > |r|

DF = 30          time_1      time_2
time_1          1.000000      0.569996
                  0.0008
time_2          0.569996      1.000000
                  0.0008

```

The GLM Procedure  
 Repeated Measures Analysis of Variance

The GLM Procedure  
 Repeated Measures Analysis of Variance  
 Tests of Hypotheses for Between Subjects Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	3	7088.763017	2362.921006	9.99	0.0001
VOL	10	2642.074357	264.207436	1.12	0.3819
Error	30	7094.078097	236.469270		

The GLM Procedure  
 Repeated Measures Analysis of Variance  
 Univariate Tests of Hypotheses for Within Subject Effects

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F	Adj Pr > F	
						G - G	H - F
time	2	2196.471199	1098.235599	19.44	<.0001	<.0001	<.0001
time*TRAT	6	2343.485660	390.580943	6.91	<.0001	0.0002	<.0001
time*VOL	20	1804.781982	90.239099	1.60	0.0837	0.1220	0.0837
Error(time)	60	3389.929109	56.498818				

Greenhouse-Geisser Epsilon      0.6883  
 Huynh-Feldt Epsilon            1.0231

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for T30

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	19.14416
Critical Value of Studentized Range	3.84540
Minimum Significant Difference	5.073

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	5.324	11	CC
A			
B A	4.214	11	QM
B A			
B A	1.282	11	CM
B A			
B	0.062	11	AC

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for T60

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	135.378
Critical Value of Studentized Range	3.84540
Minimum Significant Difference	13.49

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	16.932	11	CC
A			
B A	12.506	11	QM
B			
B	0.867	11	CM
B			
B	-0.675	11	AC

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for T90

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	30
Error Mean Square	194.9447
Critical Value of Studentized Range	3.84540
Minimum Significant Difference	16.188

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	29.550	11	CC
A			
A	19.573	11	QM
B	1.982	11	CM
B			
B	-0.280	11	AC