

Fátima Regina Vilani-Moreno¹
Heloísa Cristina Quatrini Carvalho
Passos Guimarães²

Sidinéia Raquel Bazalia Bassoli³

Roseli Marega Oda⁴

Érika Mozer⁵

Wladimir Fiori Bonilha Delanina⁶

Maria Ângela Bianconcini Trindade⁷

Joel Carlos Lastória⁸

Norma Gondim Cleto⁹

ARTIGO ORIGINAL

IMPLANTE DE QUERATINÓCITOS AUTÓLOGOS EM ÚLCERAS DE MEMBROS INFERIORES DE PACIENTES COM SEQÜELAS DE HANSENÍASE

RESUMO

Na hanseníase as úlceras podem surgir, principalmente, pelo fato de existirem áreas anestésicas, que com facilidade podem ser traumatizadas, queimadas e secundariamente infectadas. Este estudo teve por objetivo tratar as úlceras de membro inferior de pacientes com seqüelas de hanseníase por meio do implante de queratinócitos autólogos. Participaram 14 pacientes, sendo seis com uma única úlcera, quatro com mais de uma úlcera no mesmo membro inferior e quatro com úlceras nos dois membros, totalizando 31 úlceras. Um fragmento de pele sadia foi coletado e submetido à digestão enzimática para obtenção dos queratinócitos, que foram cultivados em meio específico, por quatro semanas. Os queratinócitos foram implantados nas úlceras em associação com cola de fibrina, as quais foram acompanhadas semanalmente, por dois meses. As úlceras cujas medidas eram \leq a 9,0 cm de altura x 5,0 cm de largura (total de 23 úlceras) tiveram redução de tamanho em $68,8 \pm 27,1\%$, sendo que nove delas apresentaram cicatrização total; àquelas com tamanho su-

Vilani-Moreno FR, Guimarães HCP, Bassoli SRB, Oda RM, Mozer E, Delanina WFB, Trindade MAB, Lastória JC, Cléto NG. Implante de queratinócitos autólogos em úlceras de membros inferiores de pacientes com seqüelas de hanseníase. *Hansen Int* 2012; 37(1): 11-18.

perior a esta medida diminuíram $50,0 \pm 31,9\%$, sendo que duas cicatrizaram totalmente. Assim, o implante de queratinócitos autólogos em associação com cola de fibrina se mostrou eficaz na cicatrização e/ou redução do tamanho das úlceras e constitui mais uma opção de tratamento para úlceras de pacientes com seqüelas de hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase; queratinócitos; úlceras; cola de fibrina.

INTRODUÇÃO

As úlceras cutâneas, particularmente as de membros inferiores, independentemente de sua etiologia causam grande sofrimento e comprometem, sobretudo, a

Recebido em: 18/06/ 2012

Aceito em: 01/09/ 2012

Publicado em: 10/08/2013

1 PhD, Pesquisadora Científica, Equipe Técnica de Biologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. fmoreno@iisl.br

2 PhD, Pesquisadora Científica, Equipe Técnica de Clínica e Terapêutica, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. clinicapes@iisl.br

3 MSc, Enfermeira, Divisão de Enfermagem, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. silvissoli@ig.com.br

4 MSc, Enfermeira, Divisão de Enfermagem, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. enfermagem@iisl.br

5 BS, Biologista, Equipe Técnica de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. emozermoz@yahoo.com.br

6 MD, Médico Dermatologista, Divisão de Dermatologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. wldelanina@uol.com.br

7 MD, PhD, Pesquisadora Científica, Instituto de Saúde e Divisão de Clínica Dermatológica, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina-USP, São Paulo, SP. angelatrindade@uol.com.br

8 MD, PhD, Professor, Departamento de Dermatologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP. lastoria@fmb.unesp.br

9 MD, Médica Dermatologista, Divisão de Dermatologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. normagc@uol.com.br

Correspondência para: Fátima Regina Vilani Moreno, Instituto Lauro de Souza Lima, Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, Km 225/226, 17034-971 Bauru, SP, Brasil. Fone: 14 31035912 Fax: 14 31035914. E-mail: fmoreno@iisl.br

Apoio financeiro: CNPq e Fundação Paulista contra a Hanseníase.

qualidade de vida dos pacientes e de seus familiares.¹ Os membros inferiores são locais de diferentes tipos de úlceras devido ao fato de estarem expostos, com frequência, a traumas e por terem uma circulação dificultada pela postura ereta do ser humano. Em particular, com relação à hanseníase, as úlceras podem surgir, principalmente, pelo fato de existirem áreas anestésicas, que com facilidade podem ser traumatizadas, queimadas e secundariamente infectadas.²

Segundo De Las Aguas,³ em torno de 1,8 milhões de pacientes com hanseníase apresentam incapacidades físicas e muitos deles possuem úlceras recorrentes em membros inferiores. Na forma virchoviana, entretanto, as úlceras assumem um aspecto particular, pois nesses pacientes a pele das pernas apresenta-se infiltrada de maneira mais ou menos intensa e pode haver a presença de pápulas, nódulos e hansenomas. Tanto as infiltrações difusas, como os hansenomas, podem ulcerar devido ao bloqueio dos vasos sanguíneos pelo infiltrado inflamatório que contém grande quantidade de macrófagos com bacilos no seu interior. Também nessa forma da hanseníase, nos casos avançados, as veias superficiais podem estar completamente obstruídas pelo infiltrado virchoviano, chegando a ocorrer uma panflebite específica. Além disso, há frequentemente alterações neurológicas nos membros inferiores, levando ao comprometimento da sudorese da região e certo grau de alteração da circulação nos pequenos vasos dérmicos, o que contribui para o aparecimento de úlceras.²

O tratamento cirúrgico das úlceras inclui os auto-enxertos que, muitas vezes, requer grandes extensões de pele da área doadora, limitando, assim, o seu emprego. Através de avanços tecnológicos, tornou-se possível o cultivo em laboratório de quantidades teoricamente ilimitadas de um substituto cutâneo, a partir de uma pequena amostra de pele.⁴⁻⁶ Neste sentido, pesquisadores têm empregado, com sucesso, queratinócitos obtidos de cultura na restauração de lesões de pele.^{4, 7, 8} Estas células podem ser cultivadas sobre um substrato, que pode ser derme humana acelular ou filme transparente, flexível e não-reativo, ou ainda, as células podem ser cultivadas isoladamente e após, serem implantadas sobre as úlceras juntamente com cola de fibrina.^{7,9,10}

Para o tratamento das úlceras em pacientes com hanseníase deve-se levar em consideração que se trata de um processo multifatorial. Assim, o tratamento deve se basear na identificação destes fatores e na sua eliminação. Apesar de existirem muitas substâncias tóxicas, coberturas sofisticadas e técnicas cirúrgicas diversas, o tratamento deve ser multidisciplinar e individualizado. Deste modo, este estudo teve por finalidade empregar uma técnica alternativa para o tratamento das úlceras de membros inferiores de pacientes com seqüelas de hanseníase visando à cicatrização das mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística: participaram deste estudo 14 pacientes com úlceras crônicas de membros inferiores atendidos no ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru (SP), no período compreendido entre Março/2007 e Fevereiro/2009. Dos 14 pacientes, 10 (71%) eram do sexo masculino com idades variando de 28 a 74 anos (média de 51 anos) e quatro (29%) eram do sexo feminino, com idades variando de 55 a 75 anos (média de 63 anos). Todos os pacientes já haviam concluído o tratamento específico para hanseníase e apresentavam seqüelas da doença; destes, nove tiveram a forma clínica virchoviana e cinco eram dimorfos. O tempo médio de evolução das úlceras foi de 10,5 anos, sendo 10 anos para o sexo masculino e 11 anos para o feminino. Dos 14 pacientes avaliados, seis apresentavam uma única úlcera, quatro apresentavam mais de uma úlcera no mesmo membro inferior e quatro pacientes apresentavam úlceras nos dois membros, totalizando 31 úlceras. Como critério de inclusão, os pacientes não apresentavam comprometimento arterial no membro inferior acometido pela úlcera. Antes de receberem o implante, as úlceras foram avaliadas e preparadas de modo que não estivessem infectadas e que se procedesse ao debridamento de tecidos desvitalizados, se necessário. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima. Somente foram incorporados ao estudo os pacientes que concordaram em participar da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Coleta de pele e preparo das amostras para cultura:

um fragmento de pele sadia da região abdominal foi obtido de cada paciente e submetido à digestão enzimática para obtenção dos queratinócitos. Resumidamente, as amostras foram lavadas em solução salina 0,9% acrescida de antibiótico-antimicótico (100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B – Gibco, Grand Island, NY, USA) e, após a remoção do tecido adiposo, a derme/epiderme foi cortada em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm. Os fragmentos foram colocados em placa de Petri com solução de tripsina-EDTA (Gibco) e incubados por 4 h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. A seguir, a tripsina foi neutralizada pela adição de soro fetal bovino (Gibco) e o sobrenadante foi recolhido, filtrado em filtro de nylon de 40 µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA) e, então, centrifugado a 1500 rpm por 10 min. As células foram lavadas 1 vez com solução salina 0,9% e o botão celular ressuspenso em solução salina. A contagem do número total de células foi realizada por meio de uma diluição 1:2 com corante Turck a 5% em ácido acético glacial a 4% e sua viabilidade foi determinada mediante uma diluição 1:2 com corante azul Tripan a 0,1% em solução salina tamponada pH 7,2.

Cultura de queratinócitos: a concentração de células foi ajustada para 1×10^6 /ml, em meio de cultura para queratinócitos (Keratinocyte-SFM - Gibco), suplementado com L-glutamina 2mM/ml, 5 ng/ml de fator de crescimento epidermal, 50 µg/ml de extrato pituitário bovino, soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina (100 UI/ml)-estreptomicina (100 µg/ml). A seguir, as células foram plaqueadas em frascos de cultura celular de 25 cm² (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após adesão das células, o meio foi removido e substituído a cada 2 dias. Quando as culturas de células estavam confluentes (cerca de 4 semanas), as células foram removidas dos frascos de cultivo para serem enxertadas na úlcera do paciente.

Obtenção dos queratinócitos pós-cultivo: após remoção do meio de cultura, foi adicionada solução de tripsina-EDTA. Os frascos foram incubados a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 5 min e, em seguida, a tripsina foi neutralizada com soro fetal bovino. Os queratinócitos foram recolhidos, centrifugados e lavados, 1 vez, com solução salina 0,9%; após este procedimento, foram ressuspensos em 1 ml de trombina (um dos componentes do kit da cola de fibrina), e o número total de células e sua viabilidade foram novamente determinados. Após reconstituição do fibrinogênio, outro componente da cola de fibrina, o kit de aplicação (Conjunto Pantaject®) estava pronto para ser aplicado sobre a úlcera do paciente.

Implante de queratinócitos nas úlceras: antes dos pacientes receberem o implante, as úlceras foram ava-

liadas quanto ao aspecto e tamanho e, em seguida, foram fotografadas. As células foram enxertadas na úlcera em associação com a cola de fibrina (Beriplast®-P, ZBL Behring GmbH, Marburg, Germany) e, a seguir, a úlcera foi coberta com curativo não aderente Adaptic (Johnson & Johnson) e bota de Unna (ConvaTec, Bristol-Myers Squibb, NY, USA), conforme descrito por Phillips *et al.*¹¹ Foi recomendado ao paciente ficar em repouso por 24 h.

Seguimento do paciente: semanalmente, as úlceras foram submetidas à limpeza com soro fisiológico 0,9%, mensuração do tamanho por meio de régua de papel estéril e documentação fotográfica. As úlceras eram cobertas com curativo Adaptic e bota de Unna. Os pacientes foram acompanhados por dois meses. O implante de células foi repetido em três pacientes com úlcera extensa e que concordaram em receber novo implante; neste caso os mesmos procedimentos foram realizados e a úlcera foi avaliada por mais dois meses empregando os mesmos parâmetros.

RESULTADOS

Os resultados do implante de queratinócitos estão sumarizados na Tabela 1. Como pode ser observado, as úlceras cujas medidas eram \leq a 9,0 cm de altura x 5,0 cm de largura (total de 23 úlceras) tiveram redução de tamanho em $68,8 \pm 27,1\%$ (mediana 64%), sendo que nove delas apresentaram cicatrização total; àquelas com tamanho superior a esta medida diminuíram $50,0 \pm 31,9\%$ (mediana 36%), sendo que duas cicatrizaram totalmente.

Tabela 1 Evolução das úlceras de pacientes com seqüelas de hanseníase após 2 meses do implante de queratinócitos.

Nº. Paciente/ Forma Clínica	Idade (anos)	Localização/ Nº. de úlceras	Medida Inicial (altura x largura) (cm)	Medida Final (altura x largura) (cm)	% de Redução
01/HV	74	MIE/02	6,0 x 4,0	2,0 x 1,5	65
			13,5 x 7,5	9,0 x 4,5	37
02/HV	60	MID/01	5,0 x 3,0	cicatrização	100
03/HD*	56	MIE/01	21,0 (circular e irregular)	16,0	24
04/HV	55	MID/01	11,0 x 4,5	cicatrização	100
05/HD	28	MIE/01	7,5 x 2,0	cicatrização	100
		MID/01	14,5 x 10,0	7,4 x 5,0	50
06/HD	45	MIE/02	1,5 x 2,0	1,0 x 0,8	47
			4,5 x 2,0	3,0 x 1,0	42
07/HV	65	MID/01	2,0 x 4,0	1,0 x 3,0	38
08/HD	48	MIE/01	10,3 x 7,3	6,5 x 6,0	28
09/HV	75	MIE/01	1,6 x 2,2	1,0 x 0,9	48
10/HD	56	MIE/03	2,0 x 2,0	cicatrização	100
			12,0 x 2,5	cicatrização	100
			5,0 x 8,0	2,5 x 1,8	64
11/HV*	42	MIE/03	3,5 x 0,5	cicatrização	100
			4,0 x 5,0	1,0 x 2,0	68
			5,0 x 5,0	2,0 x 2,0	60
		MID/01	16,0 cm (circular)	10,5	35
12/HV	62	MIE/04	2,0 x 2,5	cicatrização	100
			3,5 x 1,0	cicatrização	100
			1,5 x 0,8	cicatrização	100
			3,0 x 1,4	cicatrização	100
		MID/02	8,5 x 5,0	2,4 x 3,8	50
5,5 x 5,0	3,5 x 1,8	50			
13/HV*	40	MIE/02	2,0 x 3,5	cicatrização	100
			3,0 x 3,0	2,0 x 2,0	33
		MID/01	13,5 cm (circular)	10,0	26
14/HV	60	MID/03	6,0 x 2,0	3,5 x 1,0	46
			5,5 x 4,0	2,8 x 3,0	37
			6,2 x 6,0	5,0 x 3,0	35

HV= hanseníase virchoviana; HD= hanseníase dimorfa; MID= membro inferior direito; MIE= membro inferior esquerdo.

* paciente submetido a dois implantes de células.

A figura 1 ilustra a úlcera de um paciente antes do implante e 2 meses após este procedimento.

O tamanho médio das úlceras antes do implante, no sexo masculino, foi de 6,0 x 4,2 cm, enquanto no sexo feminino foi de 4,9 x 3,1 cm, não levando em consideração as três úlceras circulares e irregulares. Após 2 meses de implante as medidas passaram para 1,8 x 1,7 cm nos homens e 1,7 x 1,2 cm nas mulheres, com percentual de redução de 65 e 63%, respectivamente.

A associação entre idade dos pacientes e evolução das úlceras após 2 meses de implante revelou que a cicatrização total ocorreu em 11 pacientes com idades variando de 28 a 68 anos (Tabela 2). Com relação ao tempo de evolução das úlceras antes do implante e sua evolução pós-implante, os resultados revelaram que das 11 úlceras cicatrizadas, cinco delas ocorreram em pacientes que possuíam úlceras por um período de até 5 anos, duas até 10 anos e quatro em pacientes com período maior que 19 anos (Tabela 3).



Figura 1 Úlcera em membro inferior de paciente com seqüela de hanseníase que recebeu implante de queratinócitos. **A.** Antes do implante. **B.** 2 meses pós-implante – 100% de cicatrização

Tabela 2 Associação entre idade dos pacientes e evolução das úlceras em membros inferiores pós-implante em pacientes com seqüelas de hanseníase.

Idade (anos)	Nº. de Úlceras		
	Cicatrizadas	Diminuídas - % de Redução	
28-48	3	9	43,2
49-68	8	8	43,0
> 70	0	3	50,0

Tabela 3 Associação entre tempo de evolução das úlceras antes do implante e sua evolução após 2 meses do implante em pacientes com seqüelas de hanseníase.

Tempo de Evolução (anos)	Nº. de Úlceras		
	Cicatrizadas	Diminuídas - % de Redução	
3-5	5	3	54,0
8-10	2	9	41,7
> 19	4	8	43,1

Os pacientes que receberam dois implantes apresentavam úlceras extensas e irregulares, envolvendo quase que toda a circunferência da perna. Nesses pacientes o percentual de redução do tamanho das úlceras foi de 28%.

DISCUSSÃO

Tendo em vista que um grande número de pessoas com hanseníase, na maioria das vezes já tratadas, pode apresentar úlceras em membros inferiores como seqüelas da doença, e que, devido à cronicidade dessas úlceras, o tempo de cicatrização é longo, realizamos este estudo com a finalidade de empregar uma técnica alternativa no tratamento de úlceras de membros inferiores visando a sua cicatrização.

Neste estudo, a maioria dos pacientes que foram submetidos ao implante de células pertencia à forma clínica virchoviana (64%). Dados de literatura revelam que nossa casuística é semelhante àquelas descritas por Siddiqui *et al.*¹² e Salazar *et al.*¹³ que encontraram 54,7% e 95,4%, respectivamente, de úlceras em pacientes virchovianos. Esses achados devem-se, possivelmente, ao fato desses pacientes apresentarem infiltrações difusas que ulceram devido ao bloqueio dos vasos sangüíneos pelo infiltrado inflamatório, que contem grande quantidade de macrófagos com bacilos no seu interior, bem como pelo comprometimento neural nas formas mais avançadas da doença.^{2,3}

Dos pacientes avaliados, 21% apresentavam outras doenças sistêmicas associadas, como hipertensão arterial e *diabetes mellitus*, que poderiam interferir no processo de cicatrização. Entretanto, esses pacientes tiveram 49% de redução de suas úlceras e a cicatrização de cinco delas, discordando dos achados de Nelzén *et al.*,¹⁴ que verificaram o agravamento das úlceras de membros inferiores em pacientes com seqüelas de hanseníase e doenças associadas.

Com relação à idade dos pacientes, pesquisadores sugerem que a idade avançada pode ser um dos elementos que dificultam a cicatrização, contribuindo para o agravamento do quadro.^{15,16} Em nosso estudo, a faixa etária variou de 28 a 75 anos e o percentual de redução do tamanho das úlceras foi semelhante em todas as faixas etárias, além disso, o número de úlceras cicatrizadas foi elevado na faixa etária de 49 a 68 anos. Nossos resultados são semelhantes aos descritos por Trier *et al.*,¹⁷ que não observaram diferença estatística em pacientes submetidos a enxertos de diferentes etiologias, nas diferentes faixas etárias. Em estudo semelhante, Ceilley *et al.*¹⁸ também não encontraram correlação entre idade avançada e não diminuição do diâmetro de feridas pós-enxerto.

Ainda considerando o fator idade, Phillips *et al.*¹¹ relataram que queratinócitos cultivados *in vitro*, de indivíduos acima de 60 anos, crescem mais lentamente e a

confluência das células na cultura pode não acontecer. Eles relataram, também, que a sobrevida é mais curta e a resposta a mitógenos é menor e sugeriram que essas características tendem a persistir após a enxertia sobre o leito da ferida. Em nosso estudo tivemos quatro pacientes com idade acima de 60 anos, sendo que um deles teve a cicatrização total de quatro úlceras e nos demais o percentual de redução foi de 48%. Quanto ao cultivo dos queratinócitos, não observamos diferenças em relação às outras culturas de pacientes com idade inferior a 60 anos.

O implante de células da pele tem sido empregado em úlceras de diversas etiologias, com sucesso.^{7,11,19} Até o momento, não existem relatos na literatura a respeito do emprego de células autólogas da pele, cultivadas *in vitro*, no tratamento de úlceras crônicas de pacientes com seqüelas de hanseníase. Neste estudo nós optamos por implantar as células, pós-cultivo, diluídas em cola de fibrina utilizando, para tanto, um kit comercial conforme metodologia empregada por Siedler & Schüller-Petrovic⁹ e Puzzi *et al.*¹⁰ Esses autores relataram sucesso no tratamento de úlcera arteriovenosa e de paciente com anemia falciforme, respectivamente, empregando as células ressuspensas neste veículo.

A cola de fibrina é composta pelo fibrinogênio e fator XIII reconstituídos em solução de aprotinina, que é um agente antifibrinolítico; o outro componente é a trombina, reconstituída em cloreto de cálcio, e que leva a rápida solidificação da cola. O princípio da cola é baseado no estágio final da coagulação, onde o fibrinogênio e a trombina formam um coágulo de fibrina, estável, na presença do fator XIII e íons cálcio.⁹

O processo de cicatrização é um evento biológico complexo, que envolve a migração e proliferação celular, angiogênese, remodelamento da matriz extracelular e reepitelização, além da participação dos fatores de crescimento e citocinas.^{19,20} Neste contexto, podemos citar os fatores de crescimento epidermal (EGF), de fibroblastos (FGF), de queratinócitos (KGF) e o derivado de plaquetas (PDGF) que estimulam a proliferação e diferenciação celular²¹; além de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que estimulam a expressão do KGF e a proliferação de queratinócitos e fibroblastos. Além disso, a presença do fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) é também crucial no processo de cicatrização, pois induz a angiogênese, é quimiotático para fibroblastos e estimula a síntese de colágeno e de fibronectina.¹⁹

Em nosso estudo não avaliamos a participação de citocinas e dos fatores de crescimento nas úlceras dos pacientes, antes e após a realização do implante. É possível que as diferenças observadas na redução ou cicatrização das úlceras entre um paciente e outro possam estar relacionadas a esses fatores e isto poderá ser objeto de

estudo futuro. Cabe salientar que existem estudos sugerindo que o tempo de evolução das úlceras pode ser um dos fatores que dificulte sua cicatrização, uma vez que úlceras crônicas podem ser caracterizadas por altas concentrações de enzimas proteolíticas com prevalência de fibroblastos velhos e com baixa capacidade de replicação, além de uma deficiência no recrutamento de queratinócitos para cobrir o leito da ferida.^{19, 22, 23} Em nosso estudo, analisando os resultados individualmente, observamos que o tempo de evolução das úlceras não parece ter influenciado a redução de tamanho ou até mesmo a cicatrização. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Kunst¹⁵ que também não encontrou diferença significativa entre diminuição do diâmetro da úlcera e tempo de evolução da mesma em pacientes com seqüelas de hanseníase.

No presente estudo, três pacientes que apresentavam úlceras extensas e circulares foram submetidos a dois implantes de células e o percentual de redução foi de 28%. Julgamos que nos casos de úlceras grandes, como essas estudadas por nós, é necessário a realiza-

ção de novos implantes, conforme descrito por Villeneuve *et al.*⁷ Esses autores relataram o fechamento de uma úlcera com 32 cm² de área, em paciente com artrite reumatóide, após a realização de quatro implantes de células.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, em que verificamos a cicatrização total de 35,5% das úlceras e a redução em até 50% de tamanho de 22,5% delas, sugerimos que o implante de queratinócitos autólogos, em associação com cola de fibrina, se mostrou eficaz na cicatrização e/ou redução do tamanho das úlceras e constitui mais uma opção de tratamento para úlceras de membros inferiores de pacientes com seqüelas de hanseníase.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Coordenação Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Paulista contra a Hanseníase pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Phillips T, Stanton B, Provan A. A study of impact of leg ulcers on quality of life: financial, social and psychology implications. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 49-53.
- 2 Opromolla DVA. Úlceras da Perna. In: Jorge AS, Dantas SRPE. *Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas*. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p. 271-8.
- 3 De Las Aguas JT. Ulceraciones en la lepra. *Tratamiento. Leprologia* 2001; 4: 248-56.
- 4 Valvi-Nagy IT, Murphy GF, Mancianti ML, Whitaker D, Herlyn M. Phenotypes and interactions of human melanocytes and keratinocytes in an epidermal reconstruction model. *Lab Invest* 1990; 62: 314-24.
- 5 Regnier M, Patwardhan A, Scheynius A. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. *Med Biol Eng Comput* 1998; 36: 821-4.
- 6 Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, Rives J, Lakhel A, Stephanazzi J, *et al.* Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burns* 2000; 26: 379-87.
- 7 Villeneuve P, Hafner J, Prenosil JE, Elsner P, Burg G. A novel culturing and grafting system for the treatment of leg ulcers. *Br J Dermatol* 1998; 138: 849-51.
- 8 Terskikh VV, Vasiliev AV. Cultivation and transplantation of epidermal keratinocytes. *Int Rev Cytol* 1999; 188: 41-72.
- 9 Siedler S, Schüller-Petrovic S. Allogenic keratinocytes suspended in human fibrin glue used for wound healing support in chronic leg ulcers. *Arch Dermatol* 2000; 136: 676-8.
- 10 Puzzi MB, Rehder J, Souto LRM, Santos MAG. Implant of autologous fibroblast and keratinocytes in skin ulcers of patients with sickle cell anaemia. In: 4^o International Symposium; Reims; 2002.
- 11 Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrist BA. Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 191-9.
- 12 Siddiqui MR, Moreira AL, Negesse Y, Taye GA, Hanekon WA, Haslet PAJ, *et al.* Local nerve in damage leprosy does not lead to an impaired cellular immune response or decreased wound healing in the skin. *J Infect Dis* 2002; 186: 260-5.
- 13 Salazar JJ, Serrano GG, Leon-Quintero GI, Torres-Mendoza BM. Use of topical ketaserin for treatment of ulcers in leprosy patients. *Indian J Lepr* 2001; 73: 103-10.
- 14 Nelzén O, Bergqvist D, Lindhagen A. Venous and non venous leg ulcers: clinical history and appearance in a population study. *Br J Surg* 1994; 81: 182-7.
- 15 Kunst H. Predisposing factors for recurrent skin ulcers in leprosy. *Lepr Rev* 2000; 71: 363-8.
- 16 Cardia COC. Use of skin graft "punch graft" type for the healing of leg ulcers in treated Hansen's disease patients. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2006; 12: 316.
- 17 Trier WC, Peacock EE, Madden JW. Studies on the effectiveness of surgical management of chronic leg ulcers. *Plast Reconstr Surg* 1970; 45: 20-3.
- 18 Ceilley RI, Rinek MA, Zuehlke RL. Pinch grafting for chronic ulcers on lower extremities. *J Dermatol Surg Oncol* 1977; 3: 303-9.
- 19 Limat A, French LE, Blal L, Saurat JH, Hunziker T, Salomon D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 207-14.

- 20 Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol* 2007; 5: 9-18.
- 21 Rothe M, Falanga V. Growth factors. Their biology and promise in dermatologic disease and tissue repair. *Arch Dermatol* 1989; 125: 1390-8.
- 22 Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Rep Reg* 1999; 7: 433-41.
- 23 Cavallini M. Autologous fibroblasts to treat deep and complicated leg ulcers in diabetic patients. *Wound Rep Reg* 2007; 15: 35-8.