



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES

**EFEITO DE UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis
procera* (AIT.) R. BR NA CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO
PILOTO**

FORTALEZA

2017

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES

**EFEITO DE UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR NA CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO
PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N926e Nunes, Marília de Oliveira.
EFEITO DE UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR NA CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO PILOTO / Marília de Oliveira Nunes. – 2018.
82 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar .
1. Úlcera plantar. 2. *Calotropis procera*. 3. Biomembrana. 4. Hanseníase. 5. Cicatrização. I. Título.
CDD 615.1
-

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES

**EFEITO DE UMA BIOMEMBRANA DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR NA CICATRIZAÇÃO: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO
PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria Araci de Andrade Pontes
Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária Dona Libânia

Profa. Dra. Ana Rosa Pinto Quidute
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meus projetos, meu socorro e sempre presente nas agonias e conquistas e as pessoas mais importantes da minha vida que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida: meu pai Mauro, minha mãe Sandra, minha irmã Camila, meu cunhado Renan e meu esposo Rodrigo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, a fonte inesgotável do amor necessário para conclusão deste trabalho bem como a realização de todos os meus projetos. Também pelos dons que me tornaram capaz de desenvolver este mestrado.

À **Virgem Maria**, minha querida mãe, a quem consagrei minha vida, não deixou de interceder por mim e me trouxe alegria nos momentos de tristeza.

Aos meus pais **Sandra Nunes** e **Mauro Nunes**. Sem eles nada seria possível, nunca deixaram faltar amor, carinho, apoio, incentivo e educação.

À minha irmã **Camila Barroso**, minha farmacêutica modelo, que além de todo o apoio por seu conhecimento, foi a melhor amiga que eu poderia ter, com ela compartilhei alegrias e tristezas e certamente sem ela seria tudo mais difícil.

Ao meu esposo e amor da minha vida **Rodrigo Bulegon**, a quem sou muito grata por toda a felicidade que me proporcionou nesta jornada, sempre me ajudando em tudo que eu precisasse.

À **Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, pela excelente orientação, na verdade, não fez somente a obrigação como professora, mas tudo que esteve ao alcance para que eu concluísse esta jornada, além de ser a grande idealizadora deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Márcio Viana Ramos**, por ser também ser peça fundamental para realização deste trabalho, sempre trazendo novas ideias para engrandecer esta dissertação.

À **Dra. Maria Araci de Andrade Pontes**, também colaboradora deste trabalho e membro da banca, agradeço as contribuições nesta pesquisa e todo o auxílio prestado sempre que precisei.

Ao técnico de enfermagem **Raimundo**, por todo o conhecimento que me transmitiu tanto com relação à hanseníase quando na vida espiritual. Sua dedicação nos curativos foi fundamental.

A **todos os pacientes** que aceitaram participar deste estudo, muito obrigada por acreditar na pesquisa e contribuir com a melhoria do tratamento de úlceras plantares.

À **Profa. Dra. Ana Rosa Pinto Quidute** pela contribuição ao meu trabalho durante a minha banca de defesa de mestrado e durante o processo de submissão do projeto ao comitê de ética.

À técnica do laboratório **Patrícia Sâmara**, que devo muito por todos os conselhos, por toda a ajuda, paciência e amizade, sempre disposta a contribuir no que fosse preciso. E ao técnico **Manuel Monteiro** pelo auxílio nas atividades do laboratório.

À **Profa. Dra. Maria Eugênia Errasti**, por quem tenho um carinho imenso, me ensinou muitas coisas e colaborou no desenvolvimento deste estudo.

À **Profa. Dra. Ingrid Samantha Tavares Figueiredo**, iniciou os estudos de cicatrização com a *Calotropis procera*, certamente foi uma inspiração para mim.

Às companheiras da cultura de células **Tamiris** e **Taiana** que me transmitiram conhecimentos essenciais neste trabalho, além de se tornaram grandes amigas, tenho a alegria de dizer que os dias no laboratório foram mais agradáveis com vocês. Às companheiras de laboratório Luana, Gisele, Larisse, Patrícia, Kályan e aos IC's Fernanda e Anderson, muito obrigada por toda ajuda.

A todos os membros do **Grupo de Oração Mãe da Misericórdia** que me deram todo o apoio espiritual, sempre me incentivando a não desistir e a seguir com coragem e determinação.

Agradeço ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ao corpo docente e à Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada!

“Se quiseres, podes purificar-me! Cheio de compaixão, Jesus estendeu a mão, tocou nele e disse: Quero. Seja purificado! Imediatamente a lepra o deixou, e ele foi purificado.”

Marcos 1, 40-42

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, sendo o seu agente etiológico o *Mycobacterium leprae* que apresenta afinidade por células do sistema nervoso periférico e pode provocar deformidades primárias ao comprometer fibras sensitivas, motores e autônomos, acarretando diminuição ou ausência da sensibilidade, paralisia e amiotrofia. Secundariamente a este dano nervoso podem ocorrer calosidades, fissuras e úlceras plantares. Existem diversos tratamentos eficazes para o tratamento das úlceras plantares, porém de extrema dificuldade de aquisição devido o alto custo. Desta forma, este trabalho tem como objetivo uma busca por uma nova ferramenta terapêutica acessível para o tratamento de úlceras plantares, realizando um estudo pré-clínico *in vitro* e clínico piloto. A biomembrana BioMem CpLP é um produto biotecnológico composto pela fração isolada obtida do látex de *Calotropis procera* que tem demonstrado potencial cicatrizante por estimular a fase inflamatória da cicatrização estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias acarretando em uma notável melhora das fases subsequentes do processo de cicatrização. Os estudos *in vitro* mostraram que CpLP é segura na linhagem de fibroblastos murinos (L929) em concentrações abaixo de 3,12 µg/mL e as concentrações 0,78 e 1,56 µg/mL foram capazes de aumentar a viabilidade celular. CpLP ainda induziu a proliferação e migração de fibroblastos nas concentrações de 0,78 e 1,56 µg/mL. Para o estudo clínico piloto, foram selecionados 9 pacientes com 12 úlceras plantares decorrentes da hanseníase, os quais constituíam dois grupos: tratamento convencional (Sulfadiazina de Prata) e tratamento com BioMem CpLP 10%. Os pacientes tratados com a biomembrana não apresentaram hipersensibilidade à biomembrana pelo “patch test” e tiveram resultados benéficos no tratamento da úlcera plantar nos parâmetros de redução da área bem como redução de necrose e aumento da reepitelização. Houve aumento significativo da contração da úlcera tratada com a biomembrana após 60 dias comparado ao início do tratamento. Com relação a avaliação clínica das úlceras plantares, a BioMem CpLP 10% foi capaz de desbridar o tecido desvitalizado em 85,7 % dos pacientes e apresentou aumento na formação do tecido cicatricial em quase 86% das úlceras enquanto que nas úlceras tratadas com Sulfadiazina de prata o aumento foi de 60%. Os resultados apresentam subsídio para o desenvolvimento de um estudo clínico que avalie uma opção terapêutica eficaz e de baixo custo disponível para pacientes com úlceras plantares.

Palavras-chave: Úlcera plantar. *Calotropis procera*. Biomembrana. Hanseníase. Cicatrização.

ABSTRACT

EFFECT OF A BIOMEMBRANE OF *Calotropis procera* LATEX PROTEINS (AIT.) R. BR IN HEALING: PRE-CLINICAL AND PILOT CLINICAL STUDIES

Leprosy is an infectious disease of chronic evolution, its etiologic agent being *Mycobacterium leprae*, which shows affinity for cells of the peripheral nervous system and can cause primary deformities by compromising sensitive, motor and autonomic fibers, causing a decrease or absence of sensitivity, paralysis and amyotrophy. Secondary to this nervous damage can be calosities, fissures and plantar ulcers. There are several effective treatments for the treatment of plantar ulcers, but of extreme difficulty of acquisition due to the high cost. In this way, this work has as objective a search for a new therapeutic tool accessible for the treatment of plantar ulcers, conducting a pre-clinical study in vitro and clinical pilot. The biomembrane BioMem cplp is a biotechnological product consisting of the obtained isolated fraction of *Calotropis latex procera* has shown potential healing by stimulating the inflammatory phase of wound healing by stimulating the release of pro-inflammatory cytokines resulting in a remarkable improvement in the subsequent stages of the healing process. *In vitro* studies showed that CpLP is safe in the murine fibroblast (L929) line at concentrations below 3.12 µg / mL and concentrations of 0.78 and 1.56 µg / mL were able to increase cell viability. CpLP also induced the proliferation and migration of fibroblasts at concentrations of 0.78 and 1.56 µg / mL. For the pilot clinical study, 9 patients with 12 plantar ulcers resulting from leprosy were selected, which consisted of two groups: conventional treatment (Silver Sulfadiazine) and treatment with BioMem CpLP 10%. Patients treated with the biomembrane did not present hypersensitivity to the biomembrane by the patch test and had beneficial results in the treatment of plantar ulcer in the parameters of reduction of the area as well as reduction of necrosis and increase of reepithelialization. There was a significant increase in the contraction of the ulcer treated with the biomembrane after 60 days compared to the beginning of the treatment. Regarding the clinical evaluation of plantar ulcers, BioMem CpLP 10% was able to debride the devitalized tissue in 85.7% of the patients and presented an increase in cicatricial tissue formation in almost 86% of the ulcers while in ulcers treated with Sulfadiazine de the increase was 60%. The results presented support for the development of a clinical study that evaluates an effective and low cost therapeutic option available for patients with plantar ulcers.

Keywords: Plantar ulcers. *Calotropis procera*. Biomembrane. Leprosy. Wound healing.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Formação de calosidades em pacientes com sequelas da hanseníase.... | 19 |
| Figura 2 | Fotografia de membro inferior de paciente hansênico com deformidades e pele descamativa | 19 |
| Figura 3 | Ilustração representativa das fases da cicatrização | 22 |
| Figura 4 | Atividade proteolítica | 47 |
| Figura 5 | Citotoxicidade de CpLP sobre fibroblastos L929 em DMEM sem SFB | 48 |
| Figura 6 | Citotoxicidade de CpLP fibroblastos L929 após 24, 48 e 72 horas..... | 49 |
| Figura 7 | Citotoxicidade de CpLP sobre fibroblastos L929 após 24 horas pelo teste do SRB | 50 |
| Figura 8 | Efeito de CpLP sobre proliferação e migração de fibroblastos L929 no teste do “scratch”..... | 51 |
| Figura 9 | Efeito de CpLP sobre o número de fibroblastos corados pelo Azul de Trypan | 52 |
| Figura 10 | Evolução individual de cada úlcera tratada com a BioMem CpLP e com Sulfadiazina de prata | 55 |
| Figura 11 | Evolução das úlceras tratadas com a BioMem CpLP e com Sulfadiazina de prata | 56 |
| Figura 12 | Registro fotográfico das úlceras tratadas com BioMem CpLP | 59 |
| Figura 13 | Registro fotográfico das úlceras tratadas com Sulfadiazina de Prata | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Caracterização demográfica dos pacientes com úlceras plantares | 53 |
| Tabela 2 | Antecedentes pessoais de hiperssensibilidade dos pacientes | 53 |
| Tabela 3 | Caracterização clínica dos pacientes com úlceras plantares - Grupo Sulfadiazina de Prata | 54 |
| Tabela 4 | Caracterização clínica dos pacientes com úlceras plantares - Grupo BioMem CpLP | 54 |
| Tabela 5 | Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo BioMem CpLP (n=7) | 57 |
| Tabela 6 | Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo Sulfadiazina de Prata (n=5)..... | 57 |
| Tabela 7 | Resultado da análise clínico-fotográfica dos pacientes dos grupos BioMem CpLP e Controle | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| ANOVA | Análise de Variância |
| CpLP | Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i> |
| CDERM | Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EGFR | Fator de Crescimento Epidérmico |
| FGF | Fator de Crescimento de Fibroblastos |
| ICU | Índice de Cicatrização de Úlceras |
| IGF | Fator de Crescimento Semelhante à Insulina |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL – 1 β | Interleucina 1 β |
| MB | Multibacilar |
| MH | Mal de Hansen |
| MS | Ministério da Saúde |
| MTT | ([3- (4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium]) |
| NCTC | Linhagem celular |
| NPDM | Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos |
| NOS | Óxido nítrico sintase |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PB | Paucibacilar |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PDGF | Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas |
| PVA | Álcool polivinílico |
| SRB | Sulforodamina B |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| TGF - β | Fator de Crescimento Transformador β |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | Hanseníase | 16 |
| 1.2 | Complicações secundárias: úlcera plantar | 17 |
| 1.3 | Pele e Processo cicatricial | 20 |
| 1.4 | Tratamento da úlcera plantar | 27 |
| 1.5 | Potencial farmacológico do látex de <i>Calotropis procera</i> | 31 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 35 |
| 3.2 | Objetivos Específicos | 35 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 | Isolamento da fração | 36 |
| 4.2 | Controle de qualidade microbiológico | 36 |
| 4.3 | Elaboração da biomembrana | 37 |
| 4.4 | Atividade proteolítica da biomembrana por difusão em gel de agarose .. | 37 |
| 4.5 | Experimentos <i>in vitro</i>..... | 38 |
| 4.5.1 | <i>Cultivo celular</i> | 38 |
| 4.5.2 | <i>Ensaio de Citotoxicidade pelo método MTT com fibroblastos L929 sem soro fetal bovino</i> | 39 |
| 4.5.3 | <i>Ensaio de Citotoxicidade pelo método MTT com fibroblastos com soro fetal bovino.....</i> | 39 |
| 4.5.4 | <i>Ensaio de Citotoxicidade pelo método SRB com fibroblastos L929.....</i> | 40 |
| 4.5.5 | <i>Ensaio de cicatrização <i>in vitro</i> (“scratch”) em fibroblastos L929.....</i> | 41 |
| 4.5.6 | <i>Confirmação da proliferação de fibroblastos L929 por teste de exclusão com azul de Trypan</i> | 41 |
| 4.6 | Estudo clínico | 41 |
| 4.6.1 | <i>Tipo de estudo.....</i> | 41 |
| 4.6.2 | <i>Seleção dos sujeitos da pesquisa.....</i> | 41 |
| 4.6.3 | <i>Avaliação clínica inicial (para inclusão dos pacientes no estudo).....</i> | 43 |
| 4.6.4 | <i>Exame de hipersensibilidade.....</i> | 43 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.6.5 | <i>Grupos de Pesquisa</i> | 43 |
| 4.6.6 | <i>Avaliação da eficácia</i> | 44 |
| 4.7 | Análise estatística | 45 |
| 5 | RESULTADOS | 46 |
| 5.1 | Resultados <i>in vitro</i> | 46 |
| 5.5.1 | <i>A BioMem CpLP apresenta atividade proteolítica</i> | 46 |
| 5.1.2 | <i>CpLP não reduz a viabilidade de fibroblastos L929 em baixas concentrações</i> | 47 |
| 5.1.3 | <i>CpLP induz a proliferação de fibroblastos L929</i> | 50 |
| 5.2 | Resultados do estudo clínico piloto | 52 |
| 6 | DISCUSSÃO | 61 |
| 7 | CONCLUSÃO | 66 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 67 |
| 9 | ANEXOS | 75 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

A hanseníase também conhecida como lepra é uma doença tão antiga quanto a história da humanidade. Caracteriza-se por ser uma doença infectocontagiosa de evolução crônica, com via de transmissão predominantemente respiratória, sendo o seu agente etiológico o *Mycobacterium leprae*. A doença se manifesta, principalmente, por úlceras cutâneas com diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil (TALHARI *et al.*, 2015).

Esta doença ainda é negligenciada no Brasil e acomete, em sua maioria, grupos mais vulneráveis da população, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e centro-oeste do país. O número de pessoas acometidas pela doença tem diminuído com o passar dos anos, porém, em 2011, foram contabilizados quase 34 mil novos casos, ficando atrás somente da Índia com 217 mil na estatística mundial (DAXBACHER & FERREIRA, 2011; DUTRA *et al.*, 2015). Em 2012, esse número caiu para 200 mil casos novos na estatística mundial, porém ainda é um grave problema de saúde pública também devido ao diagnóstico tardio, o abandono dos pacientes ao tratamento, o nível de esclarecimento sobre a doença, o estigma, o preconceito, entre outros fatores. Além disso, é uma doença que pode ocasionar a deficiência sensorial e motora, no entanto, em muitos casos os pacientes passam anos sem sinais e sintomas e quando recebem o diagnóstico já apresentam sequelas permanentes (HWO, 2010; MOURA *et al.*, 2016).

O *M. leprae* tem afinidade por células cutâneas e por células dos nervos periféricos, aonde se multiplica provocando déficits sensoriais e motores. O período de multiplicação pode variar, em média de 11 a 16 dias, sendo considerada lenta a capacidade do bacilo em proliferar. O período de incubação varia de poucos meses até 10 anos, em média 5 anos. O bacilo se desenvolve em temperaturas inferiores a 37°C, explicando sua localização preferencial nas partes mais frias do corpo como nariz, lobos de orelhas, testículos, troncos nervosos periféricos e o segmento anterior do olho. Com relação a sua característica de transmissão, tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto, poucas adoecem. O contágio acontece através do contato íntimo e prolongado com paciente com baciloscopia positiva. Antes do tratamento, a bactéria é transmitida através das vias aéreas superiores, mucosa nasal e orofaríngea. Sabe-se também que a manifestação da doença depende da susceptibilidade genética (LIU *et al.*, 2015; BRASIL, 2016; BANDEIRA, 2010; BARBIERI e MARQUES, 2009).

A hanseníase se manifesta em quatro diferentes formas clínicas segundo a classificação de Madri (1953). A indeterminada que é uma forma inicial e pode evoluir espontaneamente para a cura, geralmente aparece apenas uma úlcera mais clara que a pele normal e com dormência, sendo mais comum em crianças. A forma tuberculóide é benigna e localizada, ocorre em pessoas com alta resistência ao bacilo e apresenta poucas úlceras de limites bem definidos e um pouco elevados com alteração de sensibilidade. Ocorre comprometimento simétrico de troncos nervosos, podendo causar fraqueza e atrofia muscular. Nas úlceras e/ou trajetos de nervos pode haver perda total da sensibilidade térmica, tátil e dolorosa, ausência de sudorese e alopecia. A hanseníase virchowiana é a forma clínica na qual a imunidade celular é comprometida e o bacilo se multiplica muito, levando a um quadro mais grave, com anestesia dos pés e mãos que favorecem os traumatismos e feridas que podem causar deformidades, atrofia muscular, inchaço das pernas e surgimento de úlceras elevadas na pele (nódulos), além de infiltração de lóbulos auriculares. Por último, a forma dimorfa que se manifesta de uma maneira intermediária com características clínicas e laboratoriais que podem se aproximar da forma clínica tuberculóide ou virchowiana. Em 1992, a OMS propôs uma classificação operacional para fins de tratamento baseado no número de lesões que pode ser menor que 5 lesões na forma paucibacilar (PB) e maior que 5 multibacilar (MB) (PARDILO *et al.*, 2007)

As drogas usadas nos esquemas padronizados pela OMS e MS para o tratamento da hanseníase são a rifampicina (única bactericida dos esquemas padrão), dapsona e clofazimina. O tratamento pode durar de seis meses no caso da forma paucibacilar até 12 meses nos casos multibacilares. Depois de completado o tratamento poliquimioterápico, os pacientes são considerados curados mesmo que possuam sequelas da doença (BRASIL, 2016).

1.2 Complicações secundárias: úlcera plantar

As complicações e sequelas, principal preocupação do doente, resultam da ação bacteriana diretamente nos órgãos afetados ou indiretamente das úlceras neurais. O bacilo cresce nas células de Schwann e termina por desmielinizar os segmentos nervosos que contém maior população bacilar. Inicialmente, nos troncos nervosos, os bacilos espalhados ao redor de cada compartimento e camada do nervo, não provocam qualquer reação tecidual aparente,

exceto discreto edema. Com o tempo, a proliferação de fibroblastos cria uma cicatrização difusa e, por fim, completa fibrose e perda da função nervosa. Este processo pode levar muitos anos para se completar, podendo ser visto em quase todos os nervos periféricos, desde perto da medula espinhal até a periferia (DUERKSEN, 2004).

A afinidade do bacilo por células do sistema nervoso periférico pode provocar deformidades primárias ao comprometer fibras dos nervos sensitivos, motores e autônomos, acarretando diminuição ou ausência da sensibilidade protetora, paralisia e amiotrofia. E em função do dano nervoso primário podem ocorrer secundariamente: calosidade, fissura, ulceração e o mal perfurante plantar (úlceras plantares) (BRASIL, 2001b; VIJAYAN e WILDER-SMITH, 2013).

O comprometimento do nervo tibial posterior é uma importante causa de úlceras no pé. As alterações desse nervo manifestam-se por diferentes graus de deformidades como alterações na flexão dos podósticos e na articulação metatarso-falângica, perdendo a função sua protetora, além disso a amiotrofia muscular também diminui a proteção da estrutura óssea e altera a manutenção da arquitetura do pé. O comprometimento deste nervo também anestesia e anidrose plantar.

A deformidade secundária mais importante é a úlcera plantar (denominada “mal perfurante plantar”), resultante de trauma repetido pela marcha em região plantar anestésica. A úlcera surge em consequência de caminhadas prolongadas, sapatos mal ajustados, pregos ou pequenas pedras nos sapatos, etc. Os primeiros sinais que precedem o mal perfurante plantar são dor localizada à pressão profunda, hematoma e sinais de processo inflamatório. A localização preferencial da úlcera plantar é a parte anterior do pé e inicia-se com frequência, em áreas de calosidades.

As falhas na mecânica do pé, frequentemente geram pressão e fricção persistentes que causam hiperqueratose, por exemplo, as calosidades (Figura 1), que é manifestada pelo espessamento da camada de queratina. Calos espessos e localizados agem como uma pedra no sapato, predispondo à formação de úlceras plantares, dessa forma causam traumas contusos e repetitivos durante a marcha, os quais geram os tecidos necróticos e, posteriormente, uma área equimótica na superfície do próprio calo, que acaba ulcerando. Na hanseníase este processo é potencializado, pois a perda de sensibilidade na planta do pé e a ausência de retroalimentação favorecem a não percepção e a repetição dos traumatismos, levando à ulceração plantar (SMELTZER, *et al.*, 2011; GARBINO, *et al.*, 2001)

Figura 1 – Formação de calosidades em pacientes com sequelas da hanseníase



Fonte: elaborado pelo autor

Na pele normal, o correto funcionamento do sistema glandular cutâneo supre a oleosidade natural da pele, garantindo sua hidratação. Assim, uma vez comprometido o sistema glandular cutâneo, há diminuição ou ausência da transpiração e da oleosidade natural, e perda da umidade do estrato córneo, necessária à plasticidade, à flexibilidade e à resistência da pele, tornando-a seca, descamativa (Figura 2), frágil e com tendência a fissuras (BRASIL, 2002c). Os pacientes com mal de Hansen MH perdem a capacidade natural de resistir a pequenos traumas e a tendência a ulcerações aumenta, favorecendo o aparecimento de deformidades (SANTOS, 2000).

Figura 2 – Fotografia de membro inferior de paciente hansênico com deformidades e pele descamativa.



Fonte: elaborado pelo autor

A região plantar é abordada como o local comumente acometido por úlceras, devido a alterações biomecânicas e diminuição da sensibilidade ocorridas no paciente, o que reflete na perda da proteção fisiológica necessária para prevenção de inúmeras úlceras cutâneas. Estas úlceras constituem uma importante complicação consequente da neuropatia nos pacientes hansenianos. Portanto, devem sofrer intervenções terapêuticas e devidamente

prevenidas, pois constituem porta de entrada para infecções que podem evoluir para complicações e até mesmo à amputação (GOMES, 2007).

1.3 Pele e Processo cicatricial

A pele é uma interface entre o corpo e o ambiente, responsável por muitas funções importantes, tais como regulação de temperatura, transporte de água, sensação, síntese da vitamina D e proteção contra agressões externas. A pele recobre toda a superfície do corpo e compõe-se essencialmente por duas camadas a epiderme e derme. (SANTOS, 2011; DAŁBROWSKA *et al.*, 2017).

A epiderme é a camada mais externa, composta por três diferentes tipos celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans. É composta por epitélio escamoso estratificado, que serve de barreira contra infecções, fatores externos mecânicos, químicos e de radiação (LOPES *et al.*, 2017). As células da epiderme organizam-se em camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. A epiderme é constituída por diferentes camadas: germinativa, espinhosa, granulosa e córnea. A camada germinativa é a mais profunda, constitui-se por células basais (queratinócitos cilíndricos) e melanócitos e faz limite com a derme, enquanto a córnea é a mais superficial, constituída por células anucleadas, cheias de queratina, que proporciona proteção contra traumas físicos e químicos. As várias camadas de queratinócitos intimamente unidos uns aos outros fornecem barreira contra a invasão de microrganismos e água. Com relação às porções intermediárias da epiderme, a camada espinhosa é constituída de células espinhosas com configuração poliédrica, achatando-se progressivamente em direção à superfície e, por fim, a camada granulosa caracterizada por células com grande quantidade de grânulos de querato-hialina e citoqueratinas (SANTOS *et al.*, 2000; RIVITTI, 2014; LOPES *et al.*, 2017).

A derme é composta de componentes intersticiais como as fibras de colágeno, fibras elásticas, fibras reticulares e substância fundamental, bem como componentes celulares como fibroblastos, mastócitos, células plasmáticas, linfócitos, células dendríticas dérmicas e histiócitos. Também contém vasos sanguíneos, canais linfáticos e nervos sensoriais. (LAI-CHEONG E MCGRATH, 2013).

O fibroblasto é o tipo de célula predominante na derme, secreta colágenos, fibras elásticas e substância fundamental. Cerca de 95% do tecido conectivo da derme é constituído

por fibras colágenas, por outro lado as fibras elásticas são menos resistentes que as fibras de colágeno, mas conferem propriedades como absorção de choques e distensões que se produzem na pele. Elas representam cerca de 5% do peso seco da derme e consistem em elastina e microfibrilas elásticas. Estas fibras são banhadas em uma substância gelatinosa, composta de proteoglicanos e glicoproteínas (LAI-CHEONG E MCGRATH, 2013; RIVITTI, 2014).

As lesões cutâneas podem ocorrer pela interrupção da continuidade deste órgão, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque. As feridas podem ser classificadas quanto à causa, à presença de infecção bacteriana, ao grau de abertura e ao tempo de duração. O tempo é um fator importante na resolução de úlceras e na cicatrização. Desse modo, as feridas podem ser clinicamente categorizadas como agudas e crônicas de acordo com seu período de cicatrização completa (VELNAR, 2009).

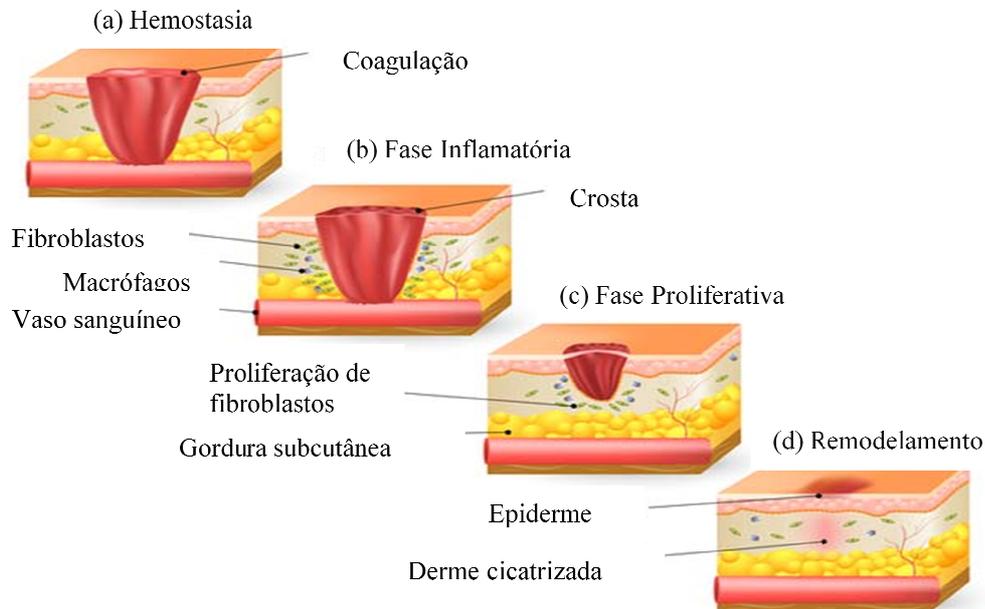
As feridas agudas são reparadas normalmente seguindo uma evolução ordenada, com características funcionais e anatômicas restauradas. O tempo de cicatrização geralmente varia de 5 a 10 dias, ou dentro de 30 dias. Podem ser adquiridas como resultado de perda traumática de tecido ou um procedimento cirúrgico e podem envolver apenas os tecidos moles ou podem ser associado a fraturas ósseas (VELNAR, 2009).

Em contrapartida, as feridas crônicas são aquelas que não conseguem avançar no curso temporal da cicatrização e não podem ser reparados de forma ordenada e no tempo hábil. Geralmente, são resultado de neuropatias, pressão, insuficiência arterial e venosa, queimaduras e vasculite. Nestas úlceras, o processo de cura é incompleto e prejudicado por vários fatores, que prolongam um ou mais estágios da cicatrização, como as fases de hemostasia, inflamação, proliferação ou remodelação. Esses fatores incluem infecção, hipóxia do tecido, necrose, exsudato e aumento no estresse celular causando um contínuo estado de inflamação na ferida que cria uma cascata de respostas que podem retardar a cicatrização. (VELNAR, 2009; SAMPAIO E RIVITTI, 2014).

Os vários processos de reparo do tecido, desencadeados após uma lesão tecidual, são desmembrados em uma sequência de quatro fases dependentes do tempo separadas didaticamente como: hemostasia, resposta imediata após a úlcera; inflamação, essencial para a defesa orgânica e início do reparo tecidual; a proliferação, que se inicia em poucos dias e engloba o principal processo de recomposição; e o remodelamento, em que ocorre a formação

da cicatriz, podendo durar um ano ou mais (Figura 3) (SINGER E CLARK, 1999; VELNAR *et al.*, 2009; DARBY *et al.*, 2014; THEOCHARIDIS *et al.*, 2016).

Figura 3 – Ilustração representativa das fases da cicatrização



A figura representa de maneira didática as fases da cicatrização: (a) Hemostasia, indicando a coagulação sanguínea e contenção do sangramento; (b) Fase Inflamatória, mostrando a infiltração de macrófagos e formação da crosta; (c) Fase proliferativa, observa-se intensa proliferação de fibroblastos e contração da úlcera; (e) Fase de remodelamento, mostrando o desenvolvimento do novo epitélio (GOSAIN e DIPIETRO, 2004).

Fase de coagulação e hemostasia

Imediatamente após o ferimento, a coagulação é iniciada para prevenir a perda excessiva de sangue, além de prover o ambiente propício para a infiltração de células necessárias para a proteção e reparação tecidual. As células endoteliais e plaquetas regulam a coagulação e fibrinólise promovendo assim a hemostasia e a deposição de fibrina no local da ferida. O rompimento microvascular causado pela injúria leva à ativação do reflexo neuronal, responsável pela contração das células musculares lisas do vaso. A vasoconstrição reflexa pode temporariamente reduzir o volume de sangramento levando também à redução da perda sanguínea (VELNAR *et al.*, 2009; DARBY *et al.*, 2014).

Juntamente com eventos hemostáticos, a cascata de coagulação é ativada através de vias extrínsecas e intrínsecas, levando a agregação de plaquetas e formação de coágulos para limitar a perda de sangue. À medida que o sangue extravasa no local da úlcera, os

componentes sanguíneos e as plaquetas entram em contato com o colágeno e outros componentes da matriz extracelular. Este contato desencadeia a liberação de fatores de coagulação das plaquetas e a formação de um coágulo de sangue, composto por fibronectina, fibrina, vitronectina e trombospondina. O coágulo de sangue e as plaquetas não são apenas importantes para a hemostasia, como também fornece uma matriz provisória para migração de células nas fases subsequentes como a fase inflamatória (CANHAMERO, 2009; BAUM *et al.*, 2005).

O citoplasma das plaquetas contém grânulos alfa que liberam fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação do crescimento β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento insulina-like (IGF). Essas moléculas atuam como promotores de sinalização na cascata de cicatrização, ativando e atraindo neutrófilos, além de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. O TGF- β acrescenta outro sinal importante para o início da cascata de cicatrização, atraindo macrófagos e estimulando-os a secretar citocinas adicionais, incluindo FGF (fator de crescimento de fibroblastos), PDGF, TNF- α (necrose tumoral alfa) e IL-1 (interleucina-1). Além disso, o TGF- β melhora ainda mais a fibroplasia e a quimiotaxia das células do músculo liso e modula a expressão de colágeno e colagenase (GROTH, 2007; CANHAMERO, 2009; BAUM *et al.*, 2005).

Fase Inflamatória

A fase inflamatória inicia a seguir, com o objetivo de estabelecer uma barreira imune contra microrganismos invasores. Pode ser dividida em duas fases separadas para melhor compreensão: uma fase inflamatória precoce e uma fase inflamatória tardia.

Começando durante o final da coagulação, o início da resposta inflamatória tem muitos objetivos, dentre eles, ativar a cascata do complemento e iniciar eventos moleculares, levando a infiltração de neutrófilos no local da ferida, cuja principal função é prevenir a infecção. Os neutrófilos começam com uma tarefa crítica de fagocitose, a fim de destruir e remover bactérias, partículas estranhas e tecido danificado. A fagocitose é crucial para o subsequente processo, porque feridas que têm infecção bacteriana não vão cicatrizar normalmente. Os neutrófilos começam a ser atraídos para o local da ferida dentro de 24 a 36 horas após o ferimento por vários agentes quimioatraentes, incluindo TGF- β , componentes do

complemento tais como C3a e C5a e peptídeos produzidos por bactérias e produtos de plaquetas (VELNAR *et al.*, 2009).

Devido à expressão das moléculas de adesão de superfície, os neutrófilos se tornam aderentes e começam a aderir às células endoteliais dos capilares. Então, os neutrófilos rolam ao longo da superfície do endotélio sendo empurrados para frente pelo fluxo sanguíneo. Essa aderência e mecanismo de rolamento são mediados por interações fracas selectinas e interações fortes por integrinas. As células param, rolam, migram para as vênulas e passam pelas células endoteliais por um processo conhecido como diapedese. Uma vez no ambiente da ferida, os neutrófilos fagocitam material estranho e bactérias, destruindo-os pela liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio. A atividade de neutrófilos muda gradualmente dentro de alguns dias do ferimento, uma vez que toda a infecção foi combatida. Ao completar a tarefa, os neutrófilos devem ser eliminados da ferida antes da progressão para a próxima fase da cicatrização. Células redundantes são descartadas por extrusão para a superfície da ferida por apoptose, permitindo a eliminação de toda a população de neutrófilos sem dano tecidual ou potencialização da resposta inflamatória. Os restos celulares são então fagocitados por macrófagos (VELNAR *et al.*, 2009).

A fase inflamatória tardia ocorre entre 48 a 72 horas após a úlcera. Nesse momento os macrófagos aparecem no local do ferimento e continuam o processo de fagocitose. Estas células são originalmente monócitos do sangue que sofrem alterações fenotípicas na chegada ao local da ferida para se tornarem macrófagos de tecidos. São atraídos por agentes quimioatrativos, incluindo fatores da coagulação, componentes do complemento, citocinas tais como PDGF, TGF- β , leucotrieno B4 e fator plaquetário IV, bem como elastina e produtos de degradação de colágeno. Os macrófagos têm uma vida útil mais longa do que os neutrófilos e são fundamentais para os estágios tardios da resposta inflamatória, atuando como células-chave reguladoras e fornecendo um reservatório abundante de potentes fatores de crescimento de tecidos, particularmente o TGF- β , bem como outros mediadores como TGF- α , fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), collagenase, fatores de ativação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (BROUGHTON, 2006).

Claramente, o esgotamento de monócitos e macrófagos na ferida causa graves consequências na cicatrização devido ao fraco desbridamento da úlcera, atrasando a proliferação e maturação de fibroblastos, bem como a angiogênese retardada, resultando em fibrose inadequada.

As últimas células envolvidas na fase inflamatória tardia são linfócitos. São atraídos após 72 horas após a úlcera pela ação da interleucina-1 (IL-1), componentes do complemento e produtos da degradação da imunoglobulina G (IgG). A IL-1 desempenha um papel importante na regulação da colagenase, que será necessária para a remodelação de colágeno, produção de componentes de matriz extracelular e sua degradação (DARBY *et al.*, 2014).

Fase proliferativa

A fase proliferativa começa por volta do terceiro dia após o ferimento e dura cerca de 2 semanas. É caracterizada por migração de fibroblastos e deposição de matriz extracelular sintetizada, atuando como rede provisória composta de fibrina e fibronectina. Ocorre intensa produção de colágeno, formação de novos vasos e, a nível macroscópico, pode-se ver abundante formação de tecido de granulação nesta fase da cicatrização (HARDING *et al.*, 2003).

A proliferação dos fibroblastos e miofibroblastos no tecido circulante ocorre após os primeiros três dias, em seguida, migram para a ferida, sendo atraídos por fatores como TGF- β e PDGF, que são liberados por células inflamatórias e plaquetas. Uma vez na ferida, os fibroblastos proliferam profusamente e produzem a matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como fibronectina, fibrinogênio, glicosaminoglicanas, ácido hialurônico e o colágeno). Todos os seus produtos são depositados no local (MANDELBAUM, 2003; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

No final da primeira semana, a abundante matriz extracelular se acumula, o que suporta a migração celular e é essencial para o processo de reparação. Nesse momento os fibroblastos mudam seu fenótipo para miofibroblastos. Essas células contêm fibras de actina abaixo da membrana plasmática e podem ampliar pseudópodes, se unindo a fibronectina e ao colágeno na matriz extracelular. Esse evento proporciona a contração da ferida, que é importante no processo de reparo, ajudando as bordas da ferida a se aproximarem. Tendo cumprido esta tarefa, os fibroblastos redundantes são eliminados por apoptose (BAUM *et al.*, 2002).

Ainda nesta fase, acontece a síntese de colágeno, componente importante em na cicatrização de feridas. Sintetizado por fibroblastos, confere integridade e força a todos os

tecidos e desempenha um papel fundamental, especialmente nas fases de proliferação e remodelamento. O colágeno atua como base para a formação da matriz intracelular dentro da ferida e compõe a derme com 80% de colágeno tipo 1 e 25% de colágeno tipo 3, enquanto no tecido de granulação expressa 40% de colágeno de tipo 3.

Outro aspecto importante é o estabelecimento de novos vasos sanguíneos, que são fundamentais na cicatrização de feridas e ocorrem simultaneamente durante todas as fases do processo de reparação. Além de atrair neutrófilos e macrófagos, numerosos fatores secretados durante a fase hemostática promovem a angiogênese. As células endoteliais residentes respondem a uma série de fatores angiogênicos, incluindo FGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), PDGF, angiogenina, TGF- α e TGF- β . Inicialmente, não há suprimento vascular no centro do ferimento, de modo que o tecido viável, limitado às margens da ferida, é perfundido por vasos íntegros. Capilares da borda circundante invadem o coágulo e, dentro de alguns dias, uma rede microvascular composta por muitos novos capilares é formada. Por fim, os vasos diminuem e o tecido de granulação amadurece gradualmente para produzir uma cicatriz (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Fase de remodelamento

Como se trata da fase final da cicatrização de feridas, no remodelamento ocorre o desenvolvimento do novo epitélio e final formação de tecido cicatricial. Esta fase pode durar até um ou dois anos, ou às vezes por período mais prolongado, podendo inclusive não ocorrer devido a complicações decorrentes das úlceras crônicas, como na úlcera plantar.

O remodelamento de uma ferida aguda é fortemente controlado por mecanismos regulatórios com objetivo de manter um equilíbrio entre degradação e síntese, contribuindo para a cicatrização normal. Juntamente com maturação intracelular da matriz, feixes de colágeno aumentam de diâmetro enquanto que ácido hialurônico e fibronectina são degradados. A força de tração da ferida aumenta progressivamente com a deposição de colágeno. As fibras de colágeno podem recuperar aproximadamente 80% da força em comparação com tecido normal, mas a força do tecido original nunca mais poderá ser recuperada (DARBY *et al.*, 2014).

1.4 Tratamento da úlcera plantar

O tratamento da úlcera plantar pode levar anos e envolve uma gama de recursos: medicação, férula, órtese, internação hospitalar para controlar infecções concorrentes e programas de educação em saúde (HARRIS *et al.*, 2009).

Inicialmente, um dos primeiros e mais importantes cuidados ao fazer qualquer curativo é a desinfecção do sítio da ferida. Com o uso de fluidos, como o soro fisiológico, retira-se fragmentos, exsudato, corpos estranhos e bactérias e confere-se umidade à úlcera. As feridas com tecido necrótico abundante necessitam, particularmente do desbridamento para expor o tecido viável (YAMADA, 2003).

O desbridamento é definido como a remoção de material estranho e tecido desvitalizado ou contaminado de uma úlcera traumática ou infectada até ao redor do tecido saudável que será exposto pelo procedimento. É classificado como autolítico o processo natural que consiste na auto degradação do tecido necrótico. Ainda existem substâncias capazes de promover um desbridamento químico ou enzimático, como as enzimas proteolíticas, por exemplo, colagenase, estreptoquinase e papaína (HARRIS, 2009; STROHAL *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2001).

Portanto, este processo é um passo muito importante para a cicatrização de feridas como as neuropáticas que formam hiperqueratose nas bordas, dificultando a epitelização, como acontece frequentemente na úlcera plantar, reduzindo a capacidade de migração das células epiteliais, pois age como barreira à migração celular. Além disso, o procedimento reduz o volume de micróbios patogênicos por remoção de tecido necrótico e material estranho (o tecido desvitalizado induz crescimento bacteriano com aumento risco de infecção da ferida), e interrompe o ciclo da ferida crônica a nível molecular aumentando os níveis de proteases e citocinas semelhante à progressão da úlcera aguda (SANTOS *et al.*, 2013).

Além da limpeza, outro princípio importante da terapia tópica de feridas é a oclusão da úlcera com os curativos. Os curativos para as feridas crônicas atualmente são bem diversificados, variando dos tipos clássicos até variedades revestidas de prata e curativos biológicos que servem como substitutos da pele. Os tipos de curativos com retenção de umidade incluem espumas, filmes, hidrogéis, hidrocolóides e alginatos. O uso apropriado desses curativos pode ajudar a manter a ferida úmida, o que permite migração, epitelização, angiogênese, retenção de fatores de crescimento, desbridamento autolítico e manutenção de gradientes elétricos (POWERS *et al.*, 2013).

Várias são as condutas no tratamento das úlceras crônicas, que variam do curativo simples à base de óleos, pomadas antibióticas, géis a curativos mais complexos que variam de 15 a 200 reais o custo por curativo conforme os exemplos mostrados a seguir com suas respectivas indicações.

Sulfadiazina de prata

É um agente antimicrobiano tópico na terapia de queimaduras, feridas cirúrgicas, úlceras e escaras infectadas. A prata é bactericida imediata e bacteriostática residual, provoca precipitação proteica e age diretamente na membrana citoplasmática bacteriana. O nitrato de cério potencializa o efeito bactericida. Tem baixo custo e fácil aplicação. São comercializados como Dermazine®, Pratazine® e Dermacerium® (FRADE *et al.*, 2003).

Creme de Papaína

Sua composição é um complexo de enzimas proteolíticas retiradas do látex do mamão papaia (*Carica papaya*). Seu uso provoca dissociação das moléculas de proteína, resultando em desbridamento químico, além disso, é bactericida e bacteriostático, estimula a força tênsil das cicatrizes e acelera o processo de cicatrização. É indicado para tratamento de feridas abertas e contraindicado para uso na pele íntegra, ferida operatória fechada e na presença do tecido de granulação (SANTOS *et al.*, 2011).

Hidrogéis

São compostos de água (77,7%), propilenoglicol(20%) e carboximetilcelulose (2,3%). Esses medicamentos tem a propriedade de manter o meio úmido, promove o desbridamento autolítico e estimula a cicatrização. Sua principal indicação é para remover crostas e tecidos desvitalizados de feridas abertas. Por outro lado, são contraindicados em pele íntegra, feridas de pós operatório fechadas e úlcera com muito exsudato (SANTOS *et al.*, 2011). São comercializados como Duoderm Gel®, Hydrosorb®, Hydrosorb Plus® e Nu-Gel®, Akina® Gel.

Carvão ativado

Este curativo é composto por tecido carbonizado e impregnado com nitrato de prata a 0,15%, envolto por camada de tecido sem carvão ativado. O carvão ativado absorve o exsudato e filtra o odor e a prata exerce ação bactericida. É indicado para o tratamento de

feridas fétidas, infectadas e exsudativas. Não deve ser utilizado em feridas limpas e úlceras de queimaduras. É comercializado como Carboflex[®] e Actisorb[®] (FRANCO E GONÇALVES, 2007).

Pomada Enzimática

As pomadas enzimáticas são compostas pela colagenase e enzimas proteolíticas. São utilizadas em feridas com tecido desvitalizado e contraindicadas em feridas com cicatrização por primeira intenção. Também pode ser produzidas à base de fibrinolisina que é capaz de dissolver o exsudato e o tecido necrótico. Seu mecanismo de ação consiste em degradar o colágeno nativo da ferida. São comercializadas como Iruxol[®], Kollagenase[®], Santyl[®] e Fibrase[®] (FRANCO E GONÇALVES, 2007).

Hidrocolóides

É composto por uma camada externa de filme e espuma de poliuretano, unida a uma camada interna de carboximetilcelulose sódica e gelatina e pectina. Promove uma expansão da celulose ao absorver líquido da ferida, faz um desbridamento autolítico, facilita angiogênese e tecido degranulação protegendo terminações nervosas livres. São indicados para o tratamento de feridas limpas com média e pequena quantidade de exsudato, prevenção de úlceras de pressão, e queimaduras de 2º grau. São contraindicados em feridas infectadas (FRADE, 2003; MANDELBAUM, 2003). São comercializados como Askina[®]Hydro, Comfeel[®], Combiderm[®], Duoderm[®], Hydrocoll[®].

Alginatos

Os alginatos são polímeros fibrosos derivados do ácido algínico, que têm ação hemostática; considerados bioativos, são altamente absorventes, promovem a autólise, possibilitando a remoção bacteriana. São indicados para feridas altamente exsudativas e, contraindicados para feridas secas. É um curativo derivado de algas marinhas e ao serem colocados sobre a ferida, sua alta capacidade de absorção forma um gel hidrofílico e homogêneo, que mantém o meio úmido que, por sua vez, estimula a cicatrização e permite a troca iônica entre o cálcio do alginato e o sódio do sangue e do exsudato, originando um composto solúvel, o alginato de cálcio-sódio. Tal troca iônica auxilia no desbridamento autolítico e na hemostasia, possibilitando ainda a remoção bacteriana (DOMANSKY, 2003). São comercializados como Algoderm[®], Akina[®]Sorb, Kaltostat[®], Saf-gel[®].

Inovações tecnológicas

Aquacel® Ag é um curativo de hidrofibra antimicrobiano, estéril, macio, composto por carboximetilcelulose sódica e prata. É um curativo super absorvente, capaz de capturar os microorganismos presentes no leito da ferida, ao ser colocado na úlcera, forma gel macio e coeso que se adapta ao leito da ferida, mantendo um ambiente úmido que auxilia o desbridamento autolítico. Além disso, ao entrar em contato com o exsudato da ferida, absorve o excesso de exsudato e os íons de prata são liberados e inativam as bactérias (CARUSO *et al.*, 2004).

Dermadry® Ag é um curativo estéril esponjoso composto de 98% colágeno Tipo 1, além de 1,2% de prata iônica. Auxilia no processo de cicatrização da ferida, promovendo um ambiente (quimiotático) de atração pelos macrófagos onde o seu acúmulo é o responsável pela formação do tecido de granulação. É indicado para feridas que podem estar infectadas ou colonizadas, em qualquer fase do processo de cicatrização (KENNEDY *et al.*, 2003).

Allevyn™ é indicado para o tratamento de feridas superficiais, com perda parcial ou total de tecido, úlceras de perna, úlceras por pressão, feridas malignas, feridas cirúrgicas, queimaduras de primeiro e segundo grau, áreas doadoras e feridas fúngicas. O curativo permite a formação e manutenção do meio úmido na superfície da ferida, reduz o risco da formação de escara e promove melhor cicatrização. Sua estrutura possui três camadas que promovem o controle da umidade: uma camada externa impermeável à água e bactérias, uma camada central absorve e retém o fluido e uma camada não-aderente de contato com a ferida absorve o excesso de fluido.

Mediante os diversos tratamentos preconizados para o tratamento de úlceras crônicas, o controle e a prevenção de ulcerações plantares necessitam de um conhecimento específico das características da úlcera para melhor escolha do tratamento. Uma abordagem multidisciplinar é necessária para determinação e eliminação dos fatores de risco, desbridamentos, identificação e alívio de áreas de pressão, controle de exsudação, educação do paciente para inspeção e cuidados com os pés e uso de calçado apropriado. Porém uma vez instalada a úlcera plantar hansênica, faz-se absolutamente necessário favorecer as condições locais por meio de adequadas terapias tópicas, curativos em especial, para dar suporte e viabilidade ao processo fisiológico de cicatrização (YAMADA, 2003).

Foram citadas opções terapêuticas de excelência capazes de gerar bons resultados na cicatrização de diversos tipos de úlcera, inclusive na úlcera perfurante plantar. No entanto, são curativos cujo fator limitante é o alto custo, estando distante da realidade socioeconômica

da grande maioria da população com úlceras crônicas. Então, com o objetivo de viabilizar um produto eficaz e de baixo custo que possa estar disponível no Sistema Único de Saúde, foi planejada a aplicação da membrana de *Calotropis procera* que tem grande potencial na indução da cicatrização de úlceras de difícil resolução.

1.5 Potencial farmacológico do látex de *Calotropis procera*

Calotropis procera (*C. procera*) (Ait.) R. Br, uma planta da família Apocynaceae, é original da África, Índia e Pérsia, atualmente encontra-se disseminada em regiões tropicais, por exemplo na América do Sul e tem distribuição fitogeográfica na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica. Esta planta medicinal destaca-se entre as espécies adaptadas ao semiárido no nordeste do Brasil. É conhecida popularmente como Ciúme, Hortêncica, Flor-de-seda. Tem características perene, arbustiva e pode atingir de 3 a 4 metros de altura. Apresenta intensa produção de látex branco, que flui em abundância quando o tecido é quebrado (JOLY, 1979).

Este fluido branco denominado látex é amplamente utilizado na medicina popular, principalmente da Índia, por apresentar diversas propriedades curativas (KIRTIKAR & BASU, 1935). No látex de *Calotropis procera*, várias moléculas já foram identificadas. Em análises químicas dos extratos brutos do látex, diversos compostos têm sido identificados, tais como cardenólídeos ativos, enzimas proteolíticas, alcalóides e carboidratos (SEIBER *et al.*, 1982), além de esteróides, terpenos e carbonatos orgânicos (GALLEGOS-OLEA *et al.*, 2002). Além disso, proteinases do tipo cisteínica, quitinases e enzimas relacionadas ao estresse oxidativo vegetal foram detectadas (FREITAS *et al.*, 2007). Recentemente, duas proteases cisteínicas (SINGH *et al.*, 2010) e uma osmotina com atividade antifúngica (FREITAS *et al.*, 2011) foram identificadas neste exsudado e Ramos *et al.*, em 2010 detectou a presença de proteína com atividade inibidora da papaína.

Do látex de *C. procera* foi isolada uma fração composta por proteínas denominada CpLP: CP corresponde às iniciais do nome da planta e LP denomina a fração proteica do látex. Foi ainda separada em três sub-frações: PI, PII e PIII. A fração PI apresentou propriedades imunomoduladoras que são benéficas para a prevenção de infecções bacterianas sistêmicas causadas pela bactéria intracelular *Listeria monocytogenes*. Após 24h do tratamento com CpLP_{PI} em ratos infectados, foi observado aumento de leucócitos nos focos infecciosos e o número de bactérias viáveis foi significativamente reduzido no fluido

peritoneal, fígado e corrente sanguínea (NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Muitos estudos demonstraram atividades biológicas de *C. procera*. Há relatos de respostas inflamatórias, analgésicos, larvicidas, antimicrobianos, nematicidas, atividades anticancerígenas e antipiréticas fracas. Em outros estudos mostra efeito benéfico no tratamento de Alzheimer e reduziu a glicemia em ratos diabéticos e teve atividade contraceptiva em ratos (SILVA *et al.*, 2010; LIMA *et al.*, 2012).

Outras atividades farmacológicas foram observadas com o látex íntegro extraído com solvente orgânico, como atividade antibacteriana (LARHSINI *et al.*, 1997) e atividade antifúngica contra *Candida albicans* (SEHGAL *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que a fração proteica do látex (LP) é um alvo para a apoptose provocada pela topoisomerase I do DNA em linhas celulares de câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2007). O extrato aquoso do látex, por via oral, também foi capaz de reduzir a diarreia em ratos induzida pela ingestão de óleo de mamona (KUMAR *et al.*, 2001), inibiu a inflamação em edema de pata induzida por Carragenina (KUMAR *et al.*, 2015) e reduziu as contorções abdominais induzida por ácido acético (DEWAN *et al.*, 2000).

Entretanto, dependendo da via de administração, o extrato aquoso deste látex induz processos pró-inflamatórios em animais (SINGH *et al.*, 2000; SHIVKAR; KUMAR, 2003). Em um modelo de infecção de murino por *Salmonella*, as proteínas do látex tiveram ação protetora de modo que aumentou a fagocitose e equilibrou a liberação de óxido nítrico na corrente sanguínea, evitando o choque séptico (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Outro trabalho mostrou que as proteases cisteínicas presentes no látex desta planta exibem atividades semelhantes a trombina e a plasmina e sugerem que essas proteínas possuem potencial terapêutico em várias condições associadas a anormalidades da coagulação (RAMOS *et al.*, 2012).

A fração CpLP_{PI} demonstrou redução do inchaço e melhores funções das articulações de ratos com artrite induzida por adjuvante de Freud. Houve redução dos níveis de GSH e TBARS, marcadores do estresse oxidativo. O efeito protetor da CpLP_{PI} foi comparável ao fármaco anti-inflamatório padrão, o diclofenaco, como também mostrou ação farmacológica benéfica via intraperitoneal no tratamento dos efeitos colaterais causados pelo quimioterápico Irinotecano (Mucosite intestinal), mostrando melhora nos parâmetros clínicos e inflamatórios (ALENCAR *et al.*, 2017; CHAUDHARY *et al.*, 2016).

Com relação à toxicidade e potencial alergênico, a fração protéica do látex (LP), exibiu efeitos adversos bastante discretos quando administrados oralmente em concentrações

mais elevadas e esta via de administração não estimulou reações imunológicas adversas (BEZERRA *et al.*, 2017).

Além das ações farmacológicas citadas, observou-se que a aplicação tópica diária do látex íntegro extraído com água reduziu a área de feridas induzidas no dorso de animais, sugerindo que o látex apresenta ação cicatrizante (RASIK *et al.*, 1999).

Em trabalho anterior a este, foi desenvolvida uma biomembrana à base de álcool polivinílico como um sistema de distribuição da fração LP (0,2 e 1% v/v de LP) para tratamento em úlceras de camundongos denominada BioMem CpLP. A membrana de PVA contendo LP (0,2% e 1%) acelerou significativamente a cicatrização de feridas através de formação do tecido novo mais rápido. Este processo foi acompanhado de fibroplasia intensificada e deposição de colágeno revelado por análises histológicas. O tratamento com a biomembrana induziu a migração de leucócitos (neutrófilos) mais intensa e degranulação de mastócitos durante a fase inflamatória do processo cicatricial (FIGUEREDO *et al.*, 2014). Do mesmo modo, induziu um aumento nos marcadores-chave e mediadores da resposta inflamatória (atividade mieloperoxidase, óxido nítrico, TNF e IL-1 β). Esses resultados demonstraram que a membrana acelera significativamente a fase inicial do processo inflamatório mediante a modulação da resposta inflamatória ao estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios. Este efeito notável melhora as fases subsequentes do processo de cicatrização (RAMOS *et al.*, 2016).

Com base nestes resultados, a membrana com proteínas do látex de *Calotropis procera* indica grande potencial terapêutico para cura de feridas, podendo promover, de modo muito satisfatório, a melhora de feridas crônicas, como na hanseníase. As úlceras de pacientes hansenianos, de modo geral, não conseguem avançar nos estágios normais da cicatrização devido ao comprometimento nervoso dos membros, portanto o potencial terapêutico de acelerar a fase inicial da cicatrização provido pela BioMem CpLP poderia auxiliar a cura dessas úlceras.

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele, o que onera o serviço público. Dentre estas estão as neurotróficas, geralmente de longa evolução, de resposta terapêutica difícil e são comuns em hanseníase, no alcoolismo e no diabetes *Mellitus* (BRASIL, 2016).

Há mais de 20 anos existe cura para hanseníase, porém as sequelas irreversíveis deixadas pela doença ainda incapacitam e prejudicam a qualidade de vida dos pacientes curados. Devido à lesão do nervo tibial posterior causada pela bactéria, ocorre perda de sensibilidade da região plantar, com graves consequências secundárias, como as úlceras plantares. Essas úlceras são de difícil cicatrização, podendo permanecer abertas por anos mesmo com o tratamento preconizado pelo SUS.

Existem no mercado diversos curativos modernos e eficazes para o tratamento de úlceras plantares, porém o custo é alto, sendo inviável a aquisição desses medicamentos pela população de baixa renda que, geralmente, sobrevive com auxílio do governo por serem impossibilitados de trabalhar. Além disso, o próprio SUS não consegue adquirir esses medicamentos por conta do orçamento reduzido.

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado excelentes resultados em estudos pré-clínicos com a biomembrana de CpLP, mostrando ser indutora na neoformação tecidual, participando ativamente na fase inflamatória da cicatrização e parece influenciar nas demais fases, promovendo a fibroplasia e colagênese (FIGUEIREDO *et al*, 2014; RAMOS *et al*, 2016). A BioMem CpLP também apresenta baixo custo e fácil elaboração.

Portanto, a relevância deste trabalho é justificada pela necessidade um tratamento acessível financeiramente e que acelere o processo cicatricial da úlcera plantar proporcionando melhor conforto aos pacientes, além de reduzir os gastos hospitalares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo pré-clínico e clínico piloto que avalie a eficácia e biocompatibilidade de uma biomembrana contendo proteínas isoladas do látex da planta *Calotropis procera* no processo de cicatrização de úlceras cutâneas crônicas de pacientes com sequelas da hanseníase.

3.2 Objetivos Específicos

Estudo *in vitro*

- Realizar o controle microbiológico da fração proteica de *Calotropis procera* (CpLP);
- Verificar atividade proteolítica na CpLP;
- Avaliar a citotoxicidade de CpLP em fibroblastos;
- Investigar o efeito proliferativo e migratório de CpLP em fibroblastos murinos;

Estudo clínico piloto

- Determinar o perfil clínico e sócio econômico dos pacientes com sequelas da hanseníase e tratados no CDERM;
- Avaliar possível reação de hipersensibilidade das proteínas do látex de *C.procera* em pacientes saudáveis e com sequelas da hanseníase;
- Analisar a eficácia do tratamento com a biomembrana de *Calotropis procera* em úlceras plantares de pacientes com sequelas da hanseníase.
- Comparar com o tratamento padrão com Sulfadiazina de prata.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento da fração

A fração de proteínas utilizadas neste trabalho foi extraída do látex da planta *Calotropis procera* (Ait) R. Br. (Apocynaceae). Esta espécie vegetal foi identificada pelo Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), onde o exemplar de exsicata N. 32.663 foi depositado. A coleta do látex foi realizada no período da manhã, através de incisões no ápice caulinar de plantas saudáveis em tubos do tipo Falcon com água destilada (1:2 v/v). Após a coleta, os tubos foram levemente agitados e mantidos à temperatura ambiente até o seu processamento no laboratório (FIGUEIREDO *et al*, 2014).

O processamento do látex foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais da Universidade Federal do Ceará, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Inicialmente, o látex foi submetido à centrifugação a 5.000 x g; 10°C por 10 minutos e o precipitado obtido, constituído principalmente de borracha, foi descartado. O sobrenadante foi, então, submetido à diálise contra água destilada (1:10 v/v) a 8 °C durante 60 horas, com trocas da água a cada 4 horas, utilizando uma membrana de diálise com capacidade de retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. Em seguida, o material foi novamente centrifugado sob as mesmas condições anteriores, e um sobrenadante límpido, rico em proteínas e destituído de borracha foi obtido (ALENCAR *et al.*, 2006). Esta fração, designada como Proteínas do Látex (CpLP), foi liofilizada e utilizada na confecção das biomembranas testadas nos experimentos deste trabalho.

4.2 Controle de qualidade microbiológico

A fração proteica utilizada foi submetida ao controle microbiológico para assegurar a ausência de microorganismos patogênicos. Para preparo das amostras, foram homogeneizados 10mL de uma solução 1mg/mL das proteínas em 90mL de Ágar caseína-soja. Após cinco dias, foi analisado o crescimento bacteriano. As amostras também foram adicionadas em Ágar Sabouraud-dextrose a 22,5°C ± 2,5°C por 7 dias e posterior avaliação do crescimento fúngico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). As análises foram realizadas no laboratório de Controle microbiológico da UFC.

4.3 Elaboração da biomembrana

A membrana foi preparada conforme descrito no trabalho de FIGUEIREDO *et al*, 2014. Inicialmente, foi preparada uma solução de Poli álcool vinílico (PVA) 1% m\v, sob aquecimento e agitação até solubilização completa. Posteriormente, as proteínas foram adicionadas a solução de PVA 1% para concentração de 10% p/p. Foi adicionado 0,022g de CpLP em 22 mL da solução de PVA 1% (o peso de PVA após evaporação da água é 0,22g) em cada placa de *petri* descartáveis e estéreis (90 mm x 15 mm). As placas foram colocadas em estufa a 40° C com circulação de ar até a evaporação total da água. Após a evaporação do solvente, formou-se uma película denominada BioMem CpLP e colocada em embalagem cirúrgica para esterilização em luz UV por 15 minutos.

4.4 Atividade proteolítica da biomembrana por difusão em gel de agarose

A atividade proteolítica foi mensurada por teste bioquímico utilizando a caseína em gel de agarose como substrato para amostras da BioMem CpLP. Inicialmente, foi preparado o gel de agarose 1% m\v em tampão Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 a60°C até solubilização completa do soluto. Esta solução foi despejada em placas de petri (90 mm x 15mm) para resfriamento e formação do gel. Paralelamente, foi preparada uma solução de caseína 1% m\v no mesmo tampão e colocada em banho-maria a 100 °C por 20 minutos com posterior filtração. A solução de caseína foi adicionada ao gel por 15 minutos e depois foi retirado o excesso de caseína. Foram preparadas três membranas diferentes: BioMem CpLP, uma membrana somente com PVA e outra membrana com tripsina, o controle positivo de ação proteolítica. Foi retirado uma circunferência de 3mm de cada membrana e colocadas cuidadosamente na superfície do gel de agarose + caseína e mantidas a 37 °C em ambiente úmido. Após 24h, a atividade proteolítica foi visualizada pela formação de um halo transparente que representa a degradação da caseína (DAMETTO *et al.*, 2000).

4.5 Protocolos *in vitro*

4.5.1 Cultivo celular

As células utilizadas foram Fibroblastos Murinos linhagem NCTC clone 929 [L CELL, L-929], de origem de tecido conectivo adiposo, adquiridas no banco de celular do Rio de Janeiro.

No cultivo celular, os fibroblastos murinos L929 desenvolveram-se em culturas aderentes cultivadas em garrafas plásticas (poliestireno) estéreis por radiação gama do fabricante Kasvi[®]. O meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco[®]) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco[®]) e com penicilina 10.000 u/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL (1%) foram adicionados às garrafas. As células foram mantidas em estufa sob atmosfera contendo 5% de CO₂ à temperatura de 37°C. Para o armazenamento das linhagens, as células, foram suspensas em meio de cultura suplementado com 10% SFB e 5% de DMSO e armazenadas em nitrogênio líquido.

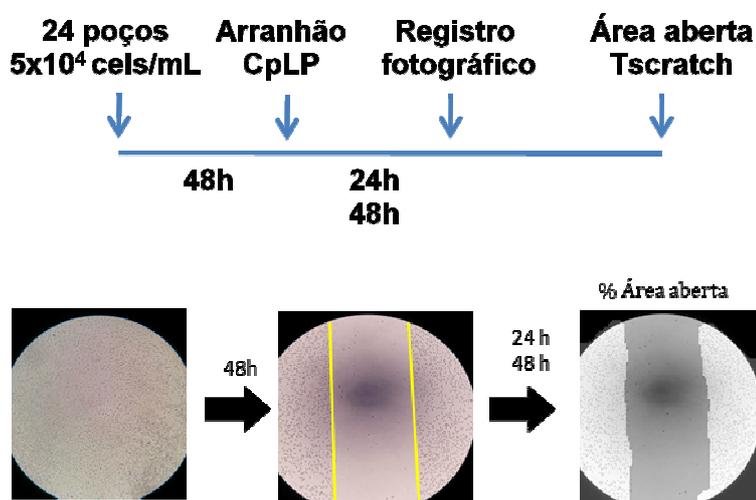
4.5.2 Ensaio de Citotoxicidade pelo método MTT com fibroblastos L929 sem soro fetal bovino

Este ensaio mede a atividade mitocondrial das células viáveis em metabolizar o corante MTT [3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromide] em sais de formazan, método originalmente proposto por Mosmann (1983). Após o tratamento para preparação da suspensão de células, foi realizada a contagem celular em Câmaras de Neubauer e calculada o volume de células necessário para obter uma população de 2×10^4 cels/mL. Inicialmente, para o teste de viabilidade, foram utilizadas placas de cultivo celular com 96 poços (Kasvi[®]) para o plaqueamento em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24h necessárias para adesão das células na placa, foi retirado o meio DMEM 10% de SFB e adicionado DMEM sem SFB para evitar interferências deste fator de proliferação na avaliação da toxicidade de CpLP. Após adição do meio de cultura, foi adicionado CpLP (20µL/poço) nas concentrações 12,5 µg/mL ; 6,25 µg /mL; 3,125µg /mL; 1,56µg /mL e 0,78µg /mL, N=8 poços/ concentração. Também foram incluídos os grupos somente com DMEM 10% de SFB como controle positivo e um grupo somente com o veículo, neste caso a água. Terminado o tempo de incubação, foi adicionado 20µL da solução de MTT 1mg/mL e após 3 horas, todo o líquido dos poços foi retirado deixando apenas o sal roxo formado para posterior solubilização com 150µL DMSO (dimetilsufóxido) e mensuração em leitor de ELISA a 540nm (CHOI *et al.*, 2016). As absorbâncias foram analisadas e utilizadas para a obtenção dos percentuais de viabilidade celular utilizando a média do grupo DMEM 10% como controle.

temperatura de 4°C por no mínimo 1 hora. Após o período de fixação, as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada, em seguida adicionou-se 100 µL da solução de SRB a 0,4% e as placas então foram mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 30 minutos. Ao término do tempo de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes usando ácido acético a 1% para remover o excesso de SRB que não ficou ligado aos aminoácidos celulares. Para realizar a leitura das placas, o SRB que estava ligado aos aminoácidos fixados, foi solubilizado em 200 µL de tampão tris base 10 mM a 4°C, e homogeneizadas em mesa agitadora (shaker) por pelo menos 10 minutos, em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em leitor de placa (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 570 nm. Os resultados foram expressos pelos valores de viabilidade celular.

4.5.5 Ensaio de cicatrização *in vitro* (“scratch”) em fibroblastos L929

O ensaio mostra o efeito sobre a migração e proliferação dos fibroblastos após causar um espaço na monocamada celular chamado de “scratch”. O plaqueamento foi realizado com a população de 5×10^4 em 1mL de DMEM 10% após 48 horas, tempo necessário para completa formação da monocamada, retirou-se o meio e foi realizado o arranhão com auxílio de uma ponteira. Posteriormente, os poços foram lavados com 1mL de PBS a fim de retirar restos celulares suspensos, adicionou-se 900µL de DMEM2,5% mais 100µL da solução aquosa de CpLP nas concentrações 3,125µg /mL; 1,56µg /mL; 0,78µg /mL. Os grupos controles DMEM 2,5% e DMEM 10% receberam 1mL de meio. A migração e proliferação foi mensurada pela análise do registro fotográfico do arranhão após 24 e 48 horas comparado com o registro inicial através do software TScratch (RÄSÄNEN E VAHERI, 2010; GEBÄCK *et al*, 2009).



$$\% \text{ \u00c1rea aberta} = \frac{\text{\u00c1rea no tempo } x \cdot 100}{\text{\u00c1rea no tempo } 0}$$

4.5.6 Confirma\u00e7\u00e3o da prolifera\u00e7\u00e3o de fibroblastos L929 por teste de exclus\u00e3o com azul de Trypan

Com o objetivo de mensurar a prolifera\u00e7\u00e3o celular, foi realizado o ensaio com o corante azul de Trypan para contagem celular ap\u00f3s incubac\u00e3o com CpLP (BARILE, 1994). O plaqueamento foi realizado com a popula\u00e7\u00e3o de 5×10^4 cels/mL em 1 mL de DMEM 10%, ap\u00f3s 24 horas foi acrescentado 100 μ L de CpLP 3,125 μ g /mL; 1,56 μ g /mL; 0,78 μ g /mL. Tamb\u00e9m foram inclu\u00eddos os grupos somente com DMEM 2,5% de SFB e DMEN 10% para controle positivo. Ap\u00f3s 48h, foi iniciado o processo de retirada do meio, lavagem com PBS, tratamento com tripsina e centrifuga\u00e7\u00e3o 1500 rpm por 5 minutos. As c\u00e9lulas foram ressuspendidas e foi preparada uma suspens\u00e3o com azul de trypan 0,4% para posterior contagem na C\u00e2mara de Neubauer. Os resultados foram expressos pelo n\u00famero de c\u00e9lulas vi\u00e1veis/mL.

4.6 Estudo cl\u00ednico piloto

4.6.1 Tipo de estudo

Este estudo foi observacional, prospectivo e randomizado com vari\u00e1veis quantitativas e abordagens qualitativas (g\u00eanero, idade, medica\u00e7\u00e3o utilizada, tipo de les\u00e3o) com a utiliza\u00e7\u00e3o da biomembrana de *C. procer*a e Sulfadiazina de prata em 9 pacientes com 12 \u00falceras plantares decorrentes da Hansen\u00edase.

O estudo foi desenvolvido no Centro de Dermatologia Sanit\u00e1ria Dona Lib\u00e2nia (CDERM) e no N\u00facleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Cear\u00e1. Esta pesquisa cl\u00ednica foi devidamente aprovada pelo Comit\u00ea de \u00c9tica em Pesquisa dos dois centros participantes com n\u00famero do parecer: 2.124.872.

4.6.2 Sele\u00e7\u00e3o dos sujeitos da pesquisa

Participaram do estudo 9 pacientes com 12 \u00falceras plantares e que atendam aos crit\u00e9rios de inclus\u00e3o e exclus\u00e3o.

Critérios de inclusão:

- Ser paciente com tratamento finalizado contra hanseníase e ter cadastro no Centro de Dermatologia Dona Libânia;
- Idade entre 18 e 65 anos;
- Residência em Fortaleza;
- Apresentar úlcera perfuro-plantar de extensão menor ou igual a 24 cm² e ausência de infecção no leito da lesão;
- Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo e agir de acordo com os requerimentos do protocolo, o que será confirmado pela assinatura do TCLE.

Critérios de exclusão:

- Ser portador de câncer, hipertensão não controlada, insuficiência renal ou hepática;
- Mulheres em período gestacional ou amamentando;
- Apresentar úlcera maior que 24 cm²;
- Presença de história clínica de alergia a componentes presentes nas formulações que serão utilizadas no estudo;
- Paciente diabético descompensado;

Critérios de descontinuação e retirada do voluntário:

- Desenvolvimento de infecção no leito da ferida e proximidades;
- Aplicação tópica de produtos não adotados no protocolo do estudo clínico;
- Ocorrência de efeitos adversos, ou sinais e sintomas sugestivos de toxicidade à membrana com necessidade de suspensão da administração do medicamento em estudo;
- Desistência voluntária;
- Presença de reação hipersensibilidade por “patch test”.

4.6.3 Avaliação clínica (para inclusão dos pacientes no estudo)

Os pacientes que aceitaram participar, primeiramente assinaram o termo de consentimento (ANEXO I) e passaram por uma entrevista inicial, onde foi feita a caracterização socioeconômica, bem como informações de saúde, história de hipersensibilidade aos componentes das formulações das biomembranas, além do histórico de atopia e avaliação clínica das úlceras (ANEXO II).

4.6.4 Exame de hipersensibilidade

Para garantir a segurança dos pacientes e por ser um produto novo, foi realizado um levantamento clínico-epidemiológico da hipersensibilidade em geral e aos componentes da membrana. Também foi realizado o “patch test” visando evidenciar alguma reação alérgica de hipersensibilidade ao produto. Estes testes foram feitos após a aplicação do TCLE e antes do uso do composto no leito da ferida.

Dentre os pacientes do grupo tratado com a biomembrana, foi realizado o “patch test” que consiste na aplicação, sobre as costas do paciente, de uma fita adesiva com câmaras contendo os componentes da membrana separadamente: PVA, fração do látex de *Calotropis procera* e, como controle negativo, solução fisiológica 0,9%. A interpretação do “patch test” foi baseada nas leituras realizadas após 48 e 96 horas, utilizando-se o critério de cruzes conforme segue abaixo (FRADE *et al.*, 2011; MOTA *et al.*, 2005).

Critérios para interpretação do “patch test”:

| | |
|-----|---|
| - | Negativo |
| ? | Duvidoso - leve eritema (vermelhidão) |
| + | Positivo fraco - eritema e pápulas (elevação formando pequena placa) |
| ++ | Positivo forte - eritema, pápulas e vesículas (pequenas bolhas) |
| +++ | Positivo muito forte - eritema intenso, pápulas e vesículas confluentes podendo formar bolhas |

(MOTTA *et al.*, 2005).

4.6.5 Grupos da pesquisa

Os 9 pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos para a execução do ensaio clínico piloto, foram incluídos no projeto, atendendo os requisitos dos critérios de inclusão. O grupo tratado com Sulfadiazina recebeu 3 pacientes (5 úlceras) e 6 pacientes receberam (7 úlceras) a membrana com tratamento.

- Tratamento convencional: tratamento com o creme de Sulfadiazina de prata;
- BioMem CpLP: tratamento tópico com a membrana contendo proteínas do látex de *Calotropis procera*.

4.6.6 Avaliação da eficácia (Parâmetros de avaliação)

A avaliação da eficácia da biomembrana nas úlceras plantares foi realizada através da contração da úlcera através da área reduzida, da avaliação clínica da ferida (necrose, epitelização, granulação) e da análise histopatológica.

Para tanto, os pacientes compareceram ao ambulatório de curativos do Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia três vezes por semana, em dias alternados, no qual eram tratados com Sulfadiazina ou BioMem CpLP e faziam um novo curativo. O tratamento foi de no mínimo dois meses.

Medida das Lesões

Semanalmente, as úlceras foram mensuradas com régua milimetrada para mensuração de úlceras e determinação do diâmetro maior e diâmetro menor e calcular a área.

A contração da úlcera foi mensurada pela comparação da área atual com a área inicial:

$$\text{Área da lesão} = \frac{D * d * \pi}{4 * 100}$$

$$\text{Contração da lesão} = \frac{A_i - A_f}{A_i * 100}$$

Legenda: D: diâmetro maior; d: diâmetro menor; π : 3,14; A_i : área inicial; A_f : área final

Avaliação Macroscópica

As úlceras foram avaliadas com auxílio do Técnico de Enfermagem do CDERM Raimundo a cada 30 dias, de acordo com o teste de McNemar modificado, que avalia necrose, granulação e reepitelização (ANEXO IV) (FRADE, 2003). Para cada parâmetro (necrose, granulação e reepitelização), foram considerados individualmente, os resultados como progressivos aqueles que apresentaram um aumento no número de cruces no período de 60

dias de tratamento. Como regressivos, aqueles que apresentaram uma diminuição no número de cruces no decorrer dos 30 dias de tratamento e indiferentes àqueles que não apresentaram variação no número de cruces no mesmo período. Semanalmente, foi feito um registro fotográfico da úlcera com câmera Nikon® e autorização prévia realizada através do Termo de Consentimento de Imagem (ANEXO III).

Escores dos parâmetros necrose, granulação e reepitelização (ANEXO IV).

| | |
|-----|--|
| + | Até 1/3 da área superficial da lesão |
| ++ | Até 2/3 da área superficial da lesão |
| +++ | Mais de 2/3 da área superficial da lesão |

Análise Histopatológica

Para análise microscópica das úlceras, foi realizada uma biópsia incisional após 60 dias de tratamento de ambos os grupos. As biópsias foram realizadas com o instrumento cirúrgico “punch” de 3mm na borda da úlcera no intuito de se retirar o mínimo de tecido para não causar danos ao paciente. O material foi acondicionado solução de formol a 10% por cerca de 24 horas e, após esse período, colocada em solução de etanol a 95%. As amostras foram incluídas em parafina para posterior preparo das lâminas e coloração em hematoxilina-eosina (HE).

As lâminas foram avaliadas pela patologista Denise Nunes Oliveira de maneira qualitativa quanto à presença ou ausência de necrose e processo inflamatório, bem a neoformação vascular. Também se avaliou a incidência de fibrose colagênica.

4.7 Análise estatística

Os dados dos experimentos *in vitro* dos teste do MTT, SRB, “scratch” e Trypan foram expressos como a média \pm erro padrão Analisados pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste Bonferroni para comparação múltipla das médias. Para as análises das taxas de reduções percentuais no 60º dia dos resultados do mesmo grupo, foi utilizado o teste não paramétrico Wilcoxon, enquanto que a análise entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

5 RESULTADOS

Neste trabalho foram desenvolvidos experimentos a fim de investigar o efeito de CpLP em fibroblastos buscando a concentração não tóxica e se a fração atua diretamente na proliferação desta célula, como também teve o propósito de avançar no conhecimento do potencial cicatrizante desta fração proteica em seres humanos, dando início a um estudo clínico piloto.

5.1 Resultados *in vitro*

5.5.1 A BioMem CpLP apresenta atividade proteolítica

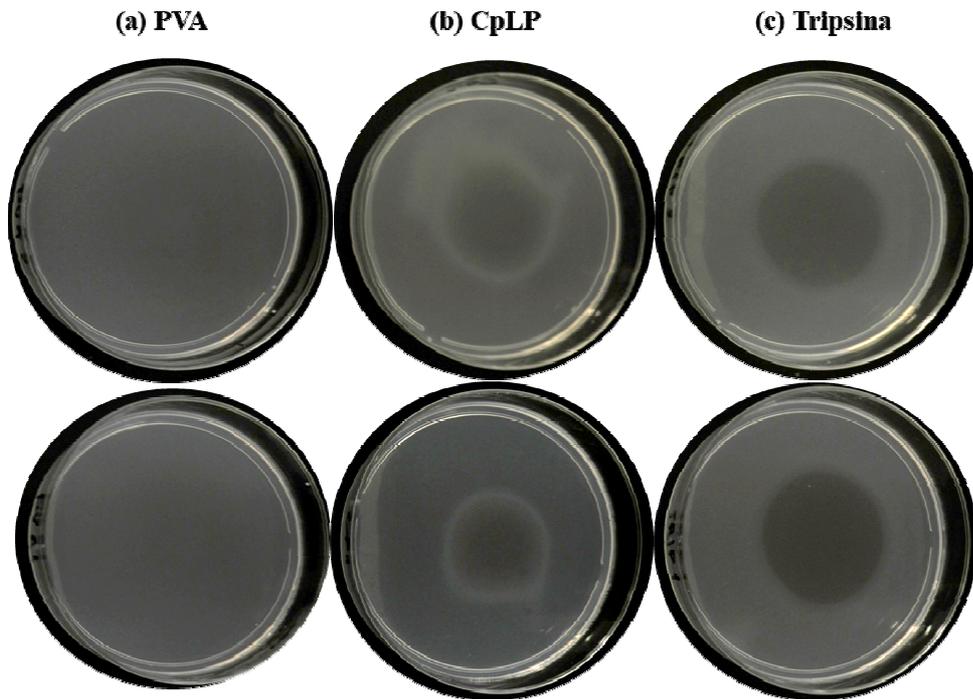
Para garantir a qualidade da amostra de proteínas do látex, foram desenvolvidos testes para identificar possível contaminação bacteriana na matéria-prima utilizada. Não houve proliferação bacteriana e nem crescimento fúngico constatado pelos testes de Ágar Caseína-Soja e Ágar Sabouraud, respectivamente.

Com relação às propriedades físico-químicas da fração CpLP, sabe-se que possui atividade proteolítica, propriedade que pode estar envolvida na cicatrização. As proteases podem agir como agente desbridante de lesões promovendo uma limpeza enzimática e retirando o tecido desvitalizado. Inúmeros curativos foram desenvolvidos visando tais proteases na tentativa de promover a cicatrização (MCCARTY e PERCIVAL, 2013).

Para confirmar a atividade proteolítica na BioMem CpLP, foi realizado um teste que demonstra a degradação da caseína em gel de agarose. A caseína funciona como substrato para ação enzimática das proteases. Neste experimento, a caseína foi incluída em gel de agarose e posteriormente foi colocado no centro da placa uma porção circular de 3 mm da BioMem CpLP, da mesma maneira, foram feitas placas com membranas de tripsina e PVA.

A degradação da caseína forma um halo transparente pela ação enzimática das proteases, fato que foi observado após 24 horas da membrana em contato com o gel. Este teste constatou que a BioMem CpLP conserva atividade proteolítica da fração proteica mesmo após os processos de produção da membrana (Figura 4).

Figura 4 – Atividade proteolítica representada pelo halo transparente no centro do gel.

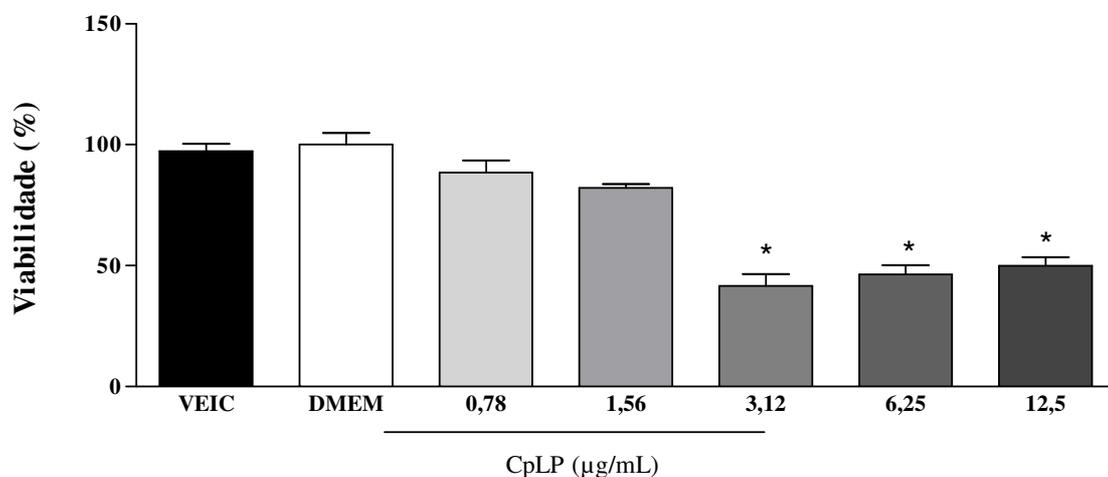


Foram retirados uma circunferência de 3 mm das membranas contendo somente PVA (a), CpLP (b) e Tripsina (c) e colocadas no centro do gel de agarose contendo caseína, substrato para as proteases. Cada amostra foi feita em duplicata. Após 24 horas, foi realizado o registro fotográfico e medida do halo com régua milimetrada: (a) não apresentou halo; (b) 3 e 3,2mm; (c) 3,8 e 3,8mm.

5.1.2 CpLP não reduz a viabilidade de fibroblastos L929 em baixas concentrações

As proteínas do látex de *C. procera*, reduziram a viabilidade nas concentrações a partir de 3,12 µg/mL enquanto que nas concentrações de 1,56 e 0,78 µg/mL não houve morte celular significativa pelo método do MTT (Figura 5). A concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) é 9,83 µg/mL. Portanto, estas duas concentrações mantêm a viabilidade dos fibroblastos. Este resultado inicial proporcionou a escolha das concentrações nos outros testes.

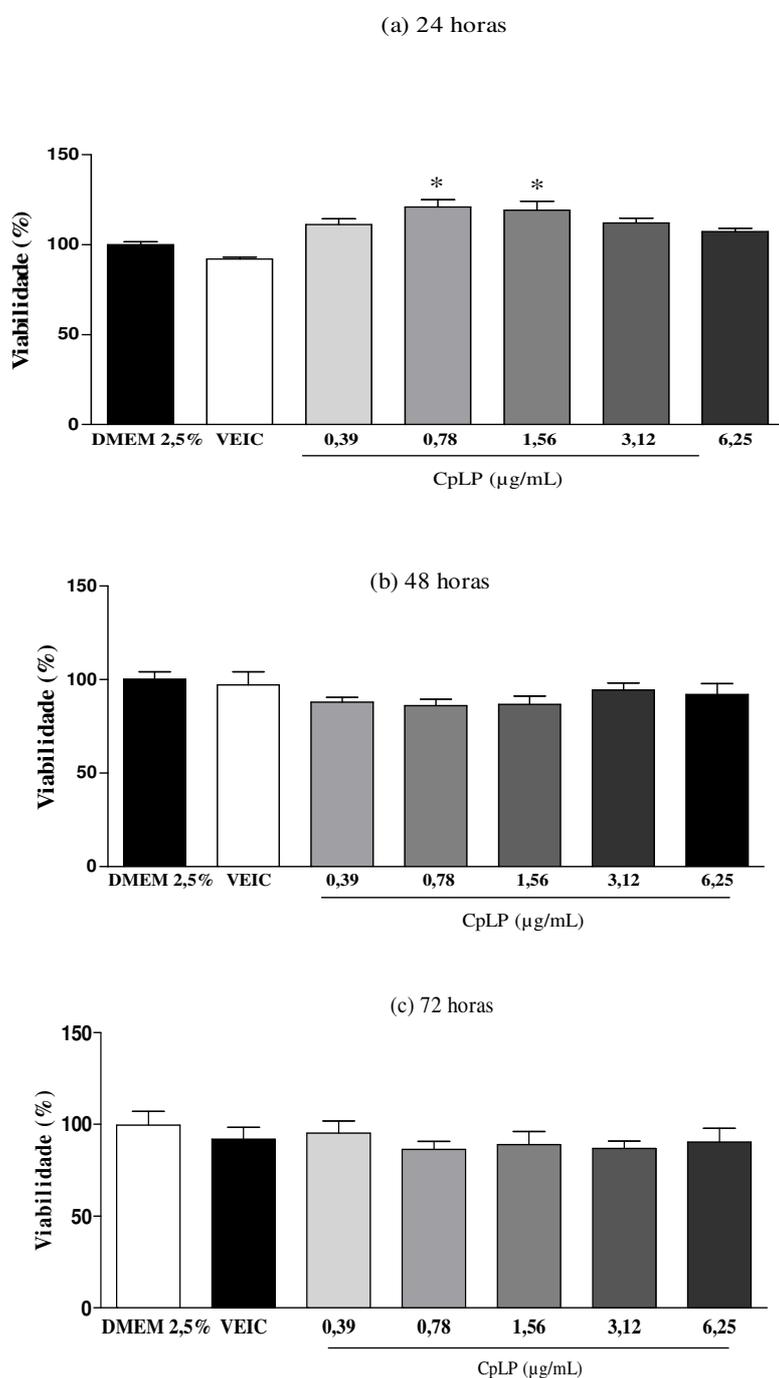
Figura 5 – Citotoxicidade de CpLP sobre fibroblastos L929 em DMEM sem SFB pelo teste do MTT.



Fibroblastos L929 foram adicionados em placas de 96 poços com população de 2×10^4 células/poço. Após 24 horas da administração de CpLP, foi adicionado o MTT e, após 3 horas, o sal de formazan foi mensurado em leitor de ELISA (540nm). As barras representam a média \pm EPM dos valores de viabilidade obtidos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado com o grupo DMEM (n=8 poços/concentração; ANOVA - teste de Bonferroni).

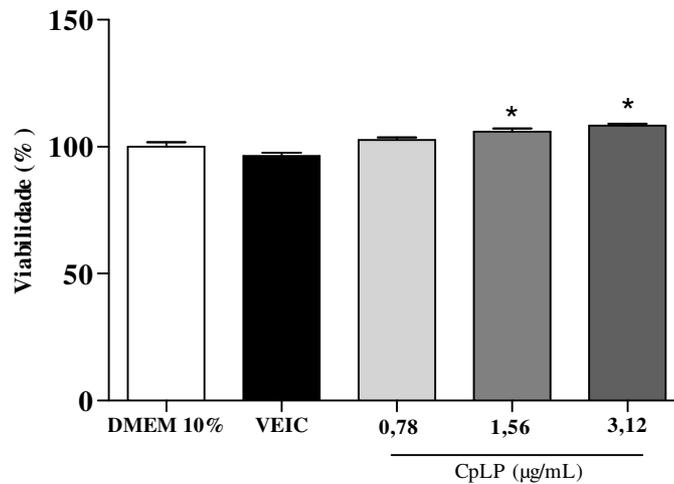
O mesmo teste foi realizado com fibroblastos mantidos com SFB 2,5% no intuito de investigar a toxicidade agora com o mínimo de estímulo proliferativo também pelo ensaio do MTT. As células foram incubadas com a droga por 24, 48 e 72 horas e como controle negativo os grupos somente com o veículo (água) e com DMEM 2,5% de SFB, suficiente para manter a taxa de proliferação celular. Após 24 horas de incubação com CpLP, houve um aumento significativo dos fibroblastos do grupo que recebeu as concentrações de 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$ comparado com o controle DMEM 2,5% (Figura 6.a). Este efeito não foi visualizado após 48 e 72 horas (Figuras 6.b e 6.c). As mesmas concentrações utilizadas no método do MTT também não apresentaram toxicidade pelo método do SRB, inclusive as concentrações de 1,56 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento significativo na viabilidade celular comparadas com o grupo controle e o grupo somente com o veículo (Figura 7).

Figura 6 - Citotoxicidade de CpLP sobre fibroblastos L929 após 24, 48 e 72 horas pelo teste do MTT.



Fibroblastos L929 foram semeados em placas de 96 poços com população de 2×10^4 células/mL. Após 24, 48 e 72 horas da administração de CpLP, foi adicionado o MTT e, após 3 horas, a coloração roxa evidenciada pelo sal de formazan foi mensurada em leitor de ELISA (540nm). Os dados representam a média \pm EPM dos valores de viabilidade obtidos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada ao grupo VEÍCULO ($n=8$ poços/grupo; ANOVA - teste de Bonferroni).

Figura 7 - Citotoxicidade de CpLP sobre fibroblastos L929 após 24 horas pelo teste do SRB

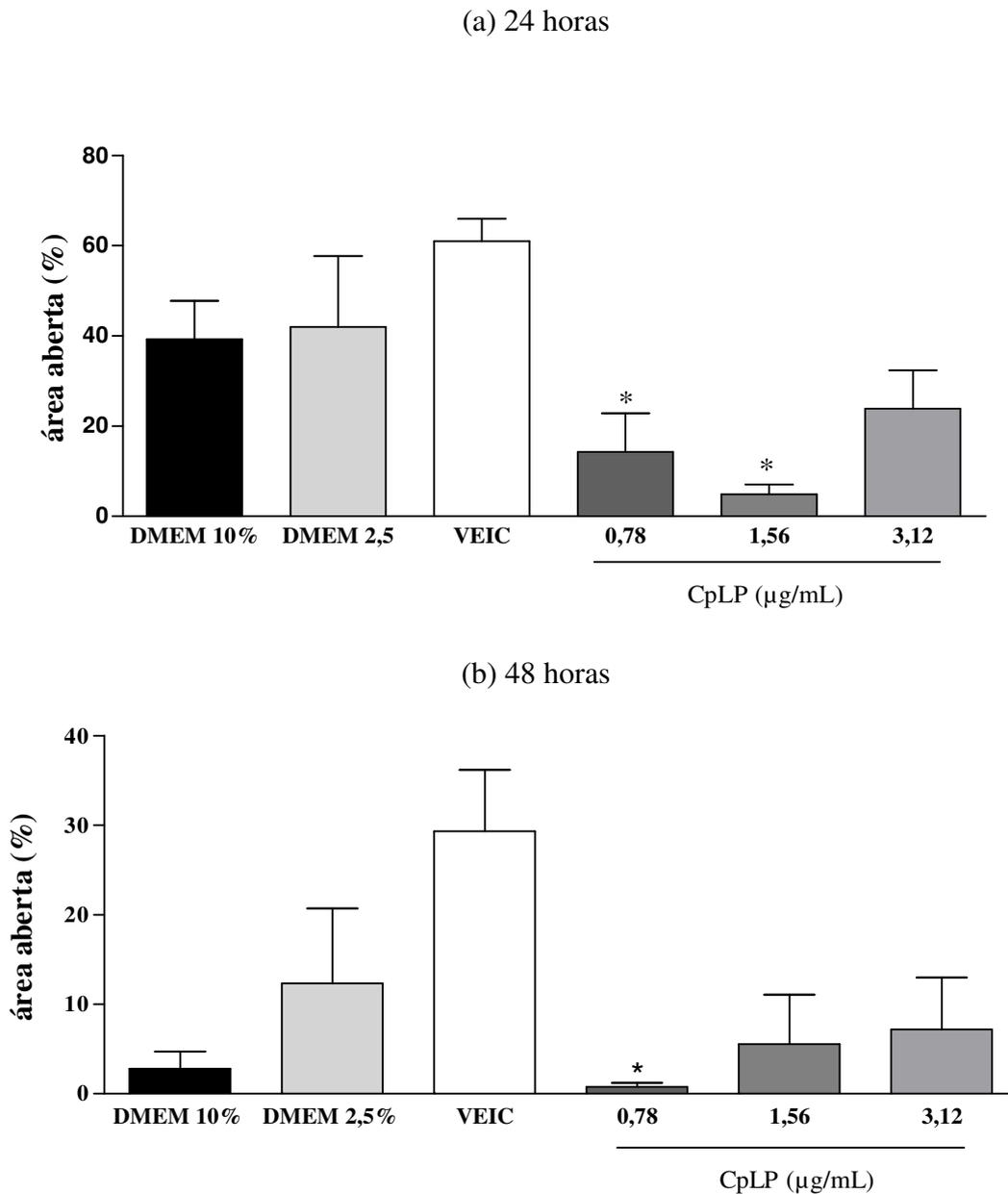


Fibroblastos L929 foram semeados em placas de 96 poços com população de 2×10^4 células/mL. Após 24 horas da administração de CpLP, as células foram fixadas, foi realizada a coloração com SRB para posterior solubilização em tampão tris base e as absorbâncias foram mensuradas em leitor Fisher Scientific leitura (570nm). Os dados representam a média \pm EPM dos valores de viabilidade obtidos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada ao grupo VEÍCULO (n=8 poços/grupo; ANOVA - teste de Bonferroni).

5.1.3 CpLP induz a proliferação e migração de fibroblastos L929

O teste do “scratch” consiste em gerar um arranhão na monocamada de células e avaliar a redução da área sem células, chamada de área aberta. As concentrações 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$ de CpLP reduziram consideravelmente a área aberta do arranhão após 24 horas em contato com as células comparado com o grupo veículo. A intensa proliferação e migração continuaram após 48 horas com a concentração de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8.a e 8.b).

Figura 8 - Efeito de CpLP sobre proliferação e migração de fibroblastos L929 no teste do “scratch”

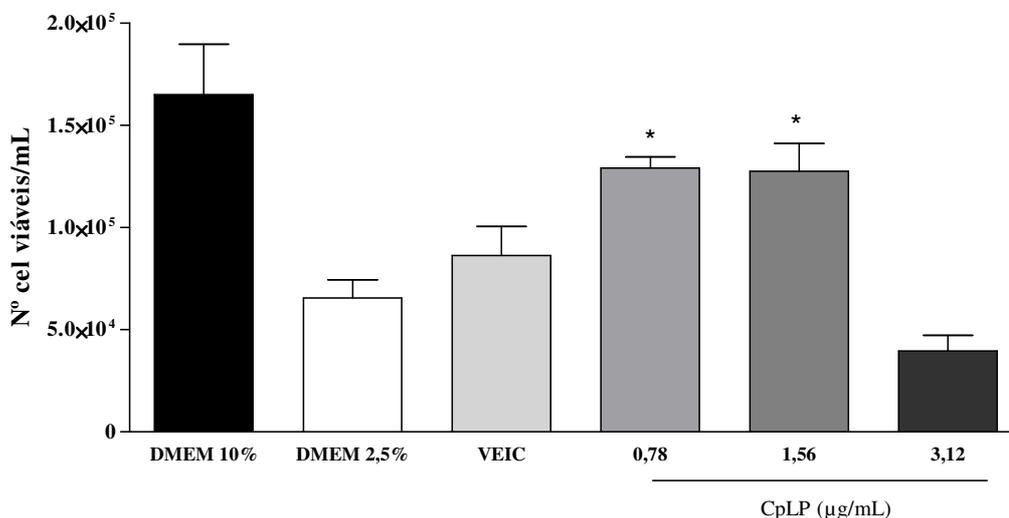


Fibroblastos L929 foram adicionados em placas de 24 poços numa população de 5×10^4 /poço. Após 24 (a) e 48 horas (b) da administração de CpLP, foi medido a área aberta através do software TScratch. As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparada ao grupo VEÍCULO ($n=8$ poços/grupo; ANOVA - teste de Bonferroni).

Outro teste amplamente utilizado com o objetivo de contabilizar a proliferação celular é por contagem direta de células com o Azul de Trypan. Este teste é complementar ao do Scratch, pois contabiliza diretamente as células viáveis. Após 48 horas de incubação houve um aumento significativo no número de células por poço no grupo tratado com 0,78 e 1,56

$\mu\text{g/mL}$ de CpLP quando comparado ao grupo DMEM 2,5% de SFB (Figura 8). O grupo DMEM 10% foi usado como controle positivo da proliferação.

Figura 9- Efeito de CpLP sobre o número de fibroblastos corados pelo Azul de Trypan



Fibroblastos L929 foram adicionados em placas de 24 poços numa população de 5×10^4 /poço. Após 48 horas da administração de CpLP, foi contabilizado o número de células na Câmara de Neubauer (n^0 de céls contadas/ n^0 de quadrantes $\times 10\ 000$). As barras representam a média \pm EPM dos valores obtidos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística comparado ao grupo VEÍCULO ($n=8$ poços/concentração; ANOVA - teste de Bonferroni).

5.2 Resultados do estudo clínico piloto

Os pacientes foram orientados sobre o estudo, assinaram o TCLE (Anexo 1) e foram selecionados para cada grupo de maneira aleatória. Inicialmente, cada paciente foi questionado sobre seu histórico clínico, doenças associadas bem como características demográficas (Anexo 2). Os pacientes tinham em média 47,65 anos, a maioria homens (88,9%) e 3 estavam ativos no mercado de trabalho, os demais estavam incapazes de trabalhar por conta das úlceras e se aposentaram (Tabela 1).

Por se tratar de novo produto para saúde, é possível a manifestação de reações alérgicas, então, antes de iniciar o tratamento, os pacientes do grupo tratado com BioMem CpLP relataram seus antecedentes de hipersensibilidade (Tabela 2) e fizeram o “patch test”. Apenas um paciente relatou alergia alimentar a suíno e outro paciente informou reação alérgica a curativos feitos com esparadrapo. Nenhum paciente apresentou eritema, pápulas ou qualquer indício de reação alérgica tópica no “patch test”.

Tabela 1 – Caracterização demográfica dos pacientes com úlceras plantares

| Características Clínicas | | Grupo BioMem CpLP e Controle (n=9) |
|---------------------------------|------------|---|
| Idade | Média | 47,65 anos |
| | Mínima | 41 anos |
| | Máxima | 65 anos |
| Sexo | Masculino | 88,9 % |
| | Feminino | 11 % |
| Cor | Branca | 11 % |
| | Não branca | 88,9 % |
| Profissão | Aposentado | 66,6 % |
| | Pedreiro | 11 % |
| | Porteiro | 11 % |
| | Doméstica | 11 % |

Tabela 2 – Antecedentes pessoais de hipersensibilidade dos pacientes

| Antecedentes pessoais para alergia | Grupo BioMem CpLP e Controle (n=9) | |
|---|---|----------|
| | N | % |
| Negativos | 7 | 75 |
| Dermatite de contato | 0 | 0 |
| Asma | 0 | 0 |
| Rinite | 0 | 0 |
| Urticária | 0 | 0 |
| Alimentos | 1 | 11% |
| Medicamentos | 0 | 0 |
| Insetos | 0 | 0 |
| Adesivos (esparadrapos) | 1 | 11% |

Semanalmente, os pacientes foram avaliados pelo tamanho e presença de necrose ou fibrina, granulação e tecido de reepitelização. Com o auxílio de uma régua milimetrada, foram medidos os diâmetros maior e menor para cálculo da área. Os pacientes dos dois grupos evoluíram bem ao passo que a úlcera de três dos sete pacientes tratados com BioMem CpLP cicatrizaram completamente (MGS, DBB e VAL pé esquerdo) e as demais reduziram, em média, 82,67 % do tamanho da úlcera (Tabela 4). As úlceras tratadas com Sulfadiazina de prata reduziram em média de 62,4%, exceto por um paciente que teve uma piora considerável, sua úlcera aumentou consideravelmente de tamanho. Um paciente tratado com Sulfadiazina de prata teve úlcera cicatrizada completamente em 60 dias de tratamento (Tabela 3).

As figuras 10 (a) e (b) mostram a evolução das úlceras durante o tratamento. É possível observar que nenhum paciente tratado com BioMem CpLP teve piora na úlcera, fato que é demonstrado no grupo controle. Com relação à contração da ferida, houve aumento significativo após 60 dias de tratamento quando comparado ao 15º dia no grupo que recebeu a BioMem CpLP (Figura 11). Comparando os mesmos dias, não houve aumento significativo da contração dos pacientes tratados com Sulfadiazina de prata. Este dado constata que a biomembrana reduziu de maneira considerável ($p=0,015$) a área das úlceras após dois meses de tratamento. Não houve diferença estatística da contração entre os grupos.

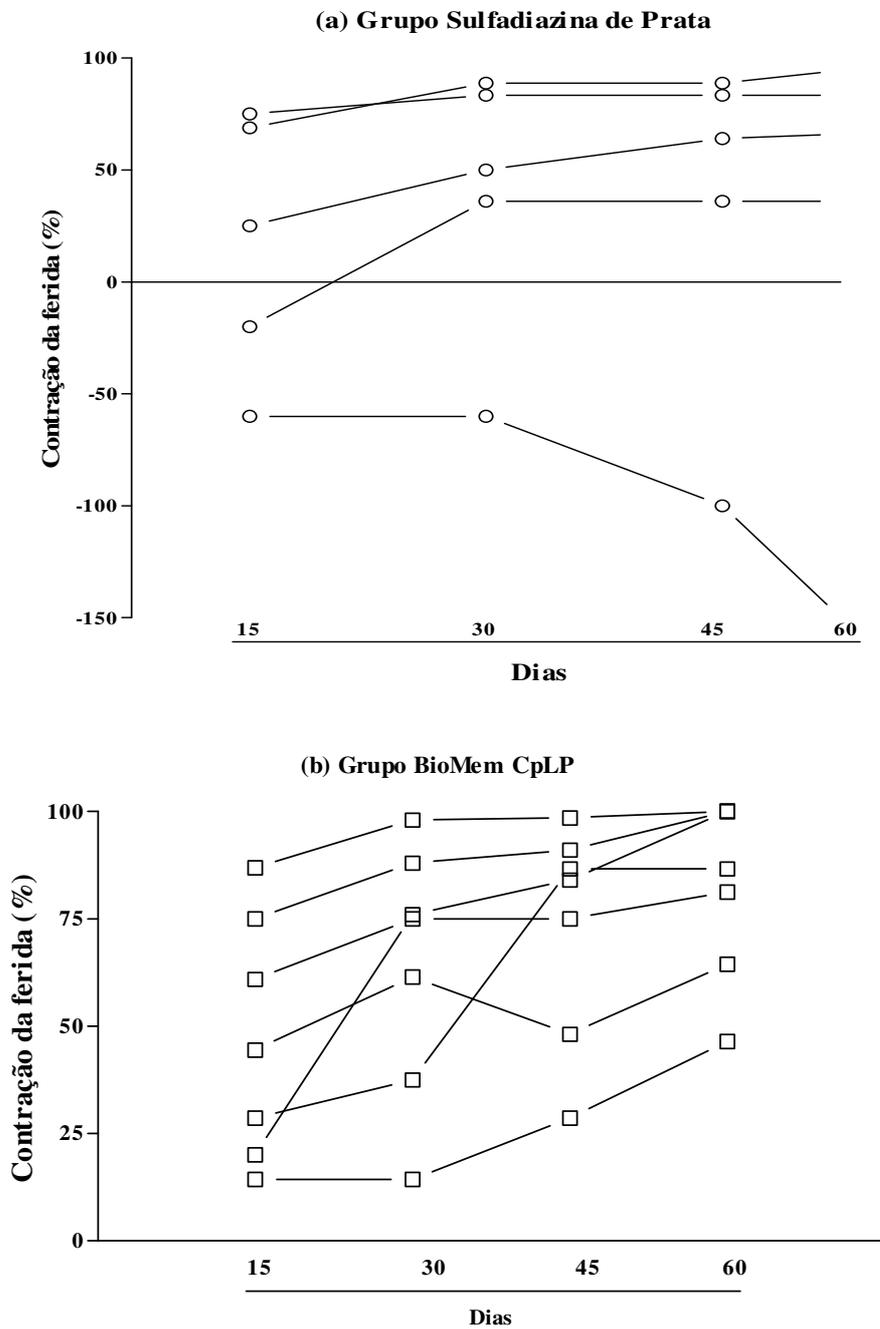
Tabela 3 – Caracterização clínica dos pacientes com úlceras plantares – Grupo Sulfadiazina de Prata

| Nº | Paciente | Idade | Sexo | Tempo (meses) | Recidiva | Lesão | Área Inicial (mm ²) | Área 60 dias (mm ²) | Redução % 60 dias |
|-------|----------|-------|------|---------------|----------|-----------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1 | | | | 12 | Sim | Pé dir. 1 | 23,55 | 3,92 | 83,33 |
| 2 | MMN | 59 | M | 60 | Sim | Pé dir. 2 | 19,62 | 12,56 | 36 |
| 3 | | | | 24 | Sim | Pé esq. | 7,85 | 23,55 | 0 |
| 4 | PCS | 57 | M | 5 | Não | Pé esq. | 6,28 | 0 | 100 |
| 5 | JEF | 65 | M | 2 | Não | Pé esq. | 54,9 | 17,6 | 67,85 |
| Média | | 60,3 | | 20,6 | | | 22,44 | 11,52 | 57,43 |

Tabela 4 - Caracterização clínica dos pacientes com úlceras plantares – Grupo BioMemCpLP

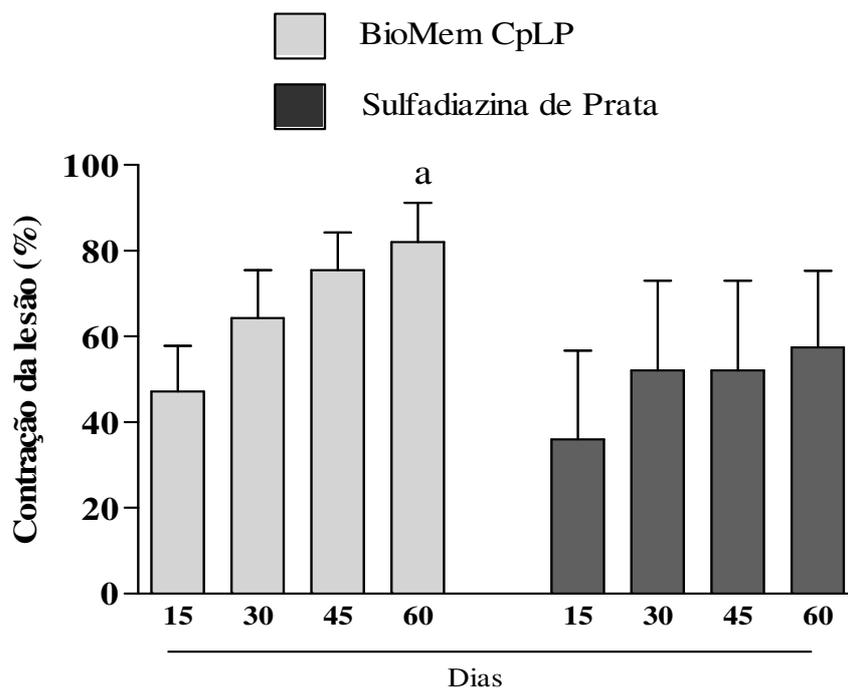
| Nº | Paciente | Idade | Sexo | Tempo (meses) | Recidiva | Lesão | Área Inicial (mm ²) | Área 60 dias (mm ²) | Redução % 60 dias |
|-------|----------|-------|------|---------------|----------|--------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 1 | MGS | 47 | F | 72 | Sim | Pé esq | 5,02 | 0 | 100 |
| 2 | RPS | 42 | M | 18 | Não | Pé esq | 7,85 | 0,94 | 81,25 |
| 3 | DBB | 50 | M | 12 | Não | Pé dir | 125,6 | 0 | 100 |
| 4 | VAD | 50 | M | 36 | Sim | Pé dir | 1,96 | 0 | 100 |
| 5 | | | | 48 | Sim | Pé esq | 54,95 | 29,4 | 46,42 |
| 6 | JDL | 64 | M | 24 | Não | Pé dir | 21,19 | 7,5 | 64,44 |
| 7 | EGS | 41 | M | 2 | Não | Pé esq | 43,96 | 5,89 | 86,6 |
| Média | | 49 | | 30,28 | | | 37,21 | 6,24 | 82,67 |

Figura 10 - Evolução individual de cada úlcera tratada com a BioMem CpLP e com Sulfadiazina de prata



As úlceras de ambos os grupos foram mensuradas com régua milimetrada nos dias 15, 30, 45 e 60 dias. (a) representa a evolução dos pacientes tratados com Sulfadiazina de prata (n=5 úlceras) e (b) o tratamento com a BioMem CpLP (n=7 úlceras). Contração da úlcera é representada pelo resultado da diferença entre a área inicial e após 15, 30, 45 ou 60 dias, dividido pela área inicial. As linhas representam a evolução da úlcera individual dos pacientes no decorrer do tratamento.

Figura 11 - Evolução das úlceras tratadas com a BioMem CpLP e com Sulfadiazina de prata



As úlceras de ambos os grupos foram mensuradas com régua milimetrada nos dias 15, 30, 45 e 60 dias. A contração da úlcera é representada pelo resultado da diferença entre a área inicial e após 15, 30, 45 ou 60 dias, dividido pela área inicial. (a) $p < 0,05$ indica diferença estatística comparando o dia 60 com o dia 15 ($n=7$) do grupo tratado com BioMem CpLP, teste de Wilcoxon. Não houve significância entre os dias 60 e 15 no grupo tratado com Sulfadiazina de prata ($n=5$).

As tabelas 5 e 6 mostram os resultados da avaliação clínica da úlcera. Para os parâmetros de fibrina, granulação e reepitelização foi adotado uma análise semi-quantitativa com critério de cruzes. Esta avaliação foi realizada antes de iniciar o tratamento, após 30 e 60 dias do tratamento. Foi contabilizada a quantidade de resultados progressivos, regressivos e indiferentes para cada parâmetro. As úlceras tratadas com a BioMem CpLP não mostraram nenhuma regressão quanto à necrose mas progressão na formação do tecido cicatricial (85,71%), inclusive superior ao grupo tratado com Sulfadiazina de prata (60%) (Tabela 7).

As figuras 12 e 13 ilustram a evolução das úlceras dos pacientes tratados com a BioMem CpLP e Sulfadiazina de prata, respectivamente.

Tabela 5 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo BioMem CpLP (n=7 úlceras)

| Nº | PAC. | Tempo (dias) | Necrose/ Fibrina | Granulação | Reepitelização |
|----|-------------|--------------|------------------|------------|----------------|
| 1 | DBB | 0 | + | + | + |
| | | 30 | - | + | ++ |
| | | 60 | - | - | +++ |
| 2 | MGGS | 0 | ++ | + | - |
| | | 30 | - | - | +++ |
| | | 60 | - | - | +++ |
| 3 | RPS | 0 | +++ | - | - |
| | | 30 | + | - | ++ |
| | | 60 | - | - | +++ |
| 4 | VAD Pé dir. | 0 | + | + | - |
| | | 30 | + | +++ | + |
| | | 60 | + | +++ | + |
| 5 | VAD Pé esq. | 0 | ++ | - | - |
| | | 30 | ++ | - | - |
| | | 60 | - | - | +++ |
| 6 | JDL | 0 | - | +++ | - |
| | | 30 | - | ++ | + |
| | | 60 | - | ++ | + |
| 7 | EGS | 0 | + | ++ | - |
| | | 30 | - | ++ | + |
| | | 60 | - | + | ++ |

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica da úlcera antes do tratamento, após 30 e 60 dias para os parâmetros necrose, granulação e reepitelização. - Ausente; + Até 1/3 da área superficial da lesão; ++ Até 2/3 da área superficial da lesão; +++ Mais de 2/3 da área superficial da lesão.

Tabela 6 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo Sulfadiazina de Prata (n=5)

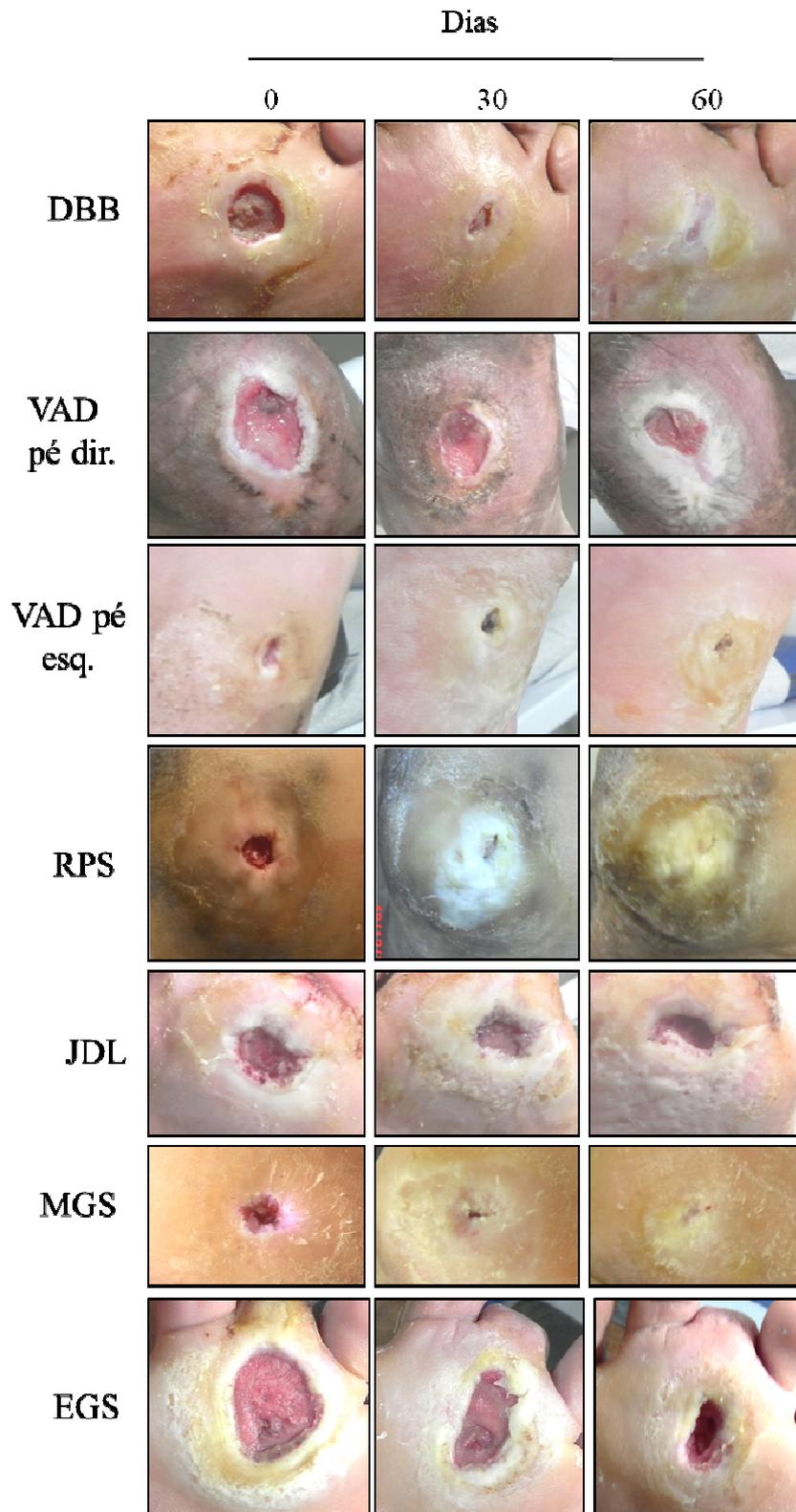
| Nº | PAC. | Tempo (dias) | Necrose/ Fibrina | Granulação | Reepitelização |
|----|---------------|--------------|------------------|------------|----------------|
| 1 | MMN Pé dir. 1 | 0 | + | ++ | - |
| | | 30 | +++ | - | - |
| | | 60 | ++ | + | - |
| 2 | MMN Pé dir. 2 | 0 | + | ++ | - |
| | | 30 | - | ++ | + |
| | | 60 | - | ++ | + |
| 3 | MMN Pé esq. | 0 | ++ | + | - |
| | | 30 | + | ++ | - |
| | | 60 | + | ++ | - |
| 4 | PCSM | 0 | - | - | + |
| | | 30 | - | ++ | ++ |
| | | 60 | - | ++ | +++ |
| 5 | JEF | 0 | ++ | - | - |
| | | 30 | + | ++ | + |
| | | 60 | - | + | +++ |

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica da úlcera antes do tratamento, após 30 e 60 dias para os parâmetros necrose, granulação e reepitelização. - Ausente; + Até 1/3 da área superficial da lesão; ++ Até 2/3 da área superficial da lesão; +++ Mais de 2/3 da área superficial da lesão.

Tabela 7 – Resultado da análise clínico das úlceras dos pacientes dos grupos BioMem CpLP e Controle

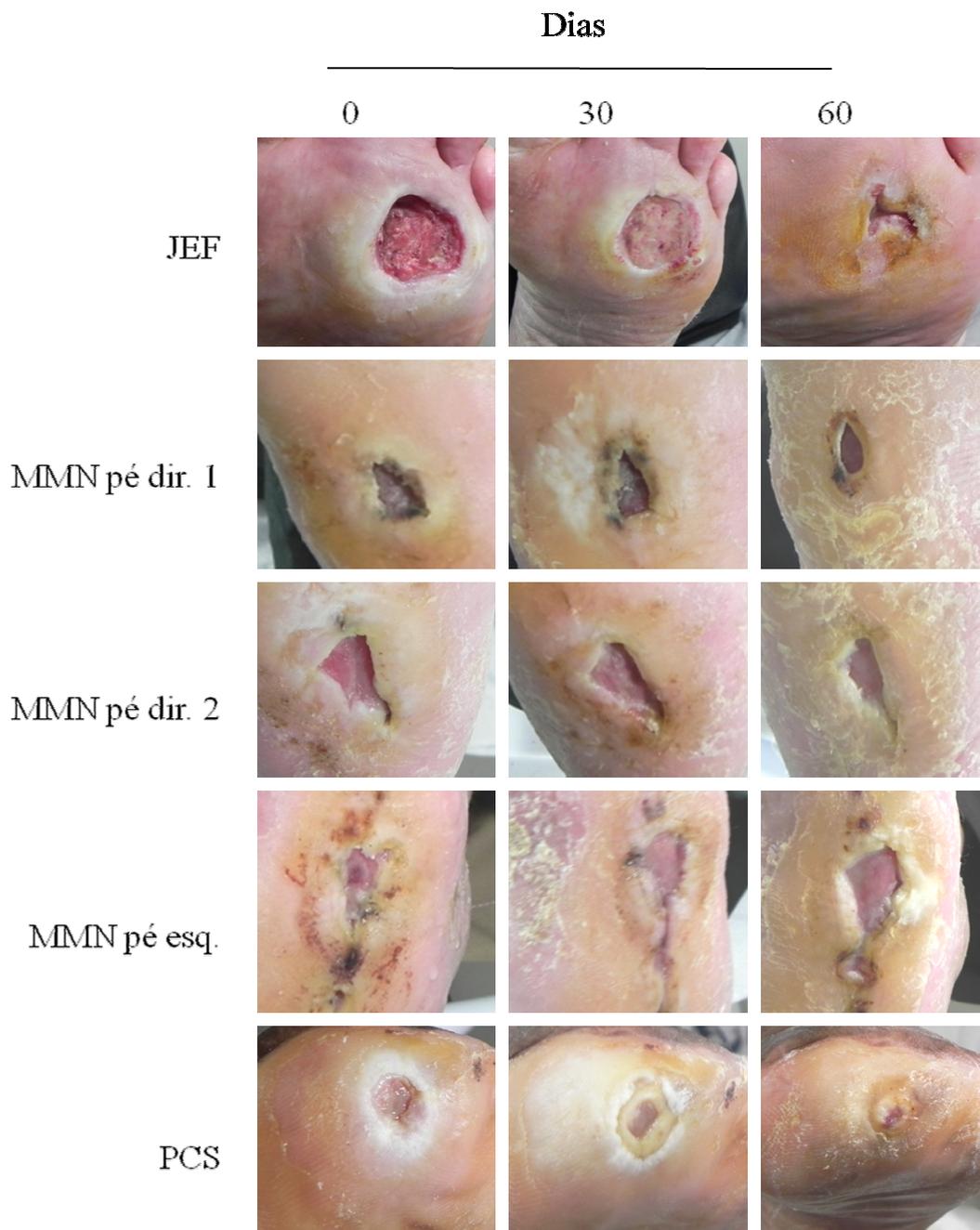
| Parâmetro | Evolução | Grupo controle (n=5) | | Grupo BioMem (n=7) | |
|----------------------|-------------|----------------------|-------|--------------------|-------|
| | | Número | % | Número | % |
| Necrose / Fibrina | Regressiva | 4 | 80 | 6 | 85,71 |
| | Progressiva | 1 | 20 | - | - |
| | Indiferente | - | - | 1 | 14,29 |
| Granulação | Regressiva | 3 | 60 | 4 | 57,14 |
| | Progressiva | 1 | 20 | 1 | 14,29 |
| | Indiferente | 1 | 20 | 2 | 28,57 |
| Reepitelização | Regressiva | - | - | - | - |
| | Progressiva | 3 | 60 | 6 | 85,71 |
| | Indiferente | 2 | 33,33 | 1 | 14,29 |

Figura 12 - Registro fotográfico das úlceras tratadas com BioMem CpLP



Os pacientes foram tratados com a biomembrana de CpLP por 60 dias e foi feito um registro fotográfico das úlceras (n=7) antes do início do tratamento, após 30 dias e após 60 dias para avaliação do aspecto clínico da úlcera.

Figura 13 - Registro fotográfico das úlceras tratadas com Sulfadiazina de Prata



Os pacientes foram tratados com a com Sulfadiazina de prata por 60 dias e foi feito um registro fotográfico das úlceras (n=5) antes do início do tratamento, após 30 dias e após 60 dias para avaliação do aspecto clínico da úlcera.

6 DISCUSSÃO

C. procera é uma planta laticífera que é historicamente utilizada na medicina popular e de grande interesse na comunidade científica tendo em vista o grande potencial farmacológico já demonstrado (ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; BITENCOURT *et al.*, 2017). CpLP é a fração protéica rica em proteases utilizada neste trabalho e foi demonstrado que a biomembrana produzida permanece com ação proteolítica, mesmo com todas as etapas de secagem e esterilização em luz UV. É possível observar a degradação da caseína no halo formado na placa de agarose após 24 horas em contato com a membrana.

As proteases são uma classe de enzimas que ocupam uma posição crucial em relação a papéis fisiológicos, bem como diversas aplicações industriais e terapêuticas. O látex das plantas tem sido considerado uma importante fonte de proteases cisteínicas semelhantes a papaína, que são candidatos promissores com alta atividade proteolítica e características únicas como biocatalisantes (KWON *et al.*, 2015). Portanto, a atividade proteolítica encontrada na fração CpLP pode ser importante na cicatrização como ocorre com a papaína e colagenase já utilizadas na clínica.

A ação proteolítica promove um desbridamento químico na lesão, sendo um passo muito importante para a cicatrização de feridas que formam hiperqueratose nas bordas, dificultando a epitelização, como acontece frequentemente na úlcera plantar. A capacidade de migração das células epiteliais fica inibida ou impedida na presença desses materiais, pois agem como barreira à migração celular. Assim, o desbridamento é altamente benéfico (GOMES, 2001; YAMADA, 2003).

Para um novo biomaterial, são necessários testes toxicológicos e de interação *in vitro* e *in vivo*. Todos os testes *in vitro* foram realizados com fibroblastos L929. Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização, daí a escolha desta célula. (AMADEU *et al.*, 2003). Portanto, com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

Vários métodos aplicados para testar a toxicidade são úteis na toxicologia *in vitro*. O ensaio mais frequentemente empregado para a avaliação de citotoxicidade basal é o teste de redução do MTT (VALADARES, 2006). A quantificação da redução de MTT constitui um

método colorimétrico simples para avaliar a viabilidade celular.

Com relação aos resultados *in vitro*, este trabalho mostrou que CpLP é segura para fibroblastos L929 em concentrações abaixo de 3,12 µg/mL de acordo com o teste de viabilidade celular pela atividade mitocondrial (MTT). Este teste foi realizado sem o fator de crescimento soro fetal bovino para evitar interferências na ação da fração protéica. Em outro experimento, agora com 2,5% de SFB para um estímulo proliferativo, foi observado redução na toxicidade de CpLP e aumento da viabilidade inclusive superior ao controle nas concentrações 1,56 e 0,78 µg/mL após 24 horas de incubação. Portanto, em condições ideais na presença de SFB, CpLP contribui para a viabilidade celular de fibroblastos. Este resultado foi confirmado no ensaio do SRB, tendo em vista que as concentrações 1,56 e 3,12 µg/mL mostraram aumento na viabilidade dos fibroblastos. Estes resultados corroboram com o estudo de Almeida em 2016 em que mostrou a toxicidade da fração protéica de *Hevea brasiliensis*, também com potencial cicatrizante, apresentando diminuição em 30% da viabilidade de fibroblastos L929 na concentração de 25 µg/mL. Figueiredo em 2014 também encontrou resultados semelhantes utilizando neutrófilos de cultura primária e mostrou que, em concentrações crescentes de 1 a 100 µg/mL, CpLP não reduziu a atividade mitocondrial pelo teste MTT e não apresentou efeito nocivo sobre a membrana destas células pelo teste LDH (lactato desidrogenase).

Outro teste *in vitro* importante para avaliação da migração e proliferação celular é o teste do “scratch”. Uma das principais vantagens deste método simples é que imita, até certo ponto, a migração de células *in vivo*. Por exemplo, a remoção de parte do endotélio nos vasos sanguíneos induzirá a migração de células endoteliais para a área desnuda para fechar a ferida. Além disso, os padrões de migração como população ligeiramente conectada (por exemplo, fibroblastos) ou como folhas de células (por exemplo, epiteliais) também imitam o comportamento dessas células durante a migração *in vivo* (LIANG, 2007). Apesar da possível toxicidade em concentrações acima de 3,12 µg/mL, a fração do látex de *C. procera* conferiu atividade proliferativa nos fibroblastos em baixas concentrações no teste do “scratch”. As concentrações 1,56 e 0,78 µg/mL de CpLP induziram maior proliferação e migração refletindo na redução da área aberta quando comparado com o controle (DMEM 2,5% SFB) e com o veículo (água) após 24 horas, mas apenas a concentração de 0,78 µg/mL permaneceu superior ao controle após 48 horas.

Por outro lado, a proliferação celular pode ser mensurada pela simples contagem de células não viáveis (MACIEL, 2002). Esta fração proteica também mostrou, nas mesmas

concentrações (1,56 e 0,78 µg/mL), potencial proliferativo de fibroblastos em contagem direta de células coradas por Azul de Trypan, o que corrobora com o resultado do “scratch”.

O aumento de fibroblastos foi observado em Figueiredo, 2014 utilizando a BioMem CpLP em lesões excisionais de animais experimentais. Foi observado aumento na população de fibroblastos e na produção de colágeno no ensaio histopatológico corado com HE o que culminou na redução do tempo necessário de cicatrização das lesões.

Portanto, esta capacidade proliferativa de CpLP é importante, pois são células que desempenham um papel central na cicatrização de feridas devido à sua capacidade de migração para o local da injúria, produção e remodelamento de componentes da MEC, como o colágeno, assim como estímulo parácrino no processo de cicatrização de feridas, incluindo angiogênese .

Diante dos promissores resultados *in vitro* e em animais experimentais com a BioMem CpLP, foi iniciado um estudo clínico piloto, que ainda está em andamento, mas que já mostra resultados favoráveis no tratamento de úlceras plantares. Foram selecionados 9 pacientes curados da hanseníase, em tratamento de úlceras plantares no Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia. Dentre os 9 pacientes com 12 úlceras, onde 7 foram tratadas com a BioMem CpLP e 5 foram tratadas com sulfadiazina de prata, tratamento padrão utilizado no centro de dermatologia.

Inicialmente, por se tratar de uma nova ferramenta terapêutica à base de um látex, foi realizado o “patch test” para investigação de possível hipersensibilidade nos pacientes do grupo tratado com a BioMem CpLP. Nenhum paciente apresentou indício de reação alérgica como edema, eritema, bolhas ou púlulas.

A prevalência de complicações decorrentes do uso de produtos de látex, como luvas, preservativos, material de mergulho, diafragmas, sondas etc, têm aumentado nas últimas décadas. Destaca-se, neste contexto, a reação de hipersensibilidade tardia ou tipo IV que se apresenta clinicamente como dermatite de contato, desencadeada essencialmente por substâncias adjuvantes ao látex, utilizadas durante o processo de industrialização dos produtos de borracha (MONTALVAO, 2008). Portanto, é importante avaliar o potencial alergênico de substâncias extraídas do látex para evitar o agravamento das úlceras bem como a segurança daquele que manipulam.

Frade *et al.* em 2011 concluiu que a biomembrana vegetal de *Hevea brasiliensis* é segura como curativo para lesões cutâneas, pois não induziu a reações de hipersensibilidade entre os voluntários, resultado semelhante ao encontrado neste trabalho. Esses são resultados

preliminares, se fazendo necessário um estudo mais abrangente.

Os pacientes com úlceras crônicas tinham, em média, 47,65 anos, a maioria homens e aposentados conforme constatado por Moura e colaboradores em 2016. Esses pacientes apresentam úlceras incapacitantes que comprometem atividades cotidianas como também profissionais. Oliveira em 2013 concluiu que o maior percentual de pacientes com úlceras crônicas estava na faixa etária entre 57-69 anos, corroborando com estudos internacionais. O tempo de úlcera de ambos os grupos foi homogêneo ($p= 0,41$) e 60% das úlceras do grupo tratado com sulfadiazina foram recidivas enquanto que nas úlceras tratadas com a biomembrana foram 42,65 %. A média das áreas iniciais do grupo biomembrana foi discretamente maior que a do grupo sulfadiazina, entretanto sem significância estatística ($p=0,24$).

Durante o tratamento, os pacientes relaram conforto e comodidade ao utilizarem a BioMem CpLP, bem como Frade em 2003 descreveu sobre o relato dos pacientes tratados com uma membrana semelhante. Nenhum efeito colateral foi identificado durante o tratamento com a biomembrana, porém foi relatado um odor após 48 horas de curativo, que pode estar relacionado ao exsudato da lesão ou à higiene do pé.

A avaliação da eficácia da BioMem CpLP foi realizada conforme parâmetros do percentual de contração da ferida bem como análise clínica da lesão conforme parâmetros de necrose/fibrina, granulação e reepitelização. As úlceras de ambos os grupo, em geral, evoluíram bem com o passar de 60 dias, exceto por um paciente tratado com sulfadiazina que teve aumento da úlcera. As médias das contrações após 60 dias de tratamento com a BioMem CpLP foi estatisticamente maior que após 15 dias, resultado não encontrado nos pacientes tratados com Sulfadiazina de prata. Este resultado sugere que os paciente tratados com a BioMem CpLP tiveram evolução positiva, mostrando redução no tamanho da lesão, ou seja, o tratamento com a membrana não causou piora nem foi indiferente aos pacientes. As médias das contrações medidas nos dias 15, 30, 45 e 60 foram superiores nos pacientes tratados com BioMem CpLP com relação aos pacientes tratados com sulfadiazina, porém sem significância. Apesar do número reduzido de pacientes tratados com BioMem CpLP, este resultado propõe que o tratamento em estudo reduz o tempo de cicatrização de maneira importante, tendo em vista que apesar do longo período de úlcera, entre 2 a 60 meses, foi observada evolução na cicatrização. Este potencial cicatrizante corrobora com os resultados já demonstrados em animais (FIGUEIREDO *et al.*, 2014).

Apesar da comprovada ação cicatrizante da sulfadiazina de prata, como redução

das fases inflamatória e de formação do tecido de granulação e um aumento do reparo epidérmico, os resultados encontrados não foram tão satisfatórios devido à complexidade das úlceras (DESIDÉRIO *et al.*, 2001). Este tratamento, muitas vezes é o único disponível no centro de dermatologia onde foi realizado o estudo, porém não é o mais adequado para tratar úlceras plantares.

Resultados promissores também foram constatados na avaliação clínica das lesões. Nesta análise, os parâmetros de necrose/fibrina, granulação e reepitelização foram mensurados por escores. A biomembrana foi capaz de desbridar o tecido desvitalizado em quase 86%, enquanto que no grupo tratado com sulfadiazina a redução da necrose foi de 80%. Este resultado pode estar relacionado à atividade proteolítica da BioMem CpLP. A angiogênese que representa a parte inicial da fase de formação tecidual do processo de cicatrização, clinicamente caracterizada pelo tecido de granulação, se mostrou bem desenvolvida em vários pacientes do grupo BioMem CpLP. Além disso, vale ressaltar que com relação a reepitelização, 85% dos pacientes do grupo biomembrana foi progressiva, ou seja, houve aumento no tecido cicatricial das úlceras, enquanto que nas úlceras tratadas com sulfadiazina a taxa foi de 60%.

Outro tipo de látex, de *Hevea brasilienses*, foi investigado em diversas pesquisas, apresentou importantes propriedades de indução do processo cicatricial, facilita o desbridamento autolítico, promove a neoformação vascular e estimula a proliferação e granulação tecidual, além da reepitelização (REIS, 2013).

O tratamento com BioMem CpLP mostra potencial cicatrizante em feridas excisionais em animais influencia diretamente na fase inflamatória da cicatrização, promovendo degranulação de mastócitos, ativação de macrófagos, recrutamento de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, TNF- α e IL-1 β . Este potencial pró-inflamatório parece acelerar as fases posteriores do processo cicatricial, confirmada pela sua capacidade estimuladora da angiogênese, fibroplasia e colagênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016).

A principal causa para a não cicatrização de úlceras neuropáticas dos pés são as deformidades estáticas e dinâmicas, que ocasionam altos picos de pressão sobre a pele insensível (LANG-STEVENSON *et al.*, 1985). Portanto, os resultados encontrados podem variar por conta da dificuldade de um calçado adequado, bem como o repouso e higiene do paciente. O que se observa é que a maioria dos pacientes não pode adquirir um calçado específico para proteger a úlcera e evitar o surgimento de novas lesões. Além disso, muitos

não contam com transporte e precisam se deslocar a pé, o que dificulta a cicatrização.

Portanto, os resultados encontrados neste estudo sugerem que a biomembrana pode representar uma opção terapêutica eficaz e de baixo custo para o tratamento de úlceras plantares crônicas de pacientes com sequelas da Hanseníase, apesar do pequeno número de pacientes e grande variabilidade fatores envolvidos na cicatrização das úlceras plantares, é um trabalho que confere subsidio para o desenvolvimento de um estudo clínico de fase I.

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que CpLP não apresenta citotoxicidade em baixas concentrações e promove a proliferação e migração de fibroblastos *in vitro*. A fração CpLP não conferiu potencial alergênico aos pacientes. O tratamento inovador com BioMem CpLP foi benéfico no tratamento de úlceras plantares, reduzindo o tempo de cicatrização, além de promover o desbridamento do tecido desvitalizado, bem como o aumento do tecido reepitelizado.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, V. C. Aspectos bioquímicos, toxicológicos e alergênicos do látex da planta *Calotropis procera* (Ait.) R. BR.- Tese, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 5th Ed. **New York: Garland Science**, 2010. 1725 p.
- ALENCAR, N. M. N.; BITENCOURT, F. S.; FIGUEIREDO, I. S. T.; LUZ, P. B.; LIMA-JÚNIOR, R. C. P.; ARAGÃO, K. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A.; FREITAS, A. P. F.; RAMOS, M. V. Side-Effects of Irinotecan (CPT-11), the Clinically Used Drug for Colon Cancer Therapy, Are Eliminated in Experimental Animals Treated with Latex Proteins from *Calotropis procera* (Apocynaceae). **Phytotherapy Research**. Volume 31, Issue 2, February 2017, Pages 312–320.
- ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, J. S.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; VALE, M. R.; ETHELLES, J. P.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. Res.**, v.55, p. 559-564, 2006.
- ALMEIDA F., LAOUNIER, B.; MRUÉ, F.; LACERDA, E.; TRAVASSOS, I. Avaliação da citotoxicidade da fração do soro de hevea brasiliensis em linhagem celular de cancer de pulmão. **Revista de Medicina e saúde brasileira**, 2016.
- AMADEU, T. P.; COULOMB, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A. M. A. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int. J. Low Extrem. Wounds*, v. 2, n. 2, p. 60-68, 2003.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36(3):373-382, mai-jun, 2003.
- BANDEIRA, R. A. Prevalência de hanseníase na macrorregião de Palmas, Estado do Tocantins, em 2009. 69 f., 2010. **Dissertação** (Mestrado em Ciências da Saúde)- Universidade de Brasília, 2010.
- BARBIERI, C. L. A.; MARQUES H. H. de S. Hanseníase em crianças e adolescentes: revisão bibliográfica e situação atual no Brasil. **Pediatria**, São Paulo, n°31,v.4, p281-90, 2009.
- BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. (2005). Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol. Surg.**, v. 31, n. 6, p. 674-86, June.
- BEZERRA, C. F.; MOTA, E. F.; SILVA, A. C. M.; TOMÉ, A. R.; SILVA, M. Z.R.; BRITO, D.; PORFÍRIO, C. T. M. N.; OLIVEIRA, A. C.; FILHO, J. V. L.; RAMOS, M. V. Latex proteins from *Calotropis procera*: Toxicity and immunological tolerance revisited. **Chemico- Biological Interactions**. Vol. 274, 25 August 2017, Pages 138-149.
- BORGES, E.L.; SAAR, S.R.C.; LIMA, V.L.A.N.; GOMES, F.S.L.; MAGALHÃES, M.B.B. Feridas: como tratar. Belo Horizonte: **Coopmed**; 2001. p.97- 120.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Condutas para Alterações Oculares em Hanseníase. **Cadernos de Prevenção e Reabilitação em Hanseníase**; n°3. Brasília- DF, 2ª ed. 2008.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de prevenção de incapacidades. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001. p.12-25.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção

Básica. **Guia para o controle da Hanseníase**. Brasília, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. Informe Técnico: “Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose. Brasília, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional – Brasília, Ministério da Saúde, 2016.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Review, Journal Article**, 2006.

CANHAMERO, T. A. Estudo dos mecanismos genéticos e celulares durante a fase inflamatória do processo de regeneração tecidual em animais selecionados geneticamente para máxima resposta inflamatória aguda homocigotos para os alelos R ou S do gene *Slc11a1*. **Doutorado**, Universidade de São Paulo. 2009

CARUSO, D. M.; FOSTER, K. N.; HERMANS, M. H.E.; RICK, C.; Aquacel Ag® in the Management of Partial-Thickness Burns: Results of a Clinical Trial. **Journal of Burn Care & Research**: January-February 2004 - Volume 25 - Issue 1 - p 89-97.

CESARETTI, I.U.R. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, 1998;2: 10-2.
CHAUDHARY, P.; RAMOS, M.V.; VASCONCELOS, M. D.; KUMAR, V. L. Protective effect of high molecular weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* Latex in Monoarthritic Rats. **PhcogMag** 2016;12, Suppl S2:147-5.

CHOI, S. M.; RYU, H. A.; LEE, K.; KIM, H. J.; PARK, I. K.; CHO, W. J.; SHIN, H. C.; CHOI, W. J. LEE. J. W. Development of Stabilized Growth Factor-Loaded Hyaluronate– Collagen Dressing (HCD) matrix for impaired wound healing. **Biomaterials Research**, 2016.

DĄBROWSKA, A.K.; SPANO, F.; DERLER, S.; ADLHART, C.; SPENCER, N. D.; ROSSI, R.M.; The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. **Skin Research and Technology**. 23 October 2017.

DAMETTO, M.; DAVID, A. P.; AZZOLINI, S. S.; CAMPOS, I. T. N.; TANAKA, A. M.; GOMES, A.; ANDREOTTI, R.; TANAKA, A. S. Purification and Characterization of a Trypsin-Like Enzyme with Fibrinolytic Activity Present in the Abdomen of Horn Fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) **Journal of Protein Chemistry**, Vol. 19, No. 6, 2000.

DARBY, I.A.; LAVERDET, B.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin. Cosmet Investig Dermatol**. 2014; 7: 301–311.

DAXBACHER, E. L. R.; FERREIRA, I. N. Epidemiologia da Hanseníase. **Hanseníase Avanços e Desafios**, 45-65, 2011.

DEALEY, C. Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. São Paulo: **Atheneu**; 1996. p.1-2.

DESIDÉRIO, V. L.; AGUIRRE, L. R. G.; DADALTI, P.: Estudo evolutivo de úlceras venosas e mal perfurante plantar após tratamento tópico da associação de Sulfadiazina de Prata e Nitrato de Cério. **Rev. Angiol. Cir. Vasc.**, 2001; 4: 131-136

DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Preliminary studies on the analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v.73, p.307-311, 2000.

Domansky, R. C. Alginato. **ESTIMA: Associação Brasileira de Estomaterapia: estomas, feridas e incontinências**, v. 1, n. 3 (2003).

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, v.62, p.1057-1071, 2003.

Duerksen, F. A hanseníase e a neuropatia através da perspectiva de um cirurgião. **Hansen. int**, 29(1):46-50, 2004.

FIGUEIREDO, I. S. T. Modulação do processo cicatricial de feridas cutâneas experimentais por uma biomembrana de proteínas do látex de *Calotropis procera* (ait.) R. Br. **Tese** (Doutorado em Farmacologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2011.

FIGUEIREDO, I. S. T.; RAMOS, M. V. SILVA, N. M. P. R.; GONZAGA, M. L. C.; PINHEIRO, R. S. P.; ALENCAR, N. M. N. Efficacy of a membrane composed of polyvinyl alcohol as a vehicle for releasing of wound healing proteins belonging to latex of *Calotropis procera*. **Process Biochemistry**. Volume 49, Issue 3, March 2014, Pages 512-519.

FRADE, M. A. C., ASSIS, R. V. C. C. N.; ANDRADE, T. A. M.; FOSS, N. T. (2012). The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 87(1), 45-51 (2012).

FRADE, M. A. C., Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2003.

FRADE, M. A. C.; NETTO, J. COUTINHO; GOMES, F. G.; MAZZUCATO, E. L.; ANDRADE, T. A. M.; TIRABOSCHI FOSS, N. Curativo de biomembrana vegetal e hipersensibilidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 885-891, Out. 2011.

FRANCO, D.; GONÇALVES, L.F. Feridas Cutâneas: A escolha do curativo adequado. **Artigo de Atualização**. RJ, 2007.

FREITAS, C. D. T.; NOGUEIRA, F. C. S.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T.A.; OMONT, G. B.; RAMOS, M. V. Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: Biochemical characterization, biological activity and role in plant defense. **Plant Physiol. Biochem.**, v.49, p.738-743, 2011.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO N. M. R.; SALES M.P.; VILLAS-BOAS L. A.; RAMOS M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.45, p.781-789, 2007.

GALLEGOS-OLEA, R. S.; OLIVEIRA, A. V.; SILVEIRA, L. M. S.; SILVEIRA, E. R. Organic carbonate from *Calotropis procera* leaves. **Fitoterapia**, v.73, p.263-265, 2002.

GARBINO, J. A.; MARQUES-JR W.; ARRETO, J. A.; HEISE, C. O.; RODRIGUES, M. M. J.; ANTUNES, S. L. SOARES, C. T.; FLORIANO, M. C.; NERY, M. A. B. T.; CARVALHO, N. B.; BARREIRA, A. A.; VIRMOND, M. C. L. Primary neural leprosy: systematic review. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** vol.71 no.6 São Paulo, Junho 2013.

GEBÄCK, T.; SCHULZ, M. M. P.; KOUMOUTSAKOS, P.; DETMAR, M. T Scratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. **BioTechniques** 46:265-274 (April 2009).

GOMES, F.G.; FRADE, M. A. C.; FOSS, N. T.; Úlceras cutâneas na hanseníase: perfil clínico-epidemiológico dos pacientes. **An Bras Dermatol.** 2007;82(5):433-7.

HARDING, K.G; MORRIS, H.L.; PATEL, G.K.. Healing chronic wounds. *BMJ : British Medical Journal*. 2003; 324 (7330):160-163.

HARRIS, R. J.; The Nursing Practice of Conservative Sharp Wound Debridement: Promotion, Education and Proficiency. *Wound Care Canada*. Volume 7, Number 1, 2009.

HOUGHTON, P.; FANG, R; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods*. 2007 Aug; 42(4):377-87.

HUNT, T.K.; HOPF, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. *Adv Skin Wound Care*, 2000; 13: 6 – 1.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10a ed. São Paulo: Editora Nacional, 1979.

KENNEDY, S.The Use of DermaDry™ Soft Splinting for Thumb Metacarpophalangeal Joint, Carpometacarpal Joint and Wrist Problems. *Hand Therapy*. Volume: 8 issue: 1, page(s): 24-27(2003).

KIRTIKAR, K.R.; BASU, B.D. Indian Medicinal Plants, **Lolit Mohan Basu**, Allahabad (1935), p. 1606.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V. L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *J. Ethnopharmacol.*, v.76, p.115-118, 2001.

KUMAR, V. L., GURUPRASAD, B., CHAUDHARY, P., FATMI, S. M. A., OLIVEIRA, R. S. B. AND RAMOS, M. V. (2015), Protective effect of proteins derived from *Calotropis procera* latex against acute inflammation in rat. *Auton Autacoid Pharmacol*, 35: 1–8.

KUMAR, V.L.; BASU N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 44, Issue 2, October 1994, Pages 123-125.

KWON, C.W.; PARK, K.M.; KANG, B.C.; KWEON, D.H.; KIM, M.D.; SHIN, S.W.; JE, Y.H.; CHANG, P.S. Cysteine Protease Profiles of the Medicinal Plant *Calotropis procera* R. Br. revealed by de novo transcriptome analysis. *PLoSOne*.v.10(3); 2015.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Structure and function of skin, hair and nails. Elsevier, volume 41, Issue 6, June 2013, Pages 317-320.

LANG-STEVENSON, A. I. et al. Neuropathic ulcers of the foot. *J. Bone Joint Surg.*, v. 67- B, n.3, May., 1985.

LANSDOWN, A.B.G.; Silver aids healing in the sterile skin wound: experimental studies in the laboratory rat. *British Journal of Dermatology* 1997; 137:728-735.

LARHSINI, M.; BOUSAID, M.; LAZREK, H. B.; JANA, M.; AMAROUCHE, H. Evaluation of antifungal and molluscicidal properties of extracts of *Calotropis procera*. *Fitoterapia*, v.4, p.371-373, 1997.

LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2, - 329 - 333 (2007).

LIMA, R. C. DE S.; SILVA, M. C. C.; AGUIAR, C. C. T.; CHAVES, E. M. C.; DIAS, K. C.

F.; MACÊDO, D. S.; SOUSA, F. C. F. CARVALHO, K. M.; RAMOS, M. V.; VASCONCELOS, S. M. M.; Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy e Behavior**. February 2012, Volume 23, Issue 2, Pages 123–126.

LIU, H.; ZHANG, A. I. F. Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. **Nature Genetics** 47, 267–271 (2015).

LOPES, M. B.; RAJASEKARAN, R.; CANÇADO, A. C. F. L.; MARTIN, A. A. In vivo confocal raman spectroscopic analysis of the effects of infrared radiation in the human skin dermis. **Photo chemistry and photobiology**, 2017.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, Vol. 25, No.3, 429-438, 2002.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An. Brás. Dermatol**, Rio de Janeiro, 78(5):525-542, set./out. 2003.

MCCARTY, S. M.; PERCIVAL, S. L. Proteases and Delayed Wound Healing. **Advances in Wound Care**. October 2013, Vol. 2, No. 8: 438-447.

MONTALVAO, L.N.; PIRES, M.C.; MELLO, J.F. Alergia ao látex em profissionais de saúde de São Paulo, Brasil. **An Bras Dermatol**. 2008;83:213-20.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOTTA, A. A.; KALIL, J.; BARROS, M. T. Testes Cutâneos. **Rev. Brasil. de Alerg. E Imunopatologia**. 05/28-02/73, 2005.

MOURA, A.D.A.; ALBUQUERQUE, E.R.O.; CHAVES, E.S.; SOUZA, A.R.; LIMA, G.G.; CHAVES, C.S. Perfil dos portadores de hanseníase de um centro de referência de um estado brasileiro. **Rev enferm UERJ**, Rio de Janeiro, 2016; 24(6): e 9625.

NASCIMENTO, D. C. DE O.; RALPH, M. T.; BATISTA, J. E. C.; SILVA, D. M. F.; FILHO, M. A. G.; ALENCAR, N. M.; LEAL,.; RAMOS, M.V.; FILHO, J. V. L. Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogene*. **Phytomedicine**. Volume 23, Issue 7, 15 June 2016, Pages 745-753.

OLIVEIRA, B. G. R. B.; CASTRO, J. B. DE A.; GRANJEIRO, J. M. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. **Rev. enferm. UERJ**; 21(1,n.esp):612-617, 2013.

OLIVEIRA, I. V. P. M., & DA CUNHA DIAS, R. V. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2012

OLIVEIRA, J. S.; BEZERRA, D. P.; FREITAS, C. D. T.; MARINHO-FILHO, M. O.; MORAES, J. D. B. PESSOA, C.; LOTUFO, L. V. C.; RAMOS, M. V. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer celllines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**. Volume 21, Issue 8, December 2007, Pages 1563-1573.

OLIVEIRA, R. S. B.; FIGUEIREDO, I. S. T.; FREITAS, L. B. N.; Inflammation induced by phyto modulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella*

infection in a murine model of typhoid fever. **Inflammation Research**, 2012, Volume 61, Number 7, Page 689.

PARDILO, E. F. FARJADO, T. T. ABALOS R. M. SCOLLARD, D. GELBER, R. H. Methods for the classification of Leprosy for Treatment Purposes. **Clinical Infectious Diseases**. 2007; 44(8): 1096-1099.

POWERS, J. G.; MORTON, L. M.; PHILLIPS, T. J. Dressings for chronic wounds. **Dermatologic Therapy**. Volume 26, Issue 3, May/June 2013 Pages 197–206.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact.**, v.4, p.57-67, 2010.

RAMOS, M.V.; DE ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, R.S.B.; OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N. ARAGÃO, K. S.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; BRITO, G.A. C.; FIGUEIREDO, I.S.T. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol**. (2016) 389:747.

RAMOS, M.V.; VIANA, C. A.; SILVA, A.F.; FREITAS, C. D.; FIGUEIREDO, I. S.; OLIVEIRA, R.S.; ALENCAR, N. M.; LIMA-FILHO, J.V.; KUMAR, V.L.; Proteins derived from latex of *C. procera* maintain coagulation homeostasis in septic mice and exhibit thrombin- and plasmin-like activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2012, Volume 58, Page 211.

RÄSÄNEN, K.; VAHERI, A. Proliferation and motility of HaCaT keratinocyte derivatives is enhanced by fibroblast nemes. **Experimental Cell Research**. 316 (2010) 1739 – 1747.

RASIK, A. M.; RAGHUBIR, R.; GUPTA, A.; SHUKLA, A.; DUBEY, M. P.; SRIVASTAVA, S.; JAIN, H. K.; KULSHRESTHA, D.K. Healing potential of *Calotropis procera* on dermal wounds in Guinea pigs. **J.Ethnopharmacol.**, v.68, p.261-266, 1999.

REIS, M. C. Sistema Indutor de Neoformação Tecidual para pé diabético com Circuito Emissor de Luz de Leds e utilização do látex natural. **Tese**, Universidade de Brasília, 2013.

RIVITTI, E. A.; Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. **Artes Médicas Editora**, p. 1-15, 2014.

SANTOS, J. B.; PORTO, S.G.; SUZUKI, L. M.; SOSTIZZO, L. R. Z.; ANTONIAZZI, J. L.; ECHER, I. C. Avaliação e tratamento de feridas, orientações aos profissionais de saúde. Porto Alegre, 2011.

SANTOS, L. C. R. V.; OLIVEIRA, R. C.; SILVA, M. A. Desbridamento Cirúrgico e a Competência Legal Do Enfermeiro. **Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**. Florianópolis, 2013 Jan-Mar; 22(1): 184-92.

SANTOS, V.L.C.G.; Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: Duarte YAO, Diogo MJD. Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico. São Paulo: **Atheneu**; 2000. p.265-306.

SEHGAL, R.; ARYA, S.; KUMAR, V. L. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: A preliminary study. **Indian J. Pharmacol.**, v.37, p.334-335, 2005.

SEIBER, J. N.; NELSON, C. J.; MARK LEE, S. Cardenolides in the latex leaves of Seven. *Asclepias* species and *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, v.21, p.2343- 2348, 1982.

SHEARER, J.D.; RICHARDS, J.R.; MILLS, C.D.; CALDWELL, M.D. Differential regulation of macrophage arginine metabolism: a proposed role in wound healing. **Am J Physiol**: 272 (Endocrinol Metab 35), Washington, p.E181-E190,1997.

SHIVKAR, Y. M.; KUMAR, V. L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators Inflamm.**, v. 12, p.299-302, 2003.

SHUKLA, O. P.; MURTI C. R. K. Properties & partial purification of a bacteriolytic enzyme from the latex of *Calotropis procera* (Madar). **J. Sci. Ind. Res.**, v.20, p.109-112, 1961.

SILVA, M. C. C.; SILVA, A. B.; TEIXEIRA, F. M.; SOUSA, P. C. P.; RONDON, R. M. M.; JÚNIOR, J. E. R. H.; SAMPAIO, L. R. L.; OLIVEIRA, S. L.; HOLONDA, A. N. M.; VASCONCELOS, S. M. M. Therapeutic and biological activities of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2010) 332-336.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, 341 (1999), pp. 738-746.

SINGH, A. N.; SHUKLA, A. K.; JAGANNADHAMB, M.V.; DUBEY, V. K. Purification of a novel cysteine protease, procerain B, from *Calotropis procera* with distinct characteristics compared to procerain. *Process Biochem.*, v. 45, p.399-406, 2010.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S.; KUMAR, V. L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera*: a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v.43, p.219- 224, 2000.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl Cancer Inst.** 4, Jul 1990; 82(13):1107-12.

SMELTZER, S. C. BARE, B. G. HINKLE, J. L. CHEEVER, K. H. Brunner & Suddarth Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. 12ª Edição, vol 1, 2011.

STROHAL, R.; O'BRIEN, J. J.; DISSEMOND, J.; APELQVIST, J. EWMA document: debridement. An updated overview and clarification of the principle role of debridement. **Journal of Wound Care**; 22: S1-S52 (2013).

TALHARI, C.; TALHARI S. PENNA, G. O. GONÇALVES H. S. OLIVEIRA, M. L. W. **Hanseníase**. 5ª edição. Manaus, 2015.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical Aspects Of Leprosy. *Clinics in Dermatology*. 2015; 33(1):26-37.

THEOCHARIDIS, G.; ALEXANDER, Z. D.; BARBER, H.; LEE, D. A.; BRAUM, K. M.; CONNELLY, J. T. Type VI Collagen Regulates Dermal Matrix Assembly and Fibroblast Motility. , Volume 136, Issue 1, January 2016, Pages 74-83.

VALADARES, M. C.; AVALIAÇÃO de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 3(2), 93-98, 2006.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOL, V. J. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, 2009; 37: 1528 – 1542.

VIJAYAN, J. WILDER-SMITH, E. P. Neurological manifestations of leprosy. In Scollard DM, Gillis TP (ed), **International textbook of leprosy**, 2016.

WHO Expert Committee on Leprosy. World Health Organization. Geneva, Switzerland, 2010.

WU, H.M.; YUAN, Y.; ZAWIEJA, D.C.; TINSLEY, J.; GRANGER, H.J. Role of phospholipase C, protein kinases C and calcium in VEGF- induced venular hyperpermeability. **Am J Physiol**, v.276 (Heart Circ. Physiol, v.45), Washington, p.H535-H542, 1999.

YAMADA, B.F.A. Úlceras venosas. In: Jorge SA, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas. São Paulo: **Atheneu**; 2003. p.247-59.

9 ANEXOS

ANEXO I

ADENDO AO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário (a), desta pesquisa. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar. Após ter sido esclarecido(a) sobre o estudo e não tiver dúvidas, se aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias (uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável). Em caso de recusa, não haverá penalidade alguma e você continuará sendo atendido como sempre nesta instituição.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

TÍTULO: *Hanseníase: Combate às complicações secundárias e melhoria da atenção a pacientes através de ferramentas biotecnológicas.*

Este estudo está sendo feito numa parceria de pesquisadores da Universidade Federal do Ceará, do Centro de Dermatologia Dona Libânia (CDERM), e tem como objetivo avaliar os efeitos terapêutico de uma biomembrana contendo proteínas isoladas do látex da planta *Calotropis procera* na cicatrização de feridas perfuro-plantares em pacientes portadores de hanseníase, com propósito que viabilizar sua utilização no âmbito do Sistema Único de Saúde do Ceará (SUS/CE).

Caso deseje participar, inicialmente, após a assinatura do presente termo de consentimento, você será submetido a uma entrevista, para saber se o Sr. ou Sra. tem alergia a algum componente da biomembrana que será utilizada, também serão realizados dois testes de hipersensibilidade às proteínas destas plantas. ASSIM, caso os testes demonstrem que você não tem alergia a proteína das plantas, você participará da pesquisa. Durante o teste, será aplicado um pequeno curativo com a substância ativa da biomembrana no seu braço e será observado o desenvolvimento de alguma reação local. Caso ocorra, será retirado o curativo e não apresentará maior risco, apenas algum grau de desconforto ou irritação em pequena área da pele, que desaparece após a retirada do curativo. Para o outro teste será feita uma biópsia incisional, se necessário, aplicação de anestesia local (xilocaína 2%) o instrumento cirúrgico “punch” de 3mm na borda da úlcera com intenção de se retirar o mínimo de fragmento necessário sem causar dano significativo. Esta amostra será importante para uma avaliação microscópica da úlcera após 30 dias de tratamento.

Após os testes não mostrarem que você tem alergia a algum composto da biomembrana, você será entrevistado e examinado, em relação à suas feridas. Será feito um sorteio do produto que será utilizado em seu tratamento que poderá ser com a biomembrana ou com tratamento padrão (sulfadiazina de prata), faremos seu atendimento. As feridas precisam ser fotografadas, para podermos comparar os resultados do tratamento, mas asseguramos que só focalizaremos a área da ferida. Seu rosto não sairá na fotografia, assim como qualquer parte de seu corpo que não esteja próximo à ferida. As trocas de curativos com o uso dessas membranas ocorrerá no ambulatório de feridas do CDERM, sendo a ferida avaliada em cada visita feita no ambulatório, cerca de três vezes por semana durante um período de no máximo 3 meses.

Esta pesquisa pode trazer ou não benefícios para as pessoas que participarem. Caso um dos produtos seja superior ao outro, imediatamente todos passam a receber o produto que for melhor. No caso de um dos produtos não levar a bons resultados, seu uso será interrompido, e a pessoa passa a receber o produto que for melhor. O(a) sr(a) receberá uma ajuda de custo para o transporte durante a sua participação na pesquisa, e terá que vir ao ambulatório 3 vezes por semana, conforme marcação prévia no CDERM.

O procedimento de troca de curativo e tratamento poderá durar cerca de 30 minutos, lembrando que este tempo poderá sofrer alterações para mais ou para menos tempo, dependendo da evolução da úlcera. Em seguida, sua opinião será solicitada sobre o tratamento (dor, incômodo, ardor, coceira, inchaço, etc.).

Para que a pesquisa seja feita de modo correto, precisamos de sua colaboração em alguns

aspectos que são muito importantes. É necessário que o(a) senhor(a) não retire os curativos durante o tratamento, em casa e nem utilize outros medicamentos sem avisar ao pesquisador previamente. Em caso de haver algum incidente e o curativo molhar, sujar ou se soltar, solicitamos que a pesquisadora seja avisada, por meio de ligações a cobrar, a qualquer hora. Serão tomadas as providências para refazer o curativo sem comprometer os métodos utilizados na pesquisa. Assim que o resultado dos exames de sua ferida ficarem prontos, avisaremos a(o) senhor(a) e ao médico aqui do ambulatório, para decidir se é necessário tomar alguma providência.

Ambos os produtos utilizados não apresentam riscos descritos na literatura conhecida, mas é possível que ocorram reações indesejadas, como ocorre com qualquer produto que entre em contato com o organismo humano. Acreditamos ter tomado todos os cuidados necessários para minimizar riscos decorrentes de sua participação da pesquisa, tais como detecção precoce e acompanhamento de reações adversas. Todas as informações que obtivermos a seu respeito, as fotografias e os resultados dos exames serão sigilosas, de modo que seu nome não seja citado e sua imagem não seja reconhecida por outras pessoas. Sua participação na pesquisa, em caso de aceite será registrada em seu prontuário de atendimento no CDERM, para sua segurança, como recomendam diretrizes nacionais e internacionais de boas práticas em pesquisa. Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos e publicados em revistas científicas, sem que sua identidade seja revelada.

Fique à vontade para entrar em contato com a pesquisadora a qualquer momento, se achar necessário ou sempre que tiver dúvidas sobre seu tratamento.

Em caso de dúvida você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Nylane Maria Nunes de Alencar, no telefone: (85) 3366 8339 (Rua. Cel. Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo). No caso de dúvidas sobre os seus direitos ao participar nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa UFC, no telefone: 3366-8344 (endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1000, Rodolfo Teófilo).

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG: _____ declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário da pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que após sua leitura tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro ainda estar recebendo uma cópia assinada deste termo.

Fortaleza, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante: _____ Data: _____

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____

Assinatura da testemunha: _____ Data: _____

Assinatura do profissional que aplicou o TCLE: _____ Data: _____

ANEXO II

ENTREVISTA INICIAL

Data da coleta de dados: ____/____/____ Incluído no estudo? : ()a) Não ()b) Sim
Grupo: ()1) Controle ()2) Experimental I ()3) Experimental II **Senha:** _____

1. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ RG: _____
Nome da mãe: _____
Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: ()a) masculino ()b) feminino
Endereço: _____
Telefones para contato: _____ Raça: _____
Profissão: _____ Ocupação: _____
Escolaridade: _____ Estado civil: _____

2. HISTÓRICO DE HIPERSENSIBILIDADE:

Antecedentes pessoais de alergia (dermatite de contato, asma, rinite, conjuntivite, urticária, alimentos, medicações, insetos e adesivos/curativos:

3. DADOS E ASPECTOS DA ÚLCERA:

História da ferida (queixa principal, data do início da lesão, primeira úlcera plantar ou recorrente, presença de dor):

Quais os produtos já utilizou para o tratamento desta ferida, inclusive os caseiros:

Faz uso de algum medicamento: ()a) Não ()b) Sim
Se sim, quais e como utiliza?

Faz curativos em casa: ()a) Não ()b) Sim.
Modo de realização, substâncias utilizadas e frequência:

4. EXAME CLÍNICO DA LESÃO:

- Tempo aproximado de úlcera: _____ ()a) aguda ()b) crônica
- Extensão do dano tissular:
- Tamanho da ferida:

Área da ferida em cm²: _____

Largura: _____ cm Comprimento: _____ cm

- Espessura:

() **a**) ferida superficial (limitada à epiderme);

() **b**) ferida com perda parcial de tecido (limitada à epiderme e porção superior da derme);

() **c**) ferida com perda total de tecido (destruição da epiderme, derme, tecido subcutâneo, podendo invadir músculos, tendões e ossos).

- Profundidade:

() < 1 mm () de 1 a < 2 mm () de 1 a < 2 mm

() de 2 a < 3 mm () de 3 a < 5 mm () de 5 a < 7 mm () de 7 mm a < 1,0 cm

() de 1,0 a < 1,5 cm () de 1,5 cm a < 2,0 cm () ≥ 2,0 cm (especificar) _____

- Característica do leito da ferida:

() **a**) granulação saudável () **b**) granulação friável () **c**) fibrina () **d**) necrose () **e**) esfacelo () **e**) epitelização

- Coloração no leito da ferida:

() **a**) esbranquiçado () **b**) amarelo-palha () **c**) amarelo-citrino () **d**) rosado () **e**) avermelhado

() **f**) esverdeado () **g**) acinzentado () **h**) enegrecido/preto

- Exsudato:

() **a**) ausente

() **p**) presente:

() **a**) seroso () **b**) sanguinolento () **c**) sero-sanguinolento () **d**) purulento () **e**) sero-purulento () **f**) fibrinoso

- Quantidade de exsudato (considerando o % aproximado de saturação da cobertura):

() **0** – ausente () **1** + discreto (saturação <30%)

() **2** ++ moderado (30-60%) () **3** +++ acentuado (>60%)

Característica do tecido em volta da ferida:

- Textura da pele :

() **a**) fina () **b**) grossa () **c**) frágil () **d**) áspera () **e**) descamativa () **f**) enrugada () **g**) amolecida

() **h**) friável () **i**) endurecida () **j**) lisa () **k**) inflamada () **l**) macerada () **m**) bordas regulares () **n**) bordas irregulares

- **Turgor:** () **a**) hidratada () **b**) desidratada/ seca/ ressecada

- **Umidade:** () **a**) normal () **b**) excessiva

Queixa de **dor** na área da úlcera **fora de manipulação do leito da ferida** () **a**) Não () **b**) Sim

5. DOENÇAS ASSOCIADAS:

1() Anemia;

2() Diabetes: -glicemia usual _____ mg/dl. Está controlado? () **a**) Sim () **b**) Não

3() Hipertensão: -valores usuais _____ mmHg. Está controlada? () **a**) Sim () **b**) Não

4() Úlceras em pernas ou pés;

5() Varizes;

6() Trombose;

7() Câncer;

8() Doenças de origem infecciosa. Qual? _____

9 () Doença de origem cardíaca ou vascular. Qual? _____

10 () Doença de origem renal. Qual? _____

11 () Outras _____

6. QUANTO Á HANSENÍASE:

Há quanto tempo desenvolveu a doença: _____ Qual a forma clínica: _____

Por quanto tempo usou a medicação: _____ Usa alguma

medicação: _____

Atualmente faz algum tipo de tratamento: _____

7. DADOS DE CARACTERIZAÇÃO SÓCIOECONÔMICA:

Reside com família: () **a**) Não () **b**) Sim

nº de pessoas na residência: _____ nº de cômodos nas casa: _____

Renda mensal: () **a**) < 1 salário () **b**) 1-2 salários () **c**) 3-4 salários () **d**) > 4 salários

Quantas pessoas vivem com esta renda () **a**) 1 () **b**) 2-3 () **c**) 4-5 () **d**) > 5

8. ALIMENTAÇÃO E HIDRATAÇÃO:

A água que bebe é filtrada: () **a**) Não: _____ () **b**) Sim

Ingere bebida alcoólica: () **a**) Não

() **a**) Sim – Quantidade diária e tipo de bebida : _____

Considerando líquidos como água, leite, suco, chás, refrigerante, quantos copos ingere, ao todo, por dia:

() **a**) < 1l/dia (até 3 copos) () **b**) 1-2 l/dia (de 4 a 8) () **c**) mais que 2 l/dia (mais de 9 copos)

9. ATIVIDADE DE VIDA DIÁRIA:

Costuma ficar muito tempo na mesma posição (sentado, de pé, ou deitado), sem se movimentar?

() **a**) Não () **b**) Sim – especificar as posições e o respectivo tempo de permanência sem movimento

A ferida dificulta a sua vida diária:

() **a**) Não () **b**) Sim Como? _____

Toma medicamentos para dormir: () **a**) Não () **b**) Sim

Faz algum tipo de atividade física:

() **a**) Não () **b**) Sim - Qual e frequência _____

Esbarra os MMII com frequência: () **a**) Não () **b**) Sim

Lava as mãos antes e depois de tocar na ferida: () **a**) Não () **b**) Sim

Possui animais domésticos: () **a**) Não () **b**) Sim Dentro de casa () **a**) Não () **b**) Sim

Possui algum tipo de alergia: () **a**) Não () **b**) Sim

Qual o alérgeno? _____

PESQUISADOR

RESPONSÁVEL: _____

AUXILIAR DE PESQUISA: _____

ANEXO III

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE USO DE IMAGEM:

Eu _____, CPF _____, RG _____,

depois de conhecer e entender os objetivos, procedimentos metodológicos, riscos e benefícios da pesquisa, bem como de estar ciente da necessidade do uso de minha imagem e/ou depoimento, especificados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), AUTORIZO, através do presente termo, a pesquisadora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar do projeto de pesquisa intitulado **“Hanseníase: Combate às complicações secundárias e melhoria da atenção a pacientes através de ferramentas biotecnológicas.”** a realizar as fotos que se façam necessárias e/ou a colher meu depoimento sem quaisquer ônus financeiros a nenhuma das partes.

Fortaleza, ____ de _____ de 201 ____ .

Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Sujeito da Pesquisa

ANEXO IV

EVOLUÇÃO DA ÚLCERA

Nome: _____

Grupo: _____ Data (início): ___/___/___

Número de feridas que possui este paciente: _____

Localização das feridas:

| Data | | | | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|--|--|
| Comprimento x largura | | | | | | |
| Fibrina/Necrose | | | | | | |
| Granulação | | | | | | |
| Epitelização | | | | | | |

Legenda:

| | |
|-----|--|
| + | Até 1/3 da área superficial da lesão |
| ++ | Até 2/3 da área superficial da lesão |
| +++ | Mais de 2/3 da área superficial da lesão |

Outros aspectos:
