



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

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES BULEGON

EFICÁCIA DE UMA BIOMEMBRANA COM PROTEÍNAS DO LÁTEX DA PLANTA
***Calotropis Procera* NA CICATRIZAÇÃO: UMA ALTERNATIVA NO SUS PARA O**
TRATAMENTO DA ÚLCERA PLANTAR ASSOCIADA À HANSENÍASE.

FORTALEZA-CE

2024

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES BULEGON

EFICÁCIA DE UMA BIOMEMBRANA COM PROTEÍNAS DO LÁTEX DA PLANTA *Calotropis Procera* NA CICATRIZAÇÃO: UMA ALTERNATIVA NO SUS PARA O TRATAMENTO DA ÚLCERA PLANTAR ASSOCIADA À HANSENÍASE.

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia

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

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

B95e Bulegon, Marília de Oliveira Nunes.

Eficácia de uma biomembrana com proteínas do látex da planta *Calotropis procera* na cicatrização: uma alternativa no sus para o tratamento da úlcera plantar associada à hanseníase. / Marília de Oliveira Nunes Bulegon. – 2024.
108 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar..

1. hanseníase. 2. *Calotropis procera*. 3. úlcera plantar. 4. curativo. 5. látex. I. Título.

CDD 615.1

MARÍLIA DE OLIVEIRA NUNES BULEGON

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

Aprovado em 08/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ariclecio Cunha de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Gisele de Fátima Pinheiro Rangel
Instituto Doutor José Frota

Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira
Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAr)

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Aos meus pais, Mauro Nunes e Sandra Nunes que me ensinaram a importância do estudo e aos meus filhos para que também trilhem este caminho. Dedico este trabalho também à Professora Nylane que sempre sonhou em contribuir, através da pesquisa científica, com a saúde das pessoas mais necessitadas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

À Universidade Federal do Ceará (UFC) que me formou como profissional farmacêutica e mestre em Farmacologia.

Ao Núcleo De Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) que me proporcionou toda a infraestrutura e modernos equipamentos de altíssima qualidade.

À Profa. Dra. Nylane Alencar, pela excelente orientação, seus ensinamentos serão necessários durante toda minha vida profissional, mas também pela formação humana, pelos valores transmitidos e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Márcio Ramos, que foi idealizador do projeto e contribuiu com minha formação acadêmica, especialmente na escrita de artigos. Gratidão à disponibilidade do laboratório de Biotecnologia do Látex Vegetal pelo isolamento da fração proteica LP e por todo apoio neste estudo.

A todos os professores que contribuíram na minha formação.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo disponibilizado e pelas valiosas colaborações.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Bioquímica e aos técnicos sem os quais não seria possível realizar este trabalho. Gratidão pela parceria nos experimentos, pelos protocolos ensinados e pela amizade, especialmente à grande amiga Kayanny.

À toda a equipe do Centro de Referência em Dermatologia Dona Libânia (CDERM) em especial a Maria Araci de Andrade Pontes e ao senhor Raimundo que nos acolheram para realizar o estudo clínico.

À toda minha família que me incentivou e me deu todo o suporte durante o trabalho. Gratidão aos meus pais Mauro e Sandra, minha irmã Camila, meu cunhado Renan, meu esposo Rodrigo e meus filhos Bento, João, Antônio e Tomás.

À Deus que me deu os dons necessários para desenvolver este trabalho e por ter me escolhido para fazer parte deste estudo que tanto me deu alegria e satisfação. À Nossa Senhora, a quem consagrei minha vida, não poupou graças para o sucesso deste trabalho.

“Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos.” Santa Teresa de Calcutá.

RESUMO

A planta *Calotropis procera* tem sido associada a diversas atividades biológicas. Ensaio pré-clínicos consistentes demonstraram que uma Biomembrana de álcool polivinílico (1%) incorporada com proteínas de látex (10%) de *Calotropis procera* denominada BioMemCpLP foi biocompatível e estimulou a cicatrização de feridas em modelos animais. Curativos para tratar úlceras plantares são normalmente onerosos e de difícil acesso para a população acometida, portanto este estudo clínico randomizado multicêntrico teve o objetivo de avaliar a eficácia e segurança da BioMemCpLP em úlceras plantares associadas à hanseníase a fim de viabilizar seu uso padronizado pelo SUS. Além disso, foi investigado o efeito da BioMemCpLP em queratinócitos e os mecanismos envolvidos processo de cicatrização *in vitro*. A avaliação da eficácia foi realizada ao longo de 8 semanas e 23 pacientes foram incluídos e um total de 32 úlceras tratadas. Quinze pacientes (22 úlceras) foram tratados com BioMemCpLP. Cinco pacientes (5 úlceras) foram tratados apenas com Sulfadiazina de prata e o terceiro grupo com três pacientes (5 úlceras) recebeu Hidrocolóide como tratamento, estes protocolos são utilizados rotineiramente nos ambulatórios dos centros especializados. O protocolo de tratamento foi realizado com troca de curativo três vezes por semana, em dias alternados. As úlceras foram avaliadas semanalmente quanto à taxa de cicatrização calculada através da área medida a cada semana como desfecho primário, o tempo de fechamento da úlcera bem como a influência das características clínicas na cicatrização. Foram realizados ensaios *in vitro* de proliferação, migração e adesão, bem como a avaliação da expressão das moléculas envolvidas nestes processos E-caderina e β -catenina em queratinócitos humanos (HaCat). As úlceras tratadas com BioMemCpLP exibiram maior área de cicatrização do que as dos controles. Mais de 88% das úlceras tratadas com BioMemCpLP foram totalmente curadas após 8 semanas de tratamento, enquanto ambos os grupos de controle atingiram apenas 11,8% ($p=0,041$) da cura total. A úlceras tratadas com a BioMemCpLP cicatrizaram em menor tempo que os grupos controles. Esse desempenho superior foi associado apenas ao uso do BioMemCpLP, não correlacionado com idade/sexo, idade/localização da úlcera, deformidade ou se o paciente foi curado ou não da hanseníase. Este estudo demonstrou que as proteínas do látex extraídas de

Calotropis procera são bioativas para promover a cicatrização de úlceras sem efeitos colaterais perceptíveis. O efeito cicatrizante pode ser justificado pelo fato de que as proteínas que compõe a biomembrana estimularam a proliferação, migração e adesão celular dos queratinócitos além de estimular a expressão de E-caderina e β -catenina mostrando, desse modo, grande potencial para cicatrização de feridas.

Palavras-chave: hanseníase; úlcera plantar; cicatrização; *Calotropis procera*; curativo.

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF A BIOMEMBRANE WITH LATEX PROTEINS FROM THE PLANT *Calotropis Procera* IN HEALING: AN ALTERNATIVE IN THE SUS FOR THE TREATMENT OF PLANT ULCER ASSOCIATED WITH LEPROSY.

The *Calotropis procera* plant has been associated with several biological activities. Consistent preclinical trials have demonstrated that a polyvinyl alcohol (1%) biomembrane incorporated with *Calotropis procera* latex proteins (10%), known as BioMemCpLP, is biocompatible and stimulates wound healing in animal models. Dressings for treating plantar ulcers are typically expensive and difficult to access for the affected population. Therefore, this randomized multicenter clinical study aimed to evaluate the efficacy and safety of BioMemCpLP in plantar ulcers associated with leprosy, with the goal of enabling its standardized use by the SUS. Additionally, the effect of BioMemCpLP on keratinocytes and the mechanisms involved in the healing process were investigated in vitro. The efficacy assessment was conducted over 8 weeks, with 23 patients enrolled and a total of 32 ulcers treated. Fifteen patients (22 ulcers) were treated with BioMemCpLP, five patients (5 ulcers) received treatment only with silver sulfadiazine, and the third group, consisting of three patients (5 ulcers), received hydrocolloid treatment. These protocols are routinely used in the outpatient clinics of specialized centers, with dressings being renewed three times a week on alternate days. The ulcers were evaluated weekly, with the healing rate calculated using the measured area each week as the primary outcome, along with the time it took for the ulcer to close, and the influence of clinical characteristics on healing. In vitro proliferation, migration, and adhesion assays were carried out, along with the evaluation of the expression of the molecules involved in these processes, namely E-cadherin and β -catenin, in human keratinocytes (HaCat). Ulcers treated with BioMemCpLP exhibited a greater healing area compared to controls. More than 88% of ulcers treated with BioMemCpLP were completely healed after 8 weeks of treatment, while both control groups achieved only 11.8% ($p=0.041$) of complete healing. Ulcers treated with BioMemCpLP also healed in less time than those in the control groups. This superior performance was associated solely with the use of BioMemCpLP and was not correlated with age/sex, age/ulcer location, deformity, or whether or not the patient was cured of leprosy. This study demonstrated that latex proteins extracted from *Calotropis procera* are bioactive in promoting ulcer healing

without noticeable side effects. The healing effect can be attributed to the proteins that make up the biomembrane, which stimulate the proliferation, migration, and cellular adhesion of keratinocytes, in addition to promoting the expression of E-cadherin and β -catenin, thus indicating great potential for wound healing.

Keywords: leprosy; plantar ulcer; wound healing; *Calotropis procera*; bandages.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fases da cicatrização da ferida.	13
Figura 2. Mecanismos envolvidos na cicatrização de úlceras crônicas.....	21
Figura 3. Imagem da planta <i>Calotropis procera</i>	26
Figura 4. Esquema de preparo da BioMemCpLP	34
Figura 5. Troca do curativo.....	37
Figura 6. Esquema ilustrativo do ensaio de cicatrização in vitro	40
Figura 7. Esquema ensaio de adesão.....	41
Figura 8. Fluxograma do estudo clínico	43
Figura 9. Evolução clínica das úlceras plantares após tratamento com biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.....	45
Figura 10. Taxa média de cicatrização das úlceras plantares após tratamento com Biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.	46
Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier com evolução clínica das úlceras plantares após tratamento com Biomembrana, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata.	47
Figura 12. Úlceras de pequena extensão.....	50
Figura 13. Úlceras de média extensão.....	51
Figura 14. Úlceras de maior extensão	53
Figura 15. Efeito de CpLP na citotoxicidade e proliferação de células HaCat.....	58
Figura 16. Efeito de CpLP na migração de queratinócitos HaCat.	59
Figura 17. Fotomicrografia em microscopia óptica de queratinócitos HaCat observados após arranhão da monocamada celular do teste de cicatrização in vitro.	60
Figura 18. Efeito de BioMemCpLP (0,2 e 0,1%) na adesão de células HaCat.....	62
Figura 19. Fotomicrografia em microscopia óptica da adesão dos queratinócitos HaCat em BioMemCpLP.....	62
Figura 20. Efeito do tratamento com CpLP na liberação de mediadores envolvidos na proliferação, migração e reepitelização de células HaCat.....	64
Figura 21. Resumo das ações propostas da BioMemCpLP	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de curativos disponíveis para o tratamento de úlceras crônicas	25
Tabela 2. Caracterização da amostra de pacientes com úlceras plantares tratados com Biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.	44
Tabela 3. Influência das características clínicas e tratamento com Biomembrana, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata em pacientes com úlcera plantar.	48
Tabela 4. Análise multivariada dos fatores determinantes na cicatrização de úlceras plantares em pacientes tratados com Biomembrana, Hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.	49
Tabela 5 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo BioMemCpLP (n=22 úlceras)	54
Tabela 6 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo Hidrocolóide de prata (n=5 úlceras)	56
Tabela 7 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo Sulfadiazina de prata (n=5 úlceras)	56
Tabela 8 – Resultado da análise clínico das úlceras dos pacientes dos grupos BioMemCpLP, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BB	Boderline boderline
BL	Boderline lepromatosa
BT	Boderline tuberculóide
CD	Célula dendrítica
CDERM	Centro de Dermatologia Sanitária Dona Libânia
CpLP	Fração proteica do látex de <i>Calotropis procera</i>
CS	Célula de schwann
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
GADPH	Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GIF	Grau de incapacidade física
GSK-3 β	Enzima glicogênio sintase quinase 3 β
IFN- β	Interferon- β
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
ISSO	Organização Internacional de Normalização
LL	Lepromatosa
MB	Multibacilar
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase

MS	Ministério da Saúde
NFKB	Fator nuclear kappa B
NOS	Óxido nítrico sintase
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Tampão fosfato-salino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PI3K	Fosfatidil-inositol 3-quinase
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMN	Polimorfosnucleares
PQT	Poliqimioterapia
PU	Poliuretano
PVA	Álcool polivinílico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricloroacético
TGF – β	Fator de Crescimento Transformador β
TIMPs	Inibidores de metaloproteinases
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TT	Tuberculóide
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
SUMÁRIO.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 ASPECTOS CLÍNICOS DA HANSENÍASE	9
1.1.1 <i>Contexto epidemiológico atual.....</i>	<i>10</i>
1.1.2 <i>Úlcera plantar decorrente da hanseníase.....</i>	<i>11</i>
1.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO NORMAL.....	12
1.2.1 <i>Hemostasia.....</i>	<i>13</i>
1.2.2 <i>Inflamação.....</i>	<i>14</i>
1.2.3 <i>Proliferação</i>	<i>15</i>
1.2.4 <i>Remodelação</i>	<i>17</i>
1.3 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CRÔNICAS	17
1.3.1 <i>Tratamentos para úlceras crônicas.....</i>	<i>22</i>
1.4 MATERIAIS POLIMÉRICOS PARA CURATIVOS DE ÚLCERAS CRÔNICAS.....	25
1.4.1 <i>Biomembrana composta de proteínas do látex de Calotropis procera</i>	<i>26</i>
2 JUSTIFICATIVA.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3.2.1 <i>Estudo clínico</i>	<i>32</i>
3.2.2 <i>Estudo in vitro.....</i>	<i>32</i>
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 PROCESSAMENTO DO LÁTEX E PREPARO DA BIOMEMBRANA	33
4.2 ESTUDO CLÍNICO	34
4.2.1 <i>Desenho do estudo.....</i>	<i>34</i>
4.2.2 <i>Amostra</i>	<i>36</i>

4.2.3	<i>Intervenções</i>	36
4.2.4	<i>Avaliação clínica</i>	37
4.3	PROCOLOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> COM QUERATINÓCITOS HUMANOS (HaCat)	38
4.3.1	<i>Cultivo celular</i>	38
4.3.2	<i>Testes de toxicidade e proliferação celular</i>	38
4.3.3	<i>Teste de migração celular</i>	39
4.3.4	<i>Teste de adesão celular</i>	40
4.3.5	<i>Expressão de E-caderina , β-Catenina e p63 em queratinócitos humanos</i> ..	41
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS	43
5.1	ESTUDO CLÍNICO	43
–	54	
5.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	57
5.2.1	<i>A fração CpLP promove a proliferação de queratinócitos humanos (HaCat)</i>	57
5.2.2	<i>A fração CpLP estimula a migração celular in vitro</i>	58
5.2.3	<i>A BioMemCpLP (0,2 e 0,1%) estimula a adesão de células HaCat</i>	61
5.2.4	<i>CpLP estimula a expressão de E-caderina, B-catenina e P63</i>	63
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÃO	76
8	REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE II	89
APÊNDICE III	95
APÊNDICE IV	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos clínicos da hanseníase

A hanseníase afeta os humanos há mais de 4.000 anos e é uma doença estigmatizada até agora. É uma doença infecciosa, transmissível e de caráter crônico, que ainda persiste como problema de saúde pública no Brasil. Seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, e pelo mais recentemente descoberto *Mycobacterium lepromatosis*. O bacilo causador da doença afeta principalmente os nervos periféricos, olhos e pele. A doença atinge pessoas de ambos os sexos e de todas as faixas etárias, podendo apresentar evolução lenta e progressiva e, quando não tratada, é passível de causar deformidades e incapacidades físicas, muitas vezes irreversíveis (SAÚDE, 2019).

A transmissão tem risco aumentado em indivíduos que vivem em contato próximo com pacientes com hanseníase, provavelmente por aerossóis infecciosos, criados por tosse e espirro, mas possivelmente também por contato direto. Hoje sabe-se também que a transmissão zoonótica é possível tendo em vista que foram encontrados reservatórios do *M. leprae* em animais como tatus e esquilos (PLOEMACHER *et al.*, 2020).

Mycobacterium leprae é a única bactéria conhecida que infecta as células de Schwann (CSs) dos nervos periféricos. Além das CSs, o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que infecta macrófagos e células dendríticas; afeta principalmente a pele, mucosas e nervos, mas pode ser transportado dentro dessas células para qualquer parte do corpo (PINTO *et al.*, 2020). O *M. leprae* tem como alvo CSs pela ligação à laminina- $\alpha 2$ e adesinas e aos receptores de células da superfície nervosa periférica (α -dístroglicano e ErbB2). Após a internalização pelas CSs, a bactéria desencadeia a diferenciação em células imaturas, adequadas para sua proliferação. O *M. leprae* se replica lentamente e após seu reconhecimento pelas células T, inicia uma reação inflamatória crônica, causando desmielinização e incapacidades mediada pela perda da condutância axonal (CHAVES *et al.*, 2020).

Atualmente, o diagnóstico da hanseníase se baseia em manifestações clínicas detalhadas ao exame físico como a presença de lesões características, além de biópsia da pele e/ou esfregaço (CHAVES *et al.*, 2020). Após o diagnóstico, e com

base nas diferentes respostas imunes observadas nas lesões dos pacientes, a hanseníase pode ser categorizada em cinco grupos: tuberculóide (TT), borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB), borderline lepromatosa (BL) e lepromatosa (LL). A Organização Mundial da Saúde classifica a hanseníase clinicamente em multibacilar (MB) e paucibacilar (PB), de acordo com o número de lesões cutâneas e envolvimento nervoso, além da baciloscopia, que quando positiva, classifica-se como multibacilar. Durante o curso infeccioso crônico, os episódios inflamatórios agudos imunomediados denominados reações hansênicas frequentemente ocorrem (MI; LIU; ZHANG, 2020).

O tratamento padrão para adultos recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) inclui a poliquimioterapia (PQT) de 12 meses para multibacilares e 6 meses para paucibacilar onde administra-se 600mg/mês de Rifampicina, 300mg/mês de Clofazimina e 100mg/dia de Dapsona. Durante o tratamento é recomendado o monitoramento laboratorial com hemograma e testes de função hepática (MAYMONE *et al.*, 2020).

1.1.1 Contexto epidemiológico atual

Apesar da existência de um tratamento eficaz, em 2020, foram reportados à OMS 127.396 casos novos da hanseníase no mundo. Desses, 19.195 (15,1%) ocorreram na América e 17.979 foram notificados no Brasil, o que corresponde a 93,6% do número de casos novos das Américas. Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, sendo superado apenas pela Índia (OMS, 2021).

A disfunção dos nervos periféricos resultando em anestesia da pele é uma das manifestações clínicas mais salientes da hanseníase, o que leva ainda mais a incapacidades, incluindo úlceras. As úlceras plantares são uma das complicações mais comuns da hanseníase, levando à incapacidade de grau 2 (GIF2) e ocorrem em cerca de 10% a 20% dos pacientes (UPPUTURI B, SRIKANTAM A, 2020).

Quando não há comprometimento neural os pacientes são classificados como grau 0 de incapacidade física, o grau 1 de incapacidade ocorre quando há diminuição ou perda de sensibilidade nos olhos, mãos e pés e grau 2 de incapacidade quando há lesões mais graves nos olhos, mãos e pés (MS, 2010).

Em relação ao grau de incapacidade física, mais de 7 mil casos novos foram diagnosticados com GIF 2, distribuídos nos 64 países que reportaram casos no mundo. Índia e Brasil foram os únicos países que diagnosticaram mais de mil casos novos com GIF 2 no momento do diagnóstico, com 1.572 e 1.504 casos, respectivamente (OMS, 2021).

Dados preliminares do Ministério da Saúde apontam que, em 2022, mais de 17 mil novos casos de hanseníase foram diagnosticados no Brasil. Em 2021, o número de registros alcançou 18 mil casos, com 11,2% dos pacientes considerados como grau 2 de incapacidade física.

Segundo o boletim epidemiológico de Hanseníase de 2022, observa-se que a proporção de casos novos com ensino fundamental incompleto é maior em todas as regiões do país. Houve diferenças regionais para os casos registrados como analfabetos, sendo a maior proporção na região Nordeste, com 11,1%. Esses dados demonstram que o surgimento da doença está relacionado a uma população mais vulnerável economicamente e, portanto, o acometimento da úlcera plantar ocorre principalmente nestes pacientes.

1.1.2 Úlcera plantar decorrente da hanseníase

As úlceras plantares são geralmente indolores e aumentam de tamanho sem cicatrizar por semanas a meses. Com o tratamento, uma úlcera aguda pode cicatrizar, porém comumente a úlcera pode persistir se tornando uma úlcera crônica. As úlceras crônicas são caracterizadas por bordas hiperqueratósicas com base fibrosa e o centro composto por tecido de granulação pálida exibindo secreção escassa. Úlceras plantares de longa data e não tratadas além de gerar um extremo impacto na qualidade de vida do paciente, podem levar a amputação transmetatarsiana ou plantar e sofrer inclusive alterações malignas (NATALLYA *et al.*, 2019; Y-SCHWARTZMAN *et al.*, 2019).

A fisiopatologia da úlcera plantar na hanseníase envolve principalmente o acometimento do nervo tibial posterior causada pela neuropatia periférica decorrente da desmielinização das CSs, levando a perda de sensibilidade protetora que, após trauma repetido devido a comprometimento sensorial, causa a formação de calos e superinfecção. Além disso, ocorre paralisia da musculatura intrínseca, garra de

artelhos, perda do coxim normal sob a cabeça dos metatarsianos e do volume dos músculos intrínsecos, pele anidrótica, pé caído e alteração na arquitetura óssea, que ocasiona pressão exagerada sob a cabeça dos metatarsianos e calcâneo, na sustentação e distribuição do peso corpóreo (MONTEIRO *et al.*, 2013)

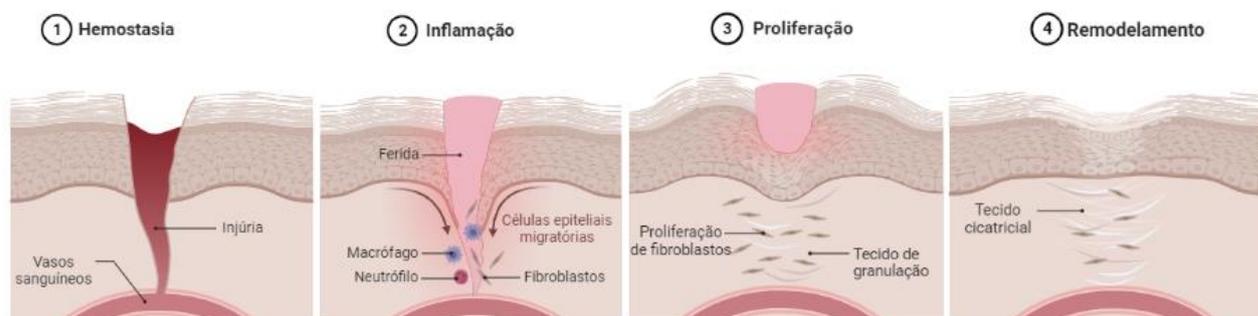
A cicatrização lenta dessas úlceras crônicas é exacerbada pelo baixo suprimento sanguíneo, inflamação crônica, falta de fatores de crescimento, desequilíbrio de citocinas, senescência de fibroblastos e inibição na proliferação de queratinócitos (NATALLYA *et al.*, 2019; LAUREL; MORTON; PHILLIPS, 2019).

Pacientes portadores de comorbidades subjacentes em pacientes com hanseníase que possa causar neuropatia ou distúrbios vasculares, como diabetes ou hipertensão, representam um risco maior de desenvolvimento de úlceras crônicas como a úlcera plantar e podem ter implicações adicionais no processo de cicatrização (UPPUTURI; SRIKANTAM, 2020).

1.2 Processo de cicatrização normal

Após uma ferida superficial, a principal função de barreira da pele é perdida, então diferentes sistemas são ativados no local para eliminar o material estranho e, eventualmente, restaurar a estrutura normal da pele. Após a cicatrização, a maioria das funções essenciais da pele será reestabelecida. Durante o processo de cicatrização normal, várias células inflamatórias, quimiocinas, citocinas, moléculas de matriz e nutrientes para a ferida local com um aumento concordante no metabolismo demanda. Esses processos ocorrem simultaneamente e são geralmente divididos em quatro principais fases da cicatrização de feridas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (**Figura 1**) (HAN; CEILLEY, 2017).

Figura 1- Fases da cicatrização da ferida.



Fonte: Elaborado pelo autor com Biorender. Observa-se a visão geral das fases, também mostra o envolvimento das principais populações celulares envolvidas nas diferentes fases. A cicatrização normal de feridas geralmente progride através da ativação de um programa imunológico inato envolvendo o recrutamento de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos (1). As respostas anti-inflamatórias são desencadeadas por vários mecanismos, incluindo eferocitose e mudança fenotípica do macrófago para suprimir a inflamação e iniciar eventos de reparação (2). Esses eventos compreendem proliferação de fibroblastos e queratinócitos que permitem a reepitelização, formação de tecido de granulação, angiogênese (3), deposição de colágeno e formação do tecido cicatricial (4).

1.2.1 Hemostasia

A hemostasia ocorre através de um tampão de fibrina e plaquetas, que desencadeia a cascata de coagulação. A fibrina, derivada do fibrinogênio derivado de plaquetas, atua como uma matriz para entrada macrófagos e fibroblastos. Danos a células endoteliais expõe o colágeno que estimula as plaquetas para que sofram ativação, adesão e agregação. A degranulação dos grânulos α das plaquetas leva à liberação de certos fatores, incluindo fator plaquetário 4 (PF4), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), crescimento de hepatócitos fator de transformação e fator de crescimento- β 1 (TGF- β 1), que são cruciais para o início de processos inflamatórios. O componente mais abundante dos grânulos α , PF4, facilita o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, diferenciação de monócitos e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O TGF- β 1 derivado de plaquetas estimula a proliferação de queratinócitos, bem como a remodelação e regeneração da camada epidérmica. Finalmente, o PDGF induz a quimiotaxia e proliferação de células imunes e estruturais e promove a formação de novos vasos sanguíneos e tecido de granulação (HAN; CEILLEY, 2017; RAZIYEVA *et al.*, 2021)

1.2.2 Inflamação

A fase inflamatória da cicatrização começa logo após a hemostasia ser alcançada, e o principal objetivo desta fase é eliminar patógenos, bem como materiais estranhos da ferida e para conter o dano local. Esta fase é caracterizada pela presença de neutrófilos e macrófagos pró-inflamatórios no local da lesão. Estas células visam principalmente realizar a limpeza da ferida. Além disso, a permeabilidade vascular aumenta, permitindo que neutrófilos e monócitos migrem para o local da ferida. (HAN; CEILLEY, 2017).

Após a lesão cutânea, a resposta inflamatória aguda é ativada por padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que podem ativar vários receptores de reconhecimento de patógenos, incluindo receptores semelhantes a Toll (TLRs), na superfície de monócitos/macrófagos residentes, neutrófilos, células dendríticas (CDs), células T, mastócitos e queratinócitos. Os queratinócitos desempenham um papel importante na promoção do início da fase inflamatória. Eles expressam diferentes TLRs, como TLR-3, TLR-4 e TLR-9, que são regulados positivamente em feridas agudas. Os TLRs expressos na superfície dos queratinócitos reconhecem os DAMPs liberados pelas células lesadas, o que resulta na ativação do próprio receptor e posterior expressão de citocinas (IFN- β , TNF- α , IL-8, IL-18 e IL-36 γ) e quimiocinas. Particularmente, o TLR-4 ativa as vias de sinalização TLR4/p38 e JNK MAPK, resultando na estimulação da produção de citocinas inflamatórias (RAZIYEVA *et al.*, 2021).

Ainda na fase inflamatória, os macrófagos não apenas fagocitam e digerem restos de tecido e neutrófilos restantes no processo chamada eferocitose, mas também secretam fatores crescimento e citocinas que promovem a proliferação e migração celular. Está bem estabelecido que os macrófagos da pele desempenham um papel crucial na cicatrização de feridas agudas (HAN; CEILLEY, 2017).

Recentemente, os macrófagos foram classificados em três tipos com base em suas funções durante a cicatrização: macrófagos pró-inflamatórios, pró-cicatrização de feridas e pró-resolução. Macrófagos pró-inflamatórios produzem mediadores inflamatórios, como óxido nítrico, ROS, IL-1, IL-6 e TNF- α , além de MMP-2 e MMP-9. Os macrófagos pró-cicatrização são responsáveis pelo reparo tecidual e neovascularização, que é mediada por PDGF, fator de crescimento

semelhante à insulina 1 (IGF-1), VEGF e TGF- β 1. A liberação de IL-10 e PDGF- β por macrófagos associados à ferida induz o reparo epitelial. Por fim, os macrófagos pró-resolutivos possuem propriedades imunorreguladoras, ou seja, inibem a inflamação e as células imunes pela secreção de IL-10, arginase 1, molécula semelhante à resistina- α , ligante de morte programada 2 e TGF- β 1 (ARAÚJO *et al.*, 2011; KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

Além dos fenótipos mencionados, foi demonstrado um subtipo único de macrófagos que se forma quando os macrófagos da pele englobam células endoteliais apoptóticas. Esses macrófagos possuem características dos fenótipos M1 e M2. Juntos, os macrófagos da pele participam ativamente de todos os estágios da cicatrização de feridas agudas e são essenciais para a resolução adequada da ferida (XU *et al.*, 2021).

1.2.3 Proliferação

Após cerca de 3 dias a partir da ferida inicial, a fase proliferativa é marcada pela intensa mitose de fibroblastos, que, estimulados por TGF- β produzem proteínas estruturais, incluindo colágeno, elastina, proteínas da matriz extracelular e metaloproteinases da matriz (MMPs), promovendo a restauração do tecido conjuntivo e reestabelecendo a força do novo tecido. As MMPs degradam o tampão de fibrina inicial e facilitam o movimento dos fibroblastos. Enquanto isso, as células endoteliais entram em uma rápida fase de crescimento e a angiogênese, estimulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ocorre dentro do tecido de granulação, criando uma rica vascularização que nutre e oxigena o novo tecido (HAN; CEILLEY, 2017; MORTON; PHILLIPS, 2019).

Além disso, a reepitelização é orquestrada pela proliferação e migração de queratinócitos estimulados por TGF- β e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) que deslizam sobre as células já existentes e se instalam na borda da ferida (MORTON; PHILLIPS, 2019).

Os queratinócitos estão correlacionados com a expressão de p63, um marcador de células proliferativas indiferenciadas e desenvolvimento de epitélio estratificado. O fator de transcrição p63 desempenha um papel essencial na manutenção do potencial proliferativo das células-tronco epidérmicas (SUZUKI;

SENOO, 2013).

Outro fator determinante nesta fase é a expressão membranosa de E-caderina, uma glicoproteína de superfície celular dependente de cálcio responsável pela adesão célula-célula, é essencial para estabelecer a integridade epitelial. No contexto da reepitelização da ferida, a expressão de E-caderina é crucial para o controle da polaridade celular, diferenciação, crescimento e migração (BARUI *et al.*, 2011). A perda de E-caderina é uma característica da Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT), que se caracteriza pelo aumento da migração celular, particularmente durante a reepitelização. A ocorrência da EMT é imprescindível no processo de cicatrização de feridas, que é estreitamente regulada pela ativação e supressão de várias proteínas moleculares, como MMPs, Twist, Snail, E-caderina e ocludina. (YANG, H. *et al.*, 2016)

A β -catenina, um mediador chave na via de sinalização Wnt canônica, desempenha um papel proeminente durante a fase proliferativa do reparo de feridas. A sinalização Wnt canônica é mediada por um complexo multiproteico, incluindo glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3 β), que tem como alvo a β -catenina para degradação mediada por ubiquitina. A inibição da degradação de β -catenina mediada por ubiquitina resulta no acúmulo citoplasmático e subsequente translocação nuclear de β -catenina. A ligação da β -catenina aos fatores das células T (Tcfs) no núcleo forma um complexo de ativação transcricional que induz a expressão de genes alvo específicos do tipo de célula, regulando o tamanho da cicatriz remanescente após o reparo da ferida. Foi demonstrado que um subconjunto de células no tecido de granulação da ferida exibe atividade transcricional mediada por β -catenina/Tcf aumentada, que retorna à linha de base após a fase proliferativa. No entanto, a contribuição relativa da sinalização de β -catenina em tipos de células específicos no reparo de feridas não está completamente elucidada (YANG, H. *et al.*, 2016).

A expressão β -catenina em macrófagos é essencial para o reparo normal de feridas, regulando a motilidade e a adesão das células macrófagas, controlando, em última análise, o recrutamento das células críticas responsáveis pelo reparo normal no leito da ferida (AMINI-NIK *et al.*, 2014).

1.2.4 Remodelação

Após cerca de 2 a 3 semanas, inicia-se uma remodelação, ou amadurecimento, fase em que o tipo de colágeno é restaurado para habitual (tipo I, em vez do tipo III visto em uma nova ferida) e o tecido da ferida amadurece, resultando em reticulação completa e restauração de uma estrutura fisiologicamente normal, porém a força do tecido antes da lesão nunca atinge seu estado normal (HAN; CEILLEY, 2017)

Alguns fatores extrínsecos também contribuem para a resolução da ferida como o suprimento de oxigênio, o que requer boa circulação sanguínea e um estado nutricional normal, principalmente a ingestão de proteínas bem como quantidades normais de vitamina A,C e E (CASEY, 2016).

1.3 Processo de cicatrização de úlceras crônicas

O processo fisiológico de cicatrização de feridas inclui quatro etapas descritas anteriormente, cujo processo ideal e bem coordenado garante uma cicatrização adequada. No entanto, quando as feridas não seguem esse processo organizado, a cicatrização do tecido da pele é retardada, resultando em feridas crônicas. Estas feridas apresentam geralmente características comuns como exsudação, infecção recorrente, necrose tecidual, reepitelização defeituosa, diminuição da angiogênese e superprodução de ROS (RAZIYEVA *et al.*, 2021).

As feridas que apresentam dificuldades de cicatrização são categorizadas em quatro categorias correspondentes a sua origem: úlceras venosas, por pressão, neuropáticas e por insuficiência arterial, por função imunológica, pelo uso de medicamentos ou por lesão tecidual anterior (MOJSOSKA, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2013). Fatores externos, como pressão sustentada, temperatura e umidade, também podem interferir na cicatrização de uma ferida (HAN; CEILLEY, 2017). Úlceras decorrentes da hanseníase são geralmente causadas pelo dano neural causado pelo próprio patógeno causador da doença adicionalmente devido à pressão excessiva no local (SERRANO-COLL; CARDONA-CASTRO, 2022).

Portanto, em úlceras crônicas observa-se fenômenos que prejudicam diretamente a resolução das fases da cicatrização onde há uma persistência da

fase inflamatória e falha na transição para a fase proliferativa. Vários fatores são apontados como responsáveis pela inflamação sustentada como oxigenação reduzida, excesso de leucócitos, senescência de fibroblastos, função prejudicada e desequilíbrio nos níveis de citocinas críticas, fatores de crescimento e seus receptores, atividade anormal de MMP, colonização bacteriana e infecção (MORTON; PHILLIPS, 2019).

Outro fator que contribui para a cronicidade da úlcera é a extensa e persistente infiltração de neutrófilos. A resolução comprometida de PMN no local da lesão é acompanhada por níveis prejudiciais de ROS e proteases que induzem danos às membranas celulares, matriz extracelular (MEC) e mediadores cruciais de reparo tecidual, como TGF- β e PDGF. Da mesma forma, macrófagos em feridas crônicas estão associados a níveis reduzidos de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), aumentando assim a degradação da MEC e retardando a cicatrização (SOLIMAN; BARREDA, 2023).

A atividade e a expressão de várias MMPs são substancialmente reguladas positivamente em feridas crônicas. As MMPs degradam proteínas e matriz extracelular e não são favoráveis por períodos prolongados, pois não suportam o crescimento tecidual na fase proliferativa da cicatrização de feridas. Os macrófagos produzem MMPs, então eles podem ser responsáveis por manter níveis elevados em feridas crônicas. Especificamente, os monócitos do sangue humano são estimulados a produzir MMP-2 e MMP-9 na presença de sinais pró-inflamatórios, como LPS, IFN- γ , IL-1 β e TNF- α . Além disso, as proteases degradam e diminuem a bioatividade dos fatores de crescimento que podem estar presentes, cancelando assim seus benefícios pró-cicatrizantes à medida que a inflamação prevalece. (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018)

Os macrófagos em feridas crônicas têm uma capacidade reduzida de fagocitar neutrófilos mortos, que, como resultado, se acumulam e promovem um forte ambiente inflamatório. Pacientes diabéticos, por exemplo, têm macrófagos com atividade de depuração apoptótica reduzida devido aos efeitos da hiperglicemia e produtos finais de glicação avançada. O ato de eliminação de neutrófilos por macrófagos pode induzir a mudança fenotípica de macrófagos M1 para M2 e levar à resolução da inflamação. Esta é uma das muitas razões pelas quais as feridas crônicas podem ter uma abundância de macrófagos M1 (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

Além disso, números significativamente maiores de macrófagos são encontrados nas periferias de úlceras venosas e diabéticas em comparação com feridas agudas. Em feridas agudas, o número de macrófagos é maior no primeiro momento e diminui à medida que a cicatrização progride. Em contraste, úlceras venosas e diabéticas apresentaram maior número de macrófagos em comparação com feridas agudas (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018).

Assim, por exemplo, as úlceras diabéticas estão associadas a um perfil altamente pró-inflamatório causado pela expressão excessiva de citocinas inflamatórias, como TNF- α , e produção reduzida de mediadores pró-cicatrizantes, incluindo IL-10 e TGF- β . Isso leva à polarização dos macrófagos em direção ao fenótipo M1, ativação e degranulação das células T CD8 + , resultando em necrose tecidual (RAZIYEVA *et al.*, 2021).

Por outro lado, os queratinócitos apresentam capacidade de migração e proliferação prejudicada em lesões crônicas. Da mesma forma, os fibroblastos sofrem a perda de seus potenciais proliferativos devido a serem menos responsivos aos fatores de crescimento (SOLIMAN; BARREDA, 2023)

Portanto, estas células contribuem significativamente para a formação de feridas crônicas, porém o mecanismo preciso não é totalmente compreendido. Sabe-se que a regulação prejudicada de certos miRNAs, como miR-34a/c, miR-203, miR-19a/b e miR-20a, em queratinócitos afeta as funções imunes e leva a um atraso no reparo de feridas cutâneas. Assim, a inibição da expressão de miR-19a/b e miR-20a atrasou a cicatrização de feridas e induziu uma resposta inflamatória mais forte em camundongos através da regulação positiva da via NF- κ B, resultando em superexpressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas em queratinócitos. O processo de formação de feridas crônicas também é regulado epigeneticamente por miRNAs que controlam as respostas inflamatórias por meio da modulação de vias de sinalização. As vias Wnt/ β -catenina, NF- κ B, PI3K/Akt/mTOR, TGF- β /Smad e VEGF são reguladas por miRNAs durante a cicatrização de feridas crônicas (RAZIYEVA *et al.*, 2021)

Em cultura *in vitro*, fibroblastos de feridas agudas são mitoticamente competente com alta atividade mitogênica, mas fibroblastos de feridas crônicas são senescentes com baixa capacidade mitogênica. Fluido de feridas de feridas agudas, como locais doadores de enxertos de pele de espessura dividida, estimula

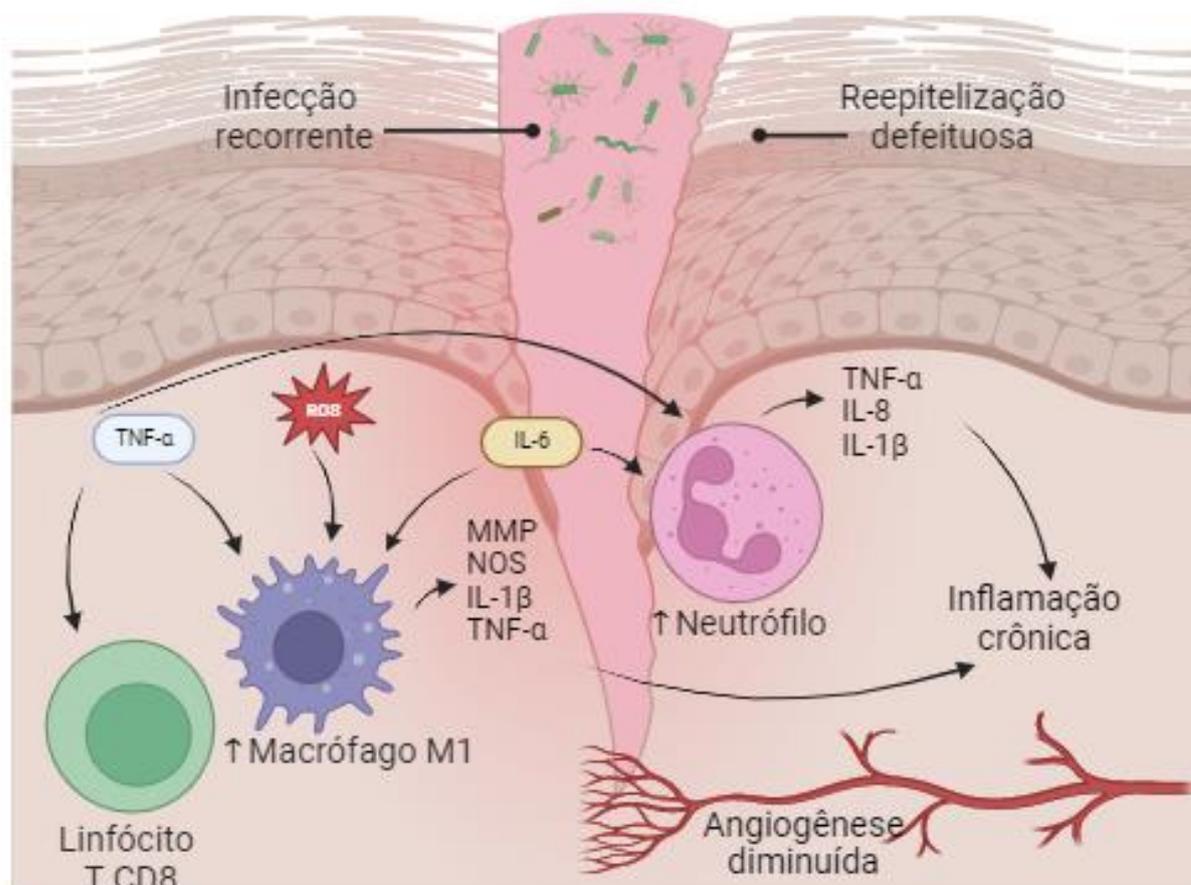
proliferação de fibroblastos em cultura, indicando meio molecular promotor de crescimento. Em contraste, fluido de ferida crônica inibe a proliferação de fibroblastos e queratinócitos. Citocina e fator de crescimento receptores, como o receptor TGF- β tipo II, também podem ser regulados negativamente ou funcionando incorretamente em feridas crônicas.

Com base nas observações mencionadas anteriormente, é geralmente aceito que um ciclo pró-inflamatório deve ser quebrado para que as lesões que não cicatrizam cicatrizem adequadamente (SOLIMAN; BARREDA, 2023).

Além do ciclo pró-inflamatório, os biofilmes bacterianos são um problema significativo em feridas crônicas. Eles são compostos por uma comunidade de bactérias que secreta uma matriz ou glicocálice, que é protetor contra a resposta imune do hospedeiro e difícil erradicação. Bactérias (ambos planctônicos e biofilmes) causam inflamação, que leva à liberação de proteases e reativos espécies de oxigênio das células inflamatórias. Bactérias também secretam exotoxinas e proteases que degradam proteínas que são essenciais para a cicatrização. Os biofilmes foram identificados em 60% dos espécimes de biópsia obtidos de feridas crônicas, mas apenas 6% de biópsia espécimes foram obtidos de feridas agudas (

Figura 2) (MORTON; PHILLIPS, 2019).

Figura 2. Mecanismos envolvidos na cicatrização de úlceras crônicas.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender. Esquema de um modelo de cicatrização de feridas mostrando os mecanismos envolvidos no surgimento da úlcera crônica. Na úlcera crônica não ocorre a transição das fases inflamatória para proliferativa durante o processo de reparo. A desregulação das respostas inflamatórias no caso de, por exemplo, diabetes, hanseníase, envelhecimento e doenças imunossupressoras falha na transição para a fase de proliferação, induzindo assim o atraso na cicatrização de feridas gerando lesões crônicas. Observa-se infecções recorrentes e uma sinalização de moléculas como TNF- α , espécies reativas de oxigênio, que tornam os macrófagos em fenótipo inflamatório (M1) que por sua vez, irá produzir citocinas pro-inflamatórias.

1.3.1 Tratamentos para úlceras crônicas

O avanço no tratamento de feridas tem se tornado cada vez mais importante devido ao surgimento de feridas crônicas e à morbidade associada a elas. O tratamento das úlceras crônicas é baseado em uma abordagem multidisciplinar que inclui desbridamento do tecido necrótico, controle de infecções, redução de áreas de pressão, otimização do fluxo sanguíneo e descompressão nervosa (SERRANO; CASTRO, 2022).

Um conceito importante no tratamento de feridas é o papel do desbridamento ou a remoção de material tecidual não viável. Isso pode ser

alcançado por meio de mecanismos cirúrgicos ou autolíticos/enzimáticos - em ambos os casos, o objetivo é expor tecido saudável e bem perfundido capaz de proliferar e preencher o leito da ferida por meio da migração de células epiteliais, em vez de manter detritos necróticos que servem apenas para como combustível para a infecção e impede a cicatrização de feridas (HAN; CEILLEY, 2017).

Os curativos tradicionais de gaze seca podem prejudicar a tentativa de cicatrização pois não impedem a entrada de microrganismos e não preservam a umidade adequada e, ao mesmo tempo, podem causar mais lesões quando removidos, portanto, por serem feridas complexas, as úlceras crônicas requerem um tratamento específico para cada tipo de ferida (HAN; CEILLEY, 2017).

Com base no tipo de ferida, deve ser usado um tipo de curativo adequado. A seleção do curativo deve ser baseada em sua capacidade de fornecer ou manter um ambiente úmido; aumentar a migração epidérmica; promover a angiogênese e a síntese do tecido conjuntivo; permitir a troca gasosa entre o tecido ferido e o ambiente; manter a temperatura adequada do tecido para melhorar o fluxo sanguíneo para o leito da ferida; fornecer proteção contra infecção bacteriana; deve ser não aderente à ferida e fácil de remover após a cicatrização; deve fornecer ação de desbridamento para aumentar a migração de leucócitos e apoiar o acúmulo de enzima e por fim, devem ser estéreis, atóxicas e antialérgicas (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Muitos curativos para feridas foram desenvolvidos para serem impermeáveis a microrganismos, restringir a penetração de líquidos, permitir a passagem do vapor de água e para ajudar a promover o próprio processo de cicatrização da ferida. A tabela 1 exemplifica os principais curativos disponíveis no mercado e quanto custa em média. O valor desses curativos torna o tratamento oneroso tendo em vista a necessidade de troca e a duração do tratamento que geralmente é longo.

Diante das necessidades dos diferentes tipos de úlceras, curativos com diferentes propriedades foram desenvolvidos. Um curativo oclusivo úmido confere um suporte para a fase inflamatória, criando um ambiente com baixa tensão de oxigênio também aumenta a taxa de reepitelização. Além disso, uma quantidade limitada de exsudato retida na ferida permite o desbridamento autolítico, que serve para promover ainda mais a cicatrização bem-sucedida da ferida (HAN; CEILLEY, 2017; MAAZ *et al.*, 2021).

Curativos que absorvem o exsudato, podem ser categorizados em três tipos: hidrocolóides, alginatos e espumas. No entanto, filmes e hidrogéis se enquadram na categoria de curativos não absorventes. hidrocolóides e hidrogéis se beneficiam de um material hidrofílico que absorve uma certa quantidade de exsudato, mas mantém um ambiente úmido; os hidrocolóides são, além disso, impermeáveis ao ar e um pouco mais duradouros, mas não devem ser usados em feridas exsudativas devido à sua natureza impermeável. Os hidrogéis também podem ser usados para ajudar a promover a umidade em uma ferida seca. (HAN; CEILLEY, 2017; MAAZ *et al.*, 2021)

Outra opção são os curativos de alginato, fibras não tecidas derivadas de algas marinhas que geralmente são reservadas para feridas altamente exsudativas devido à sua capacidade de absorver grandes quantidades de fluido. Como tal, efeitos adversos podem ser observados em feridas secas tratadas com alginato. Da mesma forma, as espumas têm alguma capacidade de absorção e podem ser usadas em feridas moderadamente exsudativas, especialmente úteis porque minimizam o trauma durante as trocas de curativos (HAN; CEILLEY, 2017).

Curativos medicamentosos disponíveis comercialmente incluem curativos antimicrobianos, curativos impregnados de prata e curativos antissépticos de iodo. Atualmente, existem ainda curativos modernos que estimulam fatores de crescimento e mostraram um aumento no processo de cicatrização de feridas, seja diretamente pelo aumento dos estágios de cicatrização de feridas ou indiretamente pela remoção de tecido necrótico (

Tabela 1) (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Tabela 1. Tipos de curativos disponíveis para o tratamento de úlceras crônicas

Tipo de curativo	Produtos comercialmente disponíveis (Valor, R\$)	Notas
Gaze	Curity (7,40), gaze de vaselina (17,99), Xeroform (122,00)	Baixo custo, adere na ferida e pode causar mais ferimentos ao trocar
Filmes	Bioclusive (270,00), Blisterfilm, Cutifilm (45,05), Opsite (14,90), Tegaderm (15,40)	Oclusivo, retém a umidade, indicado apenas para feridas não exsudativas
Hidrocolóides	Curatec (18,90); Aquacel (60,00), Comfeel (12,80), DuoDERM (24,42), Nu-gel (40,70)	Longos tempos entre as trocas, retenção de fluidos, oclusivo, não é indicado para feridas infectadas
Hidrogéis	Caregel (28,41), Purilon (45,00), SAF-gel (67,36)	Hidrata feridas secas, fácil remoção/troca, pode causar hidratação excessiva
Espumas	Aquacel Foam (43,39) Allevyn (23,00), Permafoam (47,62)	Moderadamente absorvente, isolante
Alginatos	Kaltostat (33,60), Suprasorb A (17,10), Tegagen Fibalcol plus colageno (100,00)	Altamente absorvente, hemostático, auxilia o desbridamento autolítico
Nanofibras	Ainda estão em fase de pesquisa	Formam uma rede semelhante a matriz extracelular
Substitutos de pele de engenharia de tecidos	Alloderm, Apligraf, Biobrane, Bioseed, TransCyte *	Aborda fatores de crescimento deficientes e citocinas, alto custo, risco de infecção, antigenicidade

Fonte: Adaptado de HAN; CEILLEY, 2017; MAAZ *et al.*, 2021.

*não disponíveis para compra no Brasil.

1.4 Materiais poliméricos para curativos de úlceras crônicas

Curativos poliméricos são curativos artificiais usados recentemente para o tratamento de úlceras crônicas. Vários materiais poliméricos são usados para curativos de feridas crônicas e têm inúmeras vantagens, como promoção de fatores de crescimento, retenção de umidade, aumento da neovascularização, proteção

contra agentes microbianos e adesividade tecidual. O papel dos polímeros na hemostasia e como um bom agente de cicatrização de feridas depende principalmente de sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não imunogenicidade e propriedades mecânicas (MAAZ *et al.*, 2021).

Esses curativos, em comparação com os curativos tradicionais, apresentam muitas vantagens, como regular o ambiente úmido, rápida atividade de cicatrização, excelentes propriedades antimicrobianas e contato máximo com a superfície da ferida para reduzir a dor e cicatrização eficiente. Eles são usados na forma de filmes, espumas, Hidrocolóides, hidrogéis, scarffolds, hidrofibras e, recentemente, também como nanofibras eletrofiadas (FAHIMIRAD; AJALLOUEIAN, 2019).

Podem ser classificados como curativos naturais e sintéticos. Curativos poliméricos naturais são compostos de polímeros naturais como CS, alginatos, colágeno, dextrana, amido, ácido hialurônico, gelatina, seda etc. Curativos poliméricos sintéticos incluem, entre outros, PU, PVA, polivinil pirrolidona (PVP), PEG, polimetil metacrilato (PMMA), etc. (SARABAH, 2012; DHIVYA *et al.*, 2015). (MAAZ *et al.*, 2021)

1.4.1 Biomembrana composta de proteínas do látex de *Calotropis procera*

Os fitoterápicos têm contribuído de forma importante para a construção de uma farmacopeia alternativa segura aos produtos farmacêuticos de alto custo, além de serem uma espécie de depósito para a bioprospecção de medicamentos. O látex de plantas laticíferas contém muitos metabólitos com ação farmacológica que atuam como barreiras químicas à herbívoros ou infecção devido à presença de componentes alimentares tóxicos e dissuasivos. Além disso, após a liberação, o látex atua como uma barreira física porque seus compostos coagulam rapidamente, selando feridas contra a entrada de patógenos como bactérias e vírus (RAMOS *et al.*, 2020). A este respeito, metabólitos secundários e proteínas que compõe o látex da planta *Calotropis procera* (**Figura 3**) foram atribuídos a diversas atividades farmacológicas (WADHWANI, 2021).

Figura 3. Imagem da planta *Calotropis procera*



Fonte: elaborado pelo autor

Calotropis procera (família Apocynaceae) é uma planta invasora nativa da Índia e difundida em regiões tropicais, inclusive no nordeste brasileiro. Também é considerada uma planta medicinal valiosa, pois contém muitos fitoquímicos, como glicosídeos, flavonóides, triterpenos, alcalóides, esteróides, saponinas, proteínas e enzimas. Diversas atividades biológicas abrangentes de *C. procera*, foram bem investigadas e relatadas (AMINI *et al.*, 2021). A casca e as folhas desta planta apresentam atividade antidiarreica, atividade antimicrobiana, atividade antifúngica, atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante, atividade antitumoral, atividade antimalárica, atividade anti-helmíntica, atividade hepatoprotetora, atividade antinociceptiva, atividade anti-hiperglicêmica, anticonvulsivante e atividade sedativa (TULAIN MARIA; YASIN; ASIF RAHEEM, 2024).

O látex coletado de *C. procera*, quando processado, é separado a borracha das proteínas solúveis, denominadas de proteínas do látex (CpLP). Sabe-se que este material é rico em proteínas, com uma fração proteica predominantemente composta por proteínas básicas ($PI > 6,0$), com massas variando entre 5-95 kDa, sendo as de 26 kDa, aproximadamente, majoritárias. Apresenta atividade quitinolítica e forte atividade proteolítica conferida pelas proteases cisteínicas (FREITAS *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo a fração proteica denominada CpLP tem sido desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa há mais de 20 anos. Os estudos demonstraram, por exemplo, o envolvimento da fração proteica CpLP no efeito anti-inflamatório em modelo de peritonite induzida por carregenina em ratos e apresenta propriedades imunomoduladoras benéficas na prevenção de infecções bacterianas

sistêmicas causadas pela bactéria intracelular *L. monocytogenes* (RAMOS *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2016). CpLP mostrou-se promissora no tratamento da mucosite oral induzida por stress mecânico bem como protege contra mucosite oral induzida pelo 5-fluorouracil além de causar eliminação de sintomas da mucosite intestinal causados pelo quimioterápico irinotecano (RAMOS *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2012; ALENCAR *et al.*, 2017). A fração rica em proteínas ainda foi dividida em subfrações LPI, LPII e LPIII onde LPII foi capaz de reduzir a mortalidade, diminuir a inflamação intestinal, encerrar a diarreia, bem como suprimir os sintomas da mucosite intestinal induzida por irinotecano em camundongos (RANGEL *et al.*, 2022).

Estudos pré-clínicos foram realizados utilizando as proteínas incorporadas ao polímero PVA formando uma Biomembrana denominada BioMemCpLP, que foi desenvolvida com o objetivo de buscar um tratamento potencialmente cicatrizante. Nesse sentido, a BioMemCpLP acelerou significativamente o processo de cicatrização de feridas excisionais e incisionais em camundongos, através da modulação do processo inflamatório, formando rapidamente um novo tecido por meio do aumento da fibroplasia, deposição de colágeno. A modulação da inflamação foi atestada pelo aumento da produção de marcadores-chave e mediadores da resposta inflamatória, ou seja, mieloperoxidase, NO, TNF- α e IL-1 β . Esses resultados demonstraram que BioMemCpLP acelera significativamente as fases iniciais do processo de cicatrização modulando as respostas inflamatórias e pró-inflamatórias. Este efeito notável melhora as etapas subsequentes da cicatrização de feridas (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016).

Corroborando com os estudos em camundongos, a Biomembrana demonstrou ser biocompatível e eficaz na cicatrização de feridas de ensaios *in vitro*. As proteínas do látex também foram capazes de modular o processo inflamatório por meio da estimulação de macrófagos Raw na síntese de citocinas pró (TNF- α , IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10), bem como na redução de NO e IL-1 β , favorecendo o início da fase proliferativa. Em fibroblastos L929, promove a migração e proliferação através da sinalização pelo aumento de TGF- β e estimula a angiogênese pelo aumento de VEGF (NUNES *et al.*, 2021).

Um estudo piloto realizado com pacientes portadores de úlcera do pé diabético tratados com a BioMemCpLP mostrou excelente potencial farmacológico,

favorecendo a cicatrização (ROCHA, 2021).

Além do potencial farmacológico, testes de citotoxicidade *in vitro* com fibroblastos murinos tratados com LP mostraram manutenção da viabilidade celular (NUNES *et al.*, 2021). CpLP também não conferiu alteração de parâmetros bioquímicos em ensaios de toxicidade oral em camundongos. Adicionalmente, a BioMemCpLP foi avaliada quanto ao potencial alergênico através teste e contato “patch test” em voluntários humanos e apenas 12% destes apresentaram discreta reação alérgica na primeira fase e 5% dos voluntários que concluíram a segunda fase apresentaram reação alérgica leve, sugerindo que CpLP seriam seguras para uso terapêutico (ALMEIDA, 2023).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o segundo país do mundo com maior número de pacientes com hanseníase, atrás apenas da Índia (OMS, 2021). Apesar de haver um tratamento que leva a cura da doença, sabe-se que por conta da predisposição imunológica e do diagnóstico tardio, muitos pacientes são acometidos por graves sequelas que geram incapacidades como a úlcera plantar. (UPPUTURI B, SRIKANTAM A, 2020).

A úlcera plantar é uma ferida crônica de difícil cicatrização que pode perdurar por anos, causando pronunciada redução na qualidade de vida dos pacientes acometidos e geralmente ocasiona um alto custo para o sistema de saúde por necessitar de um tratamento longo e oneroso. A fisiopatologia da úlcera evolui a lesão da inervação da região plantar deixando a região insensível. Além disso, de maneira recorrente os pacientes apresentam mal formações que dificultam a marcha e elevando a pressão em determinados locais do calcanhar, portanto o trauma de repetição também dificulta a cicatrização (Y-SCHWARTZMAN *et al.*, 2019).

Por serem úlceras complexas, muitas vezes a cicatrização não é alcançada após o tratamento padrão disponível no SUS, por exemplo, a sulfadiazina de prata, levando inclusive a amputações e necessidade de internação hospitalar. Para tratar estas úlceras, atualmente existem diversos curativos modernos e eficazes, porém o custo é alto, sendo inviável a aquisição desses curativos pelo SUS ou pela população de baixa renda que, geralmente, são mantidas por benefícios saúde ou sociais por impossibilidade de exercer suas atividades laborais.

A fração proteica CpLP bem como a biomembrana composta por ela demonstraram excelente potencial cicatrizante em estudos pré-clínicos *in vitro* e em modelo murino, mostrando ser biocompatível, moduladora da inflamação, indutora da neoformação tecidual, promovendo a fibroplasia e colagênese no processo de cicatrização. Além do potencial terapêutico, o uso padronizado da BioMemCpLP é extremamente favorável por ser composta de uma planta abundante na região nordeste, ainda é de elaboração viável e acessível economicamente (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2021).

Diante deste problema de saúde pública, nosso grupo de pesquisa tem buscado alternativas acessíveis e eficazes para o tratamento úlceras crônicas e então viabilizar a distribuição pelo SUS. Portanto, a relevância deste trabalho é justificada pela

necessidade de um tratamento acessível financeiramente para o sistema público de saúde e que acelere o processo cicatricial da úlcera plantar proporcionando melhor conforto aos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia terapêutica de uma biomembrana contendo proteínas isoladas do látex da planta *Calotropis procera* no processo de cicatrização de úlceras crônicas de pacientes com sequelas da hanseníase e investigar os mecanismos envolvidos na ação cicatrizante através de estudos in vitro em queratinócitos humano (HaCat).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudo clínico

- a) Determinar o perfil clínico dos pacientes com sequelas da hanseníase incluídos no estudo;
- b) Avaliar a alergenicidade da biomembrana através do teste de contato (patch test);
- c) Avaliar a atividade cicatrizante com a BioMemCpLP em úlceras plantares de pacientes com sequelas da hanseníase;
- d) Comparar o efeito da BioMemCpLP com Sulfadiazina de prata e com o curativo Hidrocoloide.

3.2.2 Estudo in vitro

- a) Avaliar a citotoxicidade e a capacidade proliferativa de CpLP em queratinócitos humanos (HaCat);
- b) Analisar o efeito migratório de CpLP em queratinócitos humanos;
- c) Investigar a propriedade de adesão de queratinócitos humanos à Biomembrana;
- d) Avaliar a expressão de E-caderina, β -catenina e P63 na proliferação, migração e reepitelização de queratinócitos humanos tratados com CpLP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Processamento do látex e preparo da Biomembrana

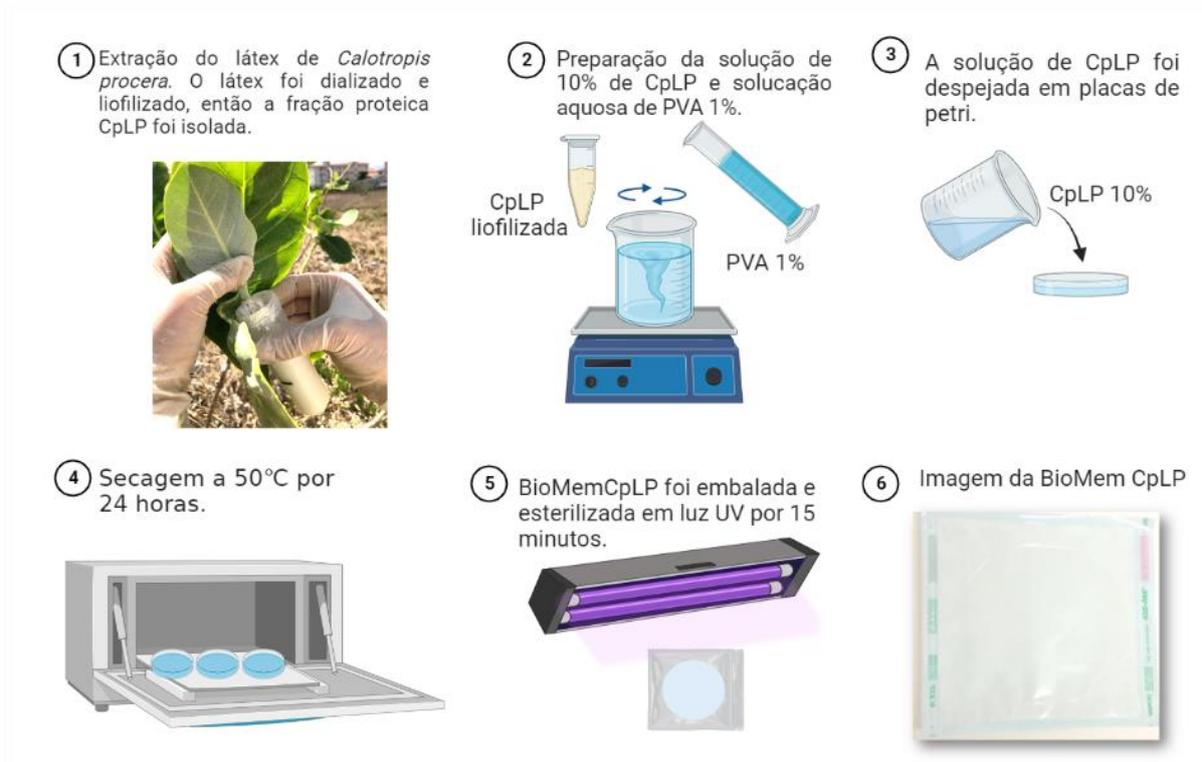
A coleta do látex de *Calotropis procera* foi realizada nas proximidades da praia do Icaraí e do Cumbuco, Caucaia-CE. A espécie, pertencente à família Apocynaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará conforme a exsicata de número 32663.

A coleta foi feita entre 7 e 9 horas através de incisões no ápice caulinar da espécie, o látex foi recolhido em tubos falcon de 50 mL, contendo 20 mL de água destilada, de forma que o látex foi misturado imediatamente com a água na proporção de 1:1 (v/v) (RAMOS *et al.*, 2010).

O isolamento da fração foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Látex Vegetal – Biolatex (UFC) sob coordenação do professor Dr. Marcio Viana Ramos. Para a extração das proteínas, o látex foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min. a 4° C para a remoção da borracha presente no material. O sobrenadante foi submetido à diálise em membranas com poros de 8.000 Da, contra água destilada a 4°C durante três dias (com três trocas de água por dia, totalizando 9 trocas). Após a diálise, foi realizado mais uma centrifugação, nas mesmas condições acima, para a obtenção de um sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha (ALENCAR *et al.*, 2006). Esta fração, denominada Proteínas do Látex (PL) foi submetida ao processo de liofilização. Este material foi armazenado em recipientes hermeticamente fechados a temperatura ambiente para confecção da biomembrana.

As Biomembranas foram preparadas no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica (UFC) sob coordenação da professora Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar a partir da fração proteica isolada. As proteínas foram solubilizadas em solução aquosa de álcool polivinílico (PVA)1% p/v para produzir uma concentração final de 10% de CpLP. Esta mistura foi adicionada em placas de *petri* estéreis 90x15mm. As placas foram colocadas em estufa a 50 °C por 24 horas ou até que toda a água evaporasse, então membranas no fundo da placa foram formadas e denominadas BioMemCpLP. As Biomembranas foram acondicionadas em grau cirúrgico e expostas a luz UV por 15 minutos para esterilização (**Figura 4**).

Figura 4. Esquema de preparo da BioMemCpLP



Fonte: elaborado pelo autor com BioRender.

4.2 Estudo clínico

4.2.1 Desenho do estudo

Este ensaio foi conduzido em conformidade com os requisitos regulatórios aplicáveis da Declaração de Helsinque (KONG *et al.*, 2000) e suas atualizações, pelas diretrizes estabelecidas pelas boas práticas clínicas (Organização Pan-Americana da Saúde, 2005) e pela resolução 466 de 12 de dezembro de 2012. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - CEP/UFC/PROPESQ cujo número do parecer técnico foi 2.072.752.

O ensaio clínico foi delineado com características metodológicas de um estudo prospectivo, randomizado, aberto e controlado. Os participantes do estudo foram recrutados em centros especializados no tratamento da hanseníase (Centro de Dermatologia Dona Libânia, Centro de Convivência Antônio Diogo e Centro de

Convivência Antônio Justa). Inicialmente, os primeiros 10 participantes da pesquisa foram tratados com a BioMemCpLP para uma avaliação inicial do efeito. Posteriormente, os participantes foram designados aleatoriamente em uma proporção 1:1:1 para receber a Biomembrana ou Sulfadiazina de prata ou curativo Hidrocolóide. Ambos tratamentos controle são padronizados para o uso em úlcera plantar. Os possíveis eventos adversos foram investigados a cada troca de curativo.

Foram estabelecidos critérios de inclusão, exclusão e descontinuação do estudo antes de iniciar o protocolo experimental.

Critérios de Inclusão:

- a) Pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados com hanseníase;
- b) Apresentar úlcera perfuro-plantar com ausência de infecção (até 24 cm²);
- c) Capaz de compreender a natureza e objetivo do estudo e agir de acordo com os requerimentos do protocolo (TCLE).

Critérios de exclusão:

- a) Ser portador de câncer, hipertensão não controlada, insuficiência renal ou hepática;
- b) Mulheres em período gestacional;
- c) Presença de história clínica de alergia a componentes presentes nas formulações que serão utilizadas no estudo.

Critérios de descontinuação do estudo:

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

Definiu-se como desfecho primário a taxa de cicatrização das úlceras plantares, medida pela redução da área da úlcera ao longo do tempo. E definiu-se como desfechos

secundários a avaliação das características clínicas da úlcera e o tempo para cicatrização total das úlceras plantares.

4.2.2 Amostra

Após a triagem, 28 pacientes foram incluídos no estudo, porém 5 pacientes foram excluídos ou não puderam continuar, então 23 participantes com o total de 32 úlceras foram avaliadas.

4.2.3 Intervenções

Os participantes do estudo foram alocados, de forma aleatória, em três grupos de tratamento:

Grupo 1: formado por pacientes tratados com a biomembrana composta de proteínas do látex de *Calotropis procera* (BioMemCpLP);

Grupo 2: formado por pacientes tratados com Sulfadiazina de prata, um creme dermatológico com ação antimicrobiana e antifúngica;

Grupo 3: formado por pacientes tratados com curativo Hidrocolóide (Curatec®), uma cobertura estéril composta por uma camada interna autoadesiva de carboximetilcelulose e uma camada externa de filme de poliuretano que promove a absorção de exsudato, permite a troca gasosa e favorece a cicatrização.

Antes de iniciar o tratamento, os pacientes responderam um formulário com dados demográficos e foi coletado informações sobre a úlcera plantar, incluindo duração, localização, diâmetro, área, número de feridas, secreção de exsudado, sinais de infecção, odor, irritação, necrose, presença de deformidades e histórico clínico de doenças associadas e hipersensibilidade.

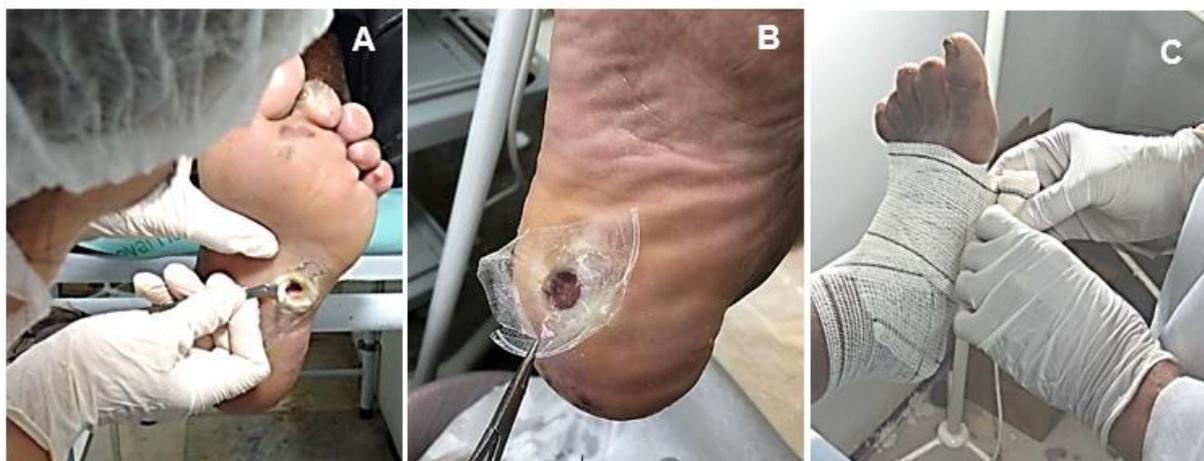
Os participantes do estudo foram avaliados inicialmente quanto ao desenvolvimento de reação alérgica através do *patch test* e, durante o tratamento, foram observados sinais de infecção, dor, piora na extensão da ferida e possíveis queixas do paciente a cada troca de curativo. Todas as informações foram registradas em formulários padronizados para avaliação da conformidade e eventos adversos.

Todos os participantes receberam o procedimento padrão de manejo da ferida realizado por profissionais habilitados nos centros especializados tais como limpeza da úlcera com soro fisiológico, desbridamento quando necessário e adição da cobertura de

acordo com o grupo experimental (**Figura 5**).

A troca do curativo foi realizada três vezes por semana em dias alternados por oito semanas. A cada semana as úlceras foram avaliadas quanto a área, evolução clínica e foi realizado o registro fotográfico.

Figura 5. Troca do curativo



Fonte: Fotografia do procedimento durante a troca do curativo. Em A observa-se o desbridamento cirúrgico para retirada tecido desvitalizado e exposição do tecido saudável. Em B a BioMemCpLP é aplicada e em C uma cobertura padrão com atadura e micropore é colocada para fixar e proteger a úlcera.

4.2.4 Avaliação clínica

Inicialmente, foi realizada uma avaliação demográfica dos pacientes e análise do histórico clínico da úlcera. A eficácia da BioMemCpLP foi avaliada através taxa de cicatrização calculada através do percentual de redução da área da ferida. A área da úlcera foi calculada pelo diâmetro mensurado por paquímetro e a partir desta medida foi possível calcular a taxa de cicatrização, que por sua vez corresponde ao resultado da diferença entre a área inicial e a área final dividido pela área inicial multiplicado por 100.

$$\text{Taxa de cicatrização} = \frac{\text{Área inicial} - \text{Área final}}{\text{Área final}} \times 100$$

O tempo para o fechamento total da úlcera foi outro parâmetro definido para a avaliação da eficácia determinado através da curva de Kaplan. Ademais, foi avaliado a influência das características clínicas na eficácia do tratamento e uma análise multivariada dos fatores determinantes na cicatrização das úlceras foi realizada.

Foi realizada uma análise semiquantitativa das imagens fotográficas, adotando-se critérios de cruzes, ou seja, pontuando subjetivamente os parâmetros fibrina/necrose, tecido de granulação e tecido de reepitelização individualmente em relação à fração correspondente dos mesmos no tamanho total da úlcera, sendo (+) quando a fração correspondente do parâmetro avaliado ocupasse até 1/3 da área superficial da úlcera, (++) quando ocupasse até 2/3 e (+++) quando ocupasse mais de 2/3 da área ulcerada.

4.3 Protocolos experimentais *in vitro* com queratinócitos humanos (HaCat)

4.3.1 Cultivo celular

Foi utilizada a linhagem celular de queratinócitos humanos, HaCat, gentilmente cedida pela Dra. Raquel Carvalho Montenegro, do Laboratório de Farmacogenética do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM). As células foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM: Gibco, Gaithersburg, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina-estreptomicina sob atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37 °C. As culturas de células foram divididas regularmente para mantê-las na fase de crescimento exponencial. As células foram semeadas na densidade de 2x10⁴ células/mL em placas de 96 poços para ensaios de citotoxicidade, proliferação e quantificação de mediadores inflamatórios. Uma densidade de 5x10⁴ células/mL foi usada em placas de 24 poços para testes de migração e adesão.

4.3.2 Testes de toxicidade e proliferação celular

O ensaio da sulforrodamina B (SRB) foi realizado para avaliar a toxicidade celular de acordo com SKEHAN *et al.*, 1990 e é adequado para estimar a proliferação celular. As células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em DMEM com 10% de SFB. Após 24 h, o tratamento com 20 µL de água estéril (veículo) foi realizado no grupo controle, CpLP (0,78 - 12,5 µg/mL) nos grupos teste e um grupo permaneceu sem tratamento. Terminado o tempo de incubação, o sobrenadante das células foi

removido e após 3 lavagens com água, as células foram fixadas com TCA (100 µL) por pelo menos 1 hora a 4 °C e depois com 100 µL de SRB (4%) por 30 minutos a 37°C. O corante Sulforodamine B (SRB) possui dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar a porções terminais de aminoácidos de células que foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA). Após 30 minutos de incubação em SRB, as células foram lavadas três vezes em ácido acético (1%) para remover o excesso de corante não ligado aos aminoácidos celulares e, em seguida, a porção ligada foi solubilizada em 200 µL de tampão Tris-base (10 milímetros). A intensidade da cor rosa foi medida em um leitor de placas (Fisher Scientific, modelo Multiskan FC) a 570 nm. A intensidade do corante se correlaciona com o número de células. A taxa de viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de incubação com CpLP de acordo com a taxa de viabilidade celular calculada pela fórmula abaixo:

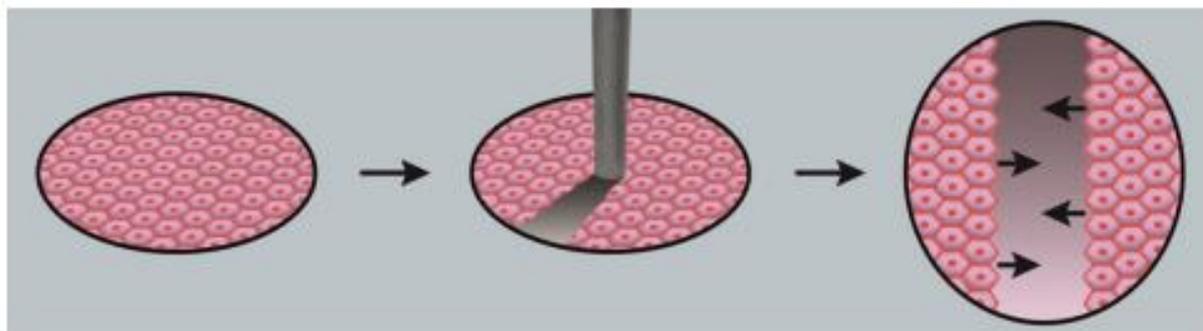
$$\text{Taxa de viabilidade celular} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Média da absobância do grupo não tratado}} \times 100$$

4.3.3 Teste de migração celular

O efeito de CpLP na migração de queratinócitos HaCat foi avaliado usando o ensaio Scratch (MORGNER *et al.*, 2022). As células foram semeadas em placas de 24 poços para garantir uma confluência de 100% e as monocamadas foram raspadas com pontas de pipetas estéreis (300 µL) (**Figura 6**). Posteriormente, os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) para remover células em suspensão e, em seguida, 900 µL de DMEM, 10% FBS e 100 µL de água (grupo controle) ou CpLP (0,78, 1,56 e 3,12 µg/mL) foi adicionado neles. Um grupo recebe um pré-tratamento com 100 µL de mitomicina (10 µg/mL) como um inibidor da proliferação, adicionado 1 hora antes da raspagem para apoiar exclusivamente a migração celular. A migração celular foi medida por meio de registro fotográfico às 6, 12, 18 e 24 horas após o início do tratamento com CpLP, medindo a área das células por meio do software TScratch. Os resultados foram expressos na taxa de migração e calculados como:

$$\text{Taxa de migração celular} = \frac{\text{Área antes do tratamento} - \text{Área depois do tratamento}}{\text{Área antes do tratamento}} \times 100$$

Figura 6. Esquema ilustrativo do ensaio de cicatrização *in vitro*



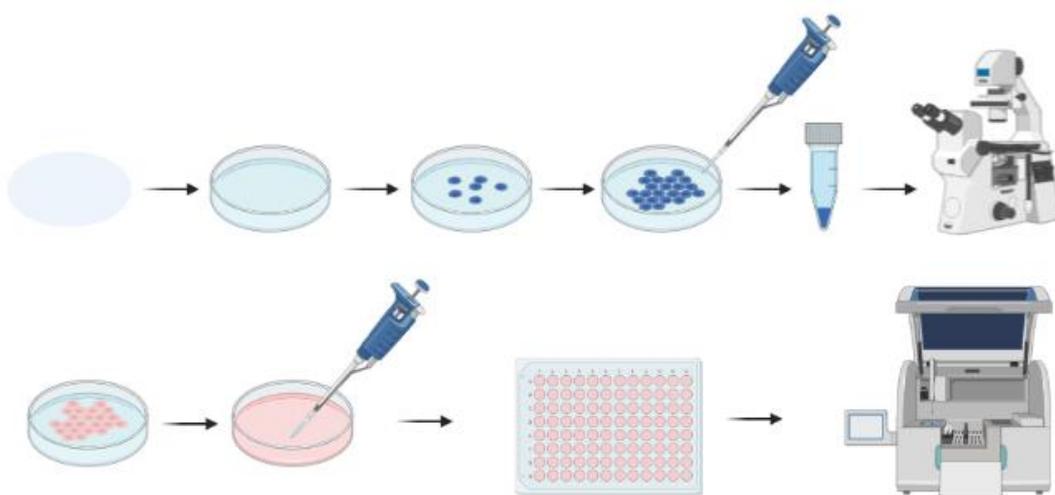
Fonte: SOUZA, 2019.

4.3.4 Teste de adesão celular

As Biomembranas foram preparadas em placas de 24 poços em 3 grupos: BioMemCpLP 0,1%, BioMemCpLP 0,2% e Controle (apenas PVA como veículo) (FIGUEIREDO *et al.*, 2014). A linhagem celular foi semeada em placas com a Biomembrana aderida ao fundo de cada poço. Após 4 e 24 h, uma alíquota do meio de cultura foi aspirada (90 μ L) e as células não aderidas foram contadas em câmara de Neubauer. Ao final do teste, os poços foram lavados duas vezes com PBS, fixados com 250 μ L de acetona:metanol (1:1) a 4 °C por 1 hora e corados com solução de cristal violeta (0,5%) em metanol (20 %) por 30 min. Em seguida, após lavagem dos poços com água, o cristal violeta foi solubilizado em 250 μ L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,5% e a absorbância foi medida a 570 nm usando um espectrofotômetro Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific™). Culturas com diferentes números de células conhecidas foram usadas para obter uma curva de calibração em linha reta e mensurar o número de células correspondente aos dados de absorbância em cada experimento (

Figura 7) (KHABBAZ; SOLOUK; MIRZADEH, 2019; SERRANO *et al.*, 2004)

Figura 7. Esquema ensaio de adesão



Fonte: Elaborado pelo autor com Biorender. Ilustração do procedimento experimental do ensaio de adesão. A Biomembrana, devidamente esterilizada, foi colocada no fundo da placa e uma alíquota de sobrenadante foi retirada após 4 e 24 horas e a quantidade de células foi mensurada por contagem em câmara de Neubauer. Após 24 horas, as células aderidas foram coradas, o corante solubilizado em PBS e a intensidade da coloração foi mensurada em espectrofotômetro.

4.3.5 Expressão de *E-caderina* , *β-Catenina* e *p63* em queratinócitos humanos

O reagente Trizol foi empregado para extrair o RNA total de queratinócitos HaCat e a análise quantitativa do RNA extraído foi feita por espectrofotometria usando o espectrofotômetro Epoch™ Microplate (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 260 nm. A transcrição reversa para síntese de cDNA foi realizada com o kit MMLV (Promega, Madison, EUA). A PCR foi realizada com um volume de reação final de 10 µL contendo 5 µL de TaqMan Gene Expression Assay (ThermoFisher Scientific), 3,5 µL de água livre de nuclease, 0,5 µL de primers de miRNA e 1 µL de produto RT. As condições de PCR em

tempo real foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos seguida por 40 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 segundos), anelamento de primer (60 °C por 1 minuto) e extensão de transcrição (50 °C por 2 min). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A expressão de E-caderina, β -catenina e p63 foi quantificada pelo QuantStudio 3.0 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Os dados foram normalizados empregando GAPDH para queratinócitos (AZMI *et al.*, 2019a).

4.4 Análise Estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Bonferroni com o software Graphpad Prism 7 e do Teste T para análise de dois grupos. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O desfecho primário do ensaio clínico foi a redução da taxa de cicatrização após 8 semanas quando comparado com o início do tratamento. Os desfechos secundários incluíram o tempo médio de feridas abertas e a proporção de úlceras completamente curadas.

Os dados clínicos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e comparados com os testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson. As áreas de ferida e os percentuais de cicatrização tecidual foram expressos em forma de média e erro-padrão, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e analisados pelo teste de Friedman/Dunn (dados não paramétricos). Foram criadas curvas de Kaplan-Meier para estimar o tempo médio para cicatrização total das feridas as quais foram analisadas pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox.

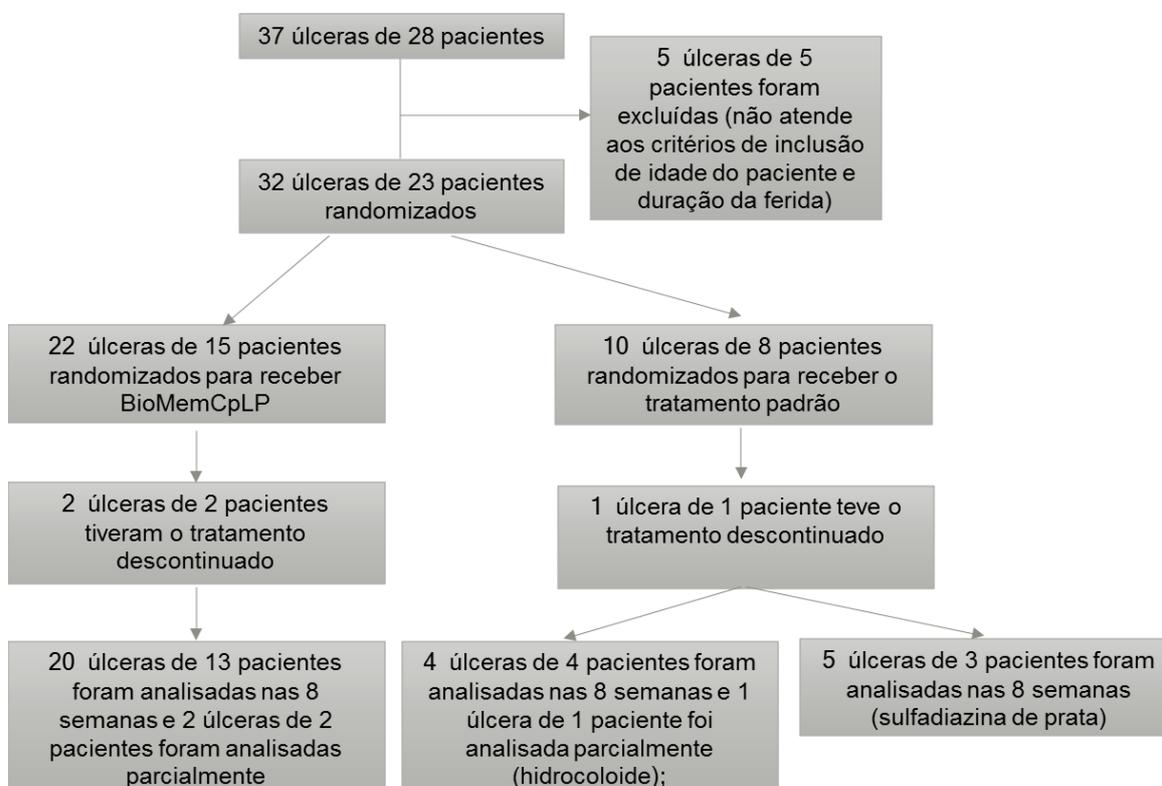
Adicionalmente, modelo de regressão logística multinomial foi utilizado para analisar os fatores independentemente dos demais associados a cicatrização total das feridas. As *odds ratio* ajustadas e seus respectivos intervalos de confiança 95% foram calculados.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo clínico

Após dois anos de estudo, foram selecionados 28 pacientes acometidos com 37 úlceras, ou seja, alguns pacientes tinham mais de uma úlcera e foram avaliadas individualmente. Durante a seleção, 5 pacientes foram excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão e após o início do tratamento 2 pacientes tratados com a Biomembrana foram descontinuados porque não compareceram às trocas de curativo de maneira recorrente. Um paciente que estava sendo tratado com hidrocoloide foi descontinuado devido à úlcera estar infectada, portanto alguns pacientes tiveram avaliação parcial não sendo possível registrar durante as 8 semanas. Os pacientes do grupo controle compreendem 4 úlceras tratadas com hidrocoloide e 5 úlceras tratadas com Sulfadiazina de prata. A figura 8 mostra um fluxograma que resume as principais informações referentes a inclusão, exclusão e avaliação dos pacientes. Nenhum paciente apresentou hipersensibilidade aguda aos componentes da BioMemCpLP durante o “patch test”.

Figura 8. Fluxograma do estudo clínico



Fonte: elaborado pelo autor

As características demográficas bem como a história clínica da úlcera não foram fatores que influenciaram na cicatrização tendo em vista que os grupos foram distribuídos uniformemente, exceto o grupo hidrocoloide em que houve dois pacientes que estavam no período de tratamento antimicrobiano da hanseníase e, portanto, não estavam curados (**Tabela 2**).

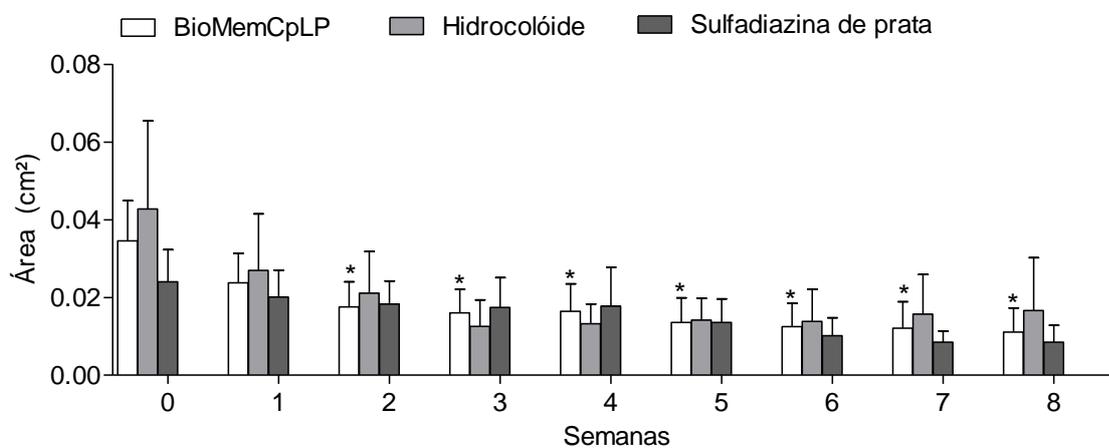
Tabela 2. Caracterização da amostra de pacientes com úlceras plantares tratados com Biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.

	Total	Grupo			p-Valor
		Biomembrana	Hidrocolóide	Sulfadiazina de prata	
Sexo					
Feminino	6 (18,8%)	4 (18,2%)	2 (40,0%)	0 (0,0%)	0,267
Masculino	26 (81,3%)	18 (81,8%)	3 (60,0%)	5 (100,0%)	
Idade					
Até 60	19 (59,4%)	13 (59,1%)	2 (40,0%)	4 (80,0%)	0,436
>60	13 (40,6%)	9 (40,9%)	3 (60,0%)	1 (20,0%)	
Curado da hanseníase					
Não	3 (9,4%)	1 (4,5%)	2 (40,0%) *	0 (0,0%)	0,036
Sim	29 (90,6%)	21 (95,5%) *	3 (60,0%)	5 (100,0%) *	
Tempo de úlcera					
Até 2 anos	17 (53,1%)	13 (59,1%)	2 (40,0%)	2 (40,0%)	0,605
>2 anos	15 (46,9%)	9 (40,9%)	3 (60,0%)	3 (60,0%)	
Local					
Antepé	17 (53,1%)	13 (59,1%)	2 (40,0%)	2 (40,0%)	0,601
Sola	10 (31,3%)	6 (27,3%)	1 (20,0%)	3 (60,0%)	
Dorso	2 (6,3%)	1 (4,5%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	
Calcanhar	2 (6,3%)	1 (4,5%)	1 (20,0%)	0 (0,0%)	
Maléolo	1 (3,1%)	1 (4,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Deformidade					
Não	10 (31,3%)	5 (22,7%)	2 (40,0%)	3 (60,0%)	0,241
Sim	22 (68,8%)	17 (77,3%)	3 (60,0%)	2 (40,0%)	

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

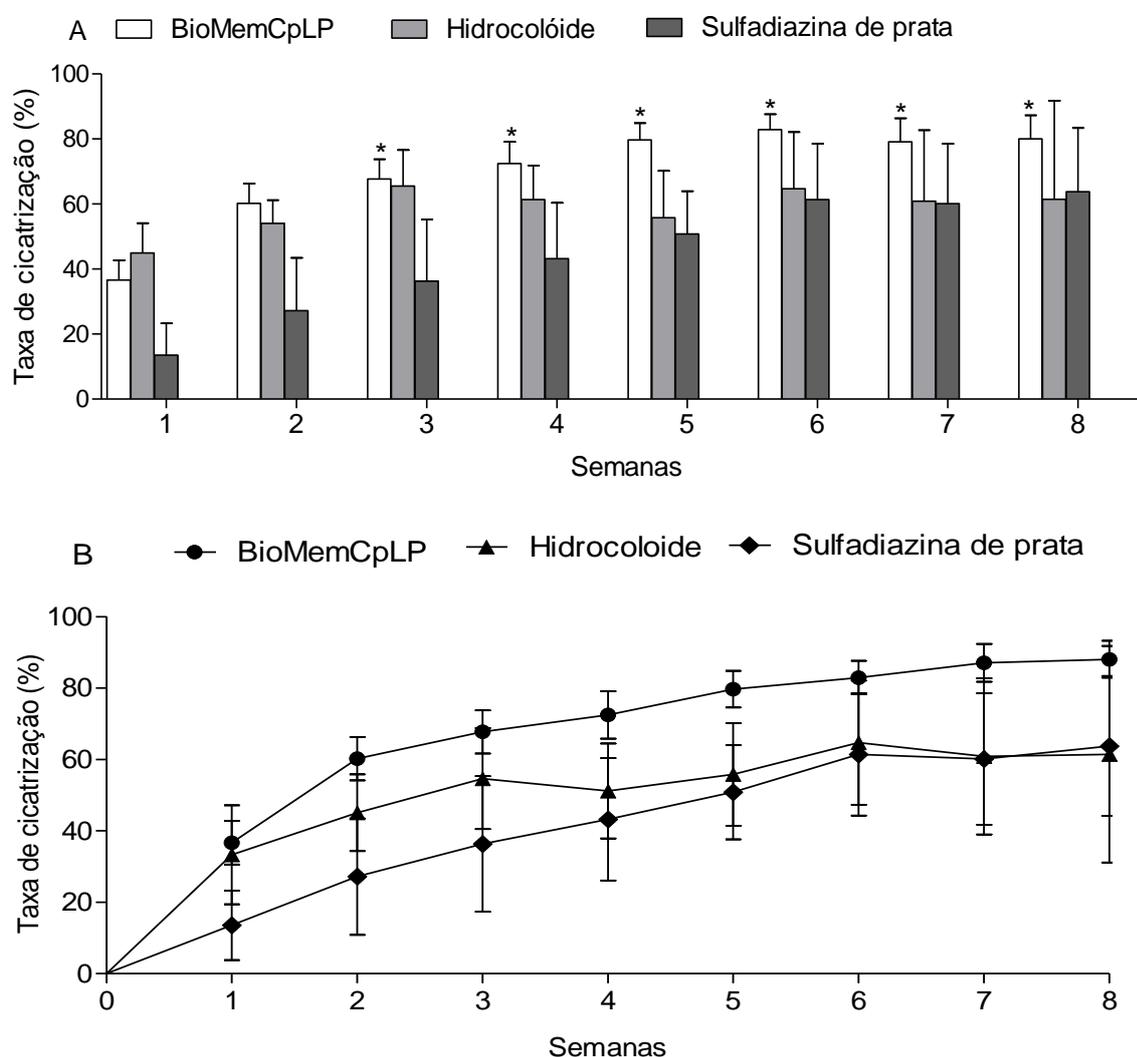
O tratamento com a Biomembrana foi capaz de reduzir significativamente a área das úlceras a partir da segunda semana e até o final das 8 semanas (**Figura 9**). Conseqüentemente, a taxa de cicatrização do grupo BioMemCpLP foi maior que nos grupos controles (**Figura 10.A e 10.B**).

Figura 9. Evolução clínica das úlceras plantares após tratamento com biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.



O grupo tratado com Biomembrana apresentou redução significativa da área média da úlcera a partir da segunda semana ($p < 0,001$) e os grupos tratados com hidrocoloide ($p = 0,072$) e sulfadiazina de prata ($p = 0,077$) não apresentaram variação significativa neste parâmetro. * $p < 0,05$ versus semana 0, teste de Friedman/Dunn.

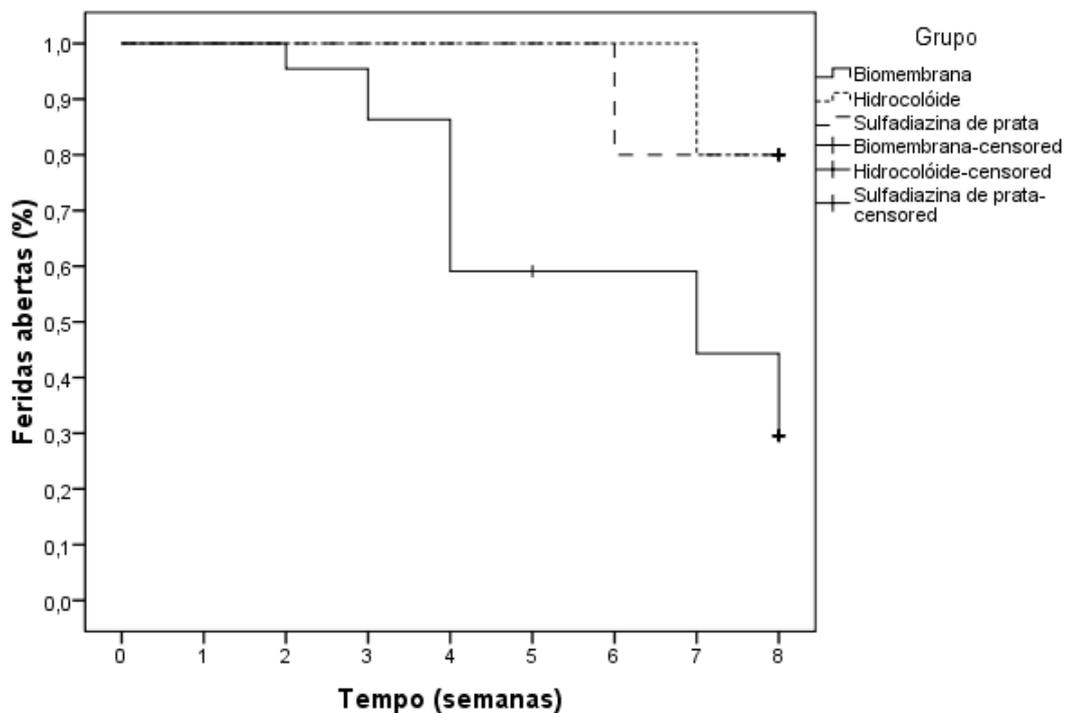
Figura 10. Taxa média de cicatrização das úlceras plantares após tratamento com Biomembrana, hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.



Representação em barras e em linhas da taxa de cicatrização versus o tempo em semanas. * $p < 0,05$ versus semana 1, teste de Friedman/Dunn. O grupo tratado com Biomembrana apresentou redução significativa da área média da úlcera a partir da terceira semana ($p < 0,001$) e os grupos tratados com hidrocoloide ($p = 0,309$) e Sulfadiazina de prata ($p = 0,127$) não apresentaram variação significativa neste parâmetro.

As úlceras tratadas com a BioMemCpLP (6,0 dias \pm 0,4 dias) curaram totalmente em menor tempo que o grupo hidrocoloide (7,8 dias \pm 0,2) e Sulfadiazina de prata (7,6 dias \pm 0,2) (**Figura 11**). Inclusive, ao final de oito semanas de avaliação, o grupo Biomembrana teve maior incidência de feridas fechadas (88,2%) quando comparado aos demais (5,9%) ($p = 0,041$) e a cura completa da úlcera não foi influenciada pelas características clínicas dos pacientes, ressaltando o potencial cicatrizante da Biomembrana (**Tabela 3**).

Figura 11. Curvas de Kaplan-Meier com evolução clínica das úlceras plantares após tratamento com Biomembrana, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata.



O percentual de feridas abertas nos grupos tratados com Biomembrana foi menor que o grupo tratado com Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata após 4 e 8 semanas.

Tabela 3. Influência das características clínicas e tratamento com Biomembrana, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata em pacientes com úlcera plantar.

	Cicatrização completa da ferida		p-Valor
	Não	Sim	
Grupo			
Biomembrana	7 (46,7%)	15 (88,2%) *	0,041
Hidrocolóide	4 (26,7%) *	1 (5,9%)	
Sulfadiazina de prata	4 (26,7%) *	1 (5,9%)	
Sexo			
Feminino	2 (13,3%)	4 (23,5%)	0,659
Masculino	13 (86,7%)	13 (76,5%)	
Idade			
Até 60	7 (46,7%)	12 (70,6%)	0,280
>60	8 (53,3%)	5 (29,4%)	
Curado da hanseníase			
Não	1 (6,7%)	2 (11,8%)	1,000
Sim	14 (93,3%)	15 (88,2%)	
Tempo			
Até 2 anos	5 (33,3%)	12 (70,6%)	0,074
>2 anos	10 (66,7%)	5 (29,4%)	
Local			
Antepé	6 (40,0%)	11 (64,7%)	0,201
Sola	7 (46,7%)	3 (17,6%)	
Dorso	1 (6,7%)	1 (5,9%)	
Calcanhar	0 (0,0%)	2 (11,8%)	
Maléolo	1 (6,7%)	0 (0,0%)	
Deformidade			
Não	4 (26,7%)	6 (35,3%)	0,712
Sim	11 (73,3%)	11 (64,7%)	

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

A análise multivariada relacionada aos fatores que influenciam diretamente na cicatrização das úlceras demonstrou, surpreendentemente, que pacientes tratados com Biomembrana apresentam 67,52 vezes mais probabilidade de ter cicatrização completa independente das demais variáveis clínicas. Também foi possível determinar que úlceras mais jovens, até de 2 anos, tem 31,52 vezes mais probabilidade de ter cicatrização completa independente das demais variáveis clínicas, ou seja, úlcera mais antigas tornam-se mais complexas e mais difíceis de alcançar a cura (**Tabela 4**).

Tabela 4. Análise multivariada dos fatores determinantes na cicatrização de úlceras plantares em pacientes tratados com Biomembrana, Hidrocoloide e Sulfadiazina de prata.

Cicatrização completa da ferida	p-Valor	OR ajustada (IC95%)
Grupo		
Biomembrana	*0,015	67,52 (2,28-2000,07)
Hidrocoloide/Sulfadiazina de prata		1
Sexo		
Feminino	0,073	24,57 (0,75-809,02)
Masculino		1
Idade		
Até 60	0,067	22,88 (0,80-655,02)
>60		1
Curado da hanseníase		
Não	0,332	9,48 (0,10-894,56)
Sim		1
Tempo		
Até 2 anos	*0,028	31,51 (1,46-681,36)
>2 anos		1
Local		
Antepé	0,169	10,19 (0,37-279,56)
Demais sítios		1
Deformidade		
Não	0,639	2,65 (0,05-155,77)
Sim		1

*p<0,05, regressão logística multinomial; OR: *odds ratio*.

As úlceras foram separadas em três grupos de acordo com a extensão no primeiro dia de tratamento para ilustrar o efeito cicatrizante da Biomembrana (**Figura 12, 13 e 14**). Até 10 mm² as úlceras foram classificadas como pequena extensão, acima de 10 e menor que 40 mm² foram consideradas úlceras de média extensão e acima de 40 mm², maior extensão. Cada úlcera avaliada foi enumerada conforme o paciente iniciava o tratamento.

A úlcera 4, apesar do local sob contínua pressão e sem o uso de calçado adequado, em menos de 4 semanas, recuperou o tecido epitelial após o tratamento com a Biomembrana. A úlcera 25, apesar de não infectada, foi aumentando sua extensão após 4 e 8 semanas (área inicial de 7,85 mm² e área após 8 semanas de 23,55 mm²), portanto o tratamento com a Sulfadiazina de prata não foi capaz de estimular a reepitelização do tecido. A úlcera 29 apresentava hiperqueratose, o que impedia a formação do novo tecido além do risco de infecção e aumento da extensão. O desbridamento das bordas associado ao tratamento com o hidrocoloide ocasionou a reepitelização dessa úlcera.

Figura 12. Úlceras de pequena extensão



Imagens fotográficas da evolução das úlceras dos pacientes. As úlceras tratadas com a Biomembrana e Hidrocolóide tiveram melhora considerável com reepitelização total, enquanto o paciente tratado com Sulfadiazina de prata apresentou aumento pronunciado do tamanho da úlcera. O número no canto inferior corresponde a identificação da úlcera no estudo.

A úlcera 20, apesar de profunda e de extensão considerável, após o tratamento com a Biomembrana apresentou cicatrização completa do tecido lesionado em menos de 8 semanas. A úlcera 24 reduziu de tamanho em 36% e a úlcera 32 reduziu em 73,21%, cujo tratamento foi realizado com Sulfadiazina de prata e hidrocolóide respectivamente.

Figura 13. Úlceras de média extensão



Imagens fotográficas da evolução das úlceras dos pacientes. A úlcera tratada com a Biomembrana apresentou reepitelização total enquanto as úlceras tratadas com Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata mostraram redução na área sem alcançar cicatrização completa. O número no canto inferior corresponde a identificação da úlcera no estudo.

O tratamento com a BioMemCpLP gerou intensa regeneração tecidual na úlcera 8, apesar de sua complexidade e extensão. Foi observado redução da área em 86,6% (área inicial de 43,9 mm² e área após 8 semanas de 5,88 mm²). Provavelmente, a continuidade do tratamento causaria a reepitelização completa. A úlcera 27, tratada com Sulfadiazina de prata, reduziu sua extensão em 89,28% (área inicial de 54,9 mm² e área após 8 semanas de 3,9 mm²). Por outro lado, foi observado um aumento de 24,45% (área inicial de 44,5 mm² e área após 8 semanas 70,6 mm²) na extensão da úlcera 30, com surgimento de tecido desvitalizado com provável infecção bacteriana. A este fato foi atribuído às condições sanitárias em que o paciente se encontrava. Este paciente foi retirado do estudo para receber o tratamento adequado.

Figura 14. Úlceras de maior extensão



Imagens fotográficas da evolução das úlceras dos pacientes. As úlceras tratadas com a Biomembrana e Sulfadiazina de prata tiveram melhora considerável chegando próximo da reepitelização completa, enquanto o paciente tratado com hidrocolóide apresentou aumento da área da úlcera com o surgimento de tecido necrótico, não necessariamente relacionada ao tratamento. O número no canto inferior corresponde a identificação da úlcera no estudo.

As úlceras foram classificadas por escores indicando o percentual de tecido necrótico, tecido de granulação e reepitelização (**Tabelas 5, 6 e 7**). Para cada parâmetro, foram considerados, individualmente, os resultados como progressivos aqueles que apresentaram um aumento no número de cruces, no período de 8 semanas de tratamento; como regressivos, aqueles que apresentaram uma diminuição no número de cruces no decorrer 8 semanas de tratamento e indiferentes, àqueles que não apresentaram variação no número de cruces no mesmo período. A maioria das úlceras

evoluíram com redução do tecido necrótico e desvitalizado bem como redução do tecido de granulação e conseqüentemente aumento do tecido neoformado caracterizando a estimulação da reepitelização em todos os grupos (**Tabela 8**).

Tabela 5 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo BioMemCpLP (n=22 úlceras)

Paciente	Tempo (semanas)	Necrose / Fibrina	Granulação	Reepitelização
DBB 1	0	-	+++	-
	4	-	++	+
	8	-	+	++
DBB 2	0	-	++	+
	4	-	+	++
	8	-	+	++
MGGS	4	-	+	++
	8	-	-	+++
RPS	0	-	+++	-
	4	-	-	+++
	8	-	-	+++
VAD 1	0	+	++	-
	4	-	++	+
	8	-	+	++
VAD 2	0	-	+++	-
	4	+	+	+
	8	-	-	+++
JDL	0	-	++	+
	4	-	++	+
	8	-	+	++
EGS	0	+	++	-
	4	-	+++	-
	8	-	+	++
CRMP 1	0	-	+++	-
	4	-	-	+++
	8	-	-	-
CRMP 2	0	-	+++	-
	4	-	-	+++
	8	-	-	-
JPS	0	-	+++	-
	4	-	++	+
	8	+	+++	-
SMG	0	-	+++	-
	4	-	++	+
	8	-	-	+++
JCC	0	-	++	+
	4	-	+	++
	8	+	+	+
JDS 1	0	-	++	+
	4	-	-	+++

	8			
JDS 2	0	-	++	+
	4	-	++	+
	8	-	-	+++
JDS 3	0	-	++	+
	4	-	-	+++
	8			
JDS 4	0	-	++	+
	4	-	-	+++
	8			
ESL	0	-	+++	-
	4	-	++	+
	8	-	-	+++
JGL 1	0	-	++	+
	4	-	-	+++
	8	-		
JGL 2	0	-	++	+
	4	-	-	+++
	8	-		
ASR	0	-	++	+
	4	-	-	+++
	8	-		
FFA	0	-	++	+
	4	-	++	+
	8	-	+	++

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica da úlcera antes do tratamento, após 4 e 8 semanas para os parâmetros necrose, granulação e reepitelização. - Ausente; + Até 1/3 da área superficial da úlcera; ++ Até 2/3 da área superficial da úlcera; +++ Mais de 2/3 da área superficial da úlcera.

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

Paciente	Tempo (semanas)	Necrose / Fibrina	Granulação	Reepitelização
JRMS	0	++	+	-
	4	-	++	+
	8	-	-	+++
GMS	0	-	++	+
	4	-	++	+
	8	-	+	++
FS	0	-	-	+++
	4	-	++	+
	8	-	+	++
FFES	0	-	+	++
	4	-	++	+
	8	++	+	-
RVL	0	-	+++	-
	4	-	++	+
	8	-	++	+

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica da úlcera antes do tratamento, após 4 e 8 semanas para os parâmetros necrose, granulação e reepitelização. - Ausente; + Até 1/3 da área superficial da úlcera; ++ Até 2/3 da área superficial da úlcera; +++ Mais de 2/3 da área superficial da úlcera.

Tabela 7 – Avaliação clínica das úlceras dos pacientes do grupo Sulfadiazina de prata (n=5 úlceras)

Paciente	Tempo (semanas)	Necrose / Fibrina	Granulação	Reepitelização
MMN 1	0	+	+	+
	4	-	++	+
	8	-	+++	-
MMN 2	0	++	+	-
	4	++	+	-
	8	-	++	+
MMN 3	0	-	++	+
	4	-	+	++
	8	-	+	++
PCSM	0	-	++	+
	4	-	+	++
	8	-	-	+++
JEF	0	-	++	+
	4	-	+	++
	8	-	-	+++

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica da úlcera antes do tratamento, após 4 e 8 semanas para os parâmetros necrose, granulação e reepitelização. - Ausente; + Até 1/3 da área superficial da úlcera; ++ Até 2/3 da área superficial da úlcera; +++ Mais de 2/3 da área superficial da úlcera.

Tabela 8 – Resultado da análise clínico das úlceras dos pacientes dos grupos BioMemCpLP, Hidrocolóide e Sulfadiazina de prata.

Parâmetro	Evolução	BioMemCpLP (n=22)	Sulfadiazina de rata (n=5)	Hidrocolóide (n=5)
		Número (%)	Número (%)	Número (%)
Necrose / Fibrina	Regressiva	3 (13,6)	3 (13,6)	2 (9,0)
	Progressiva	2 (9,0)	1 (4,4)	-
	Indiferente	-	-	-
Granulação	Regressiva	21 (95,4)	4 (18,2)	3 (13,6)
	Progressiva	1 (4,4)	1 (4,4)	2 (9,0)
	Indiferente	-	-	-
Reepitelização	Regressiva	1 (4,4)	2 (9,0)	1 (4,4)
	Progressiva	21 (95,4)	4 (18,2)	4 (18,2)
	Indiferente	-	-	-

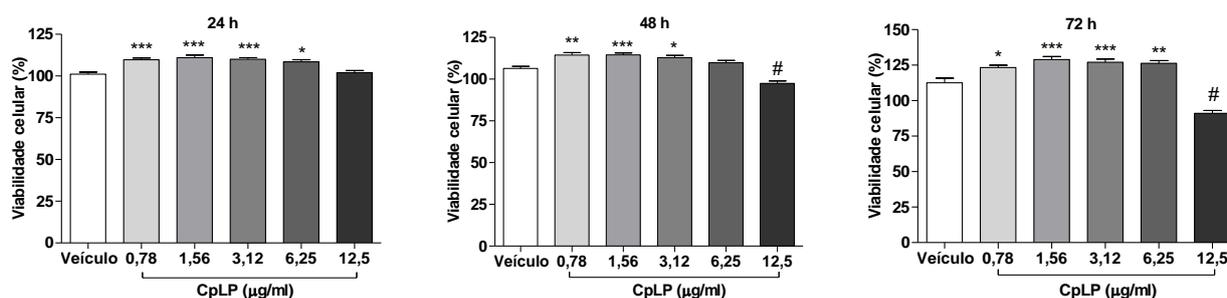
5.2 Estudos *in vitro*

5.2.1 A fração CpLP promove a proliferação de queratinócitos humanos (HaCat)

O ensaio SRB foi realizado para avaliar o efeito tóxico e proliferativo de CpLP em queratinócitos humanos. Essa linhagem celular tem sido amplamente utilizada em estudos de biocompatibilidade *in vitro* baseados em ensaios pré-clínicos e clínicos (SERRANO *et al.*, 2004). De acordo com a ISO 10993-5, o percentual de viabilidade celular acima de 80% é considerado não citotóxico, dentro de 80% a 60% como fracas, 60% a 40% como moderado e abaixo de 40% como fortemente citotóxico. Portanto, a fração isolada (CpLP) de *C. procera* foi considerada atóxica na maioria das doses, preservando a viabilidade da linhagem celular. Apesar da redução da viabilidade após 48 (97,4% ± 5,6; veículo 106,4 ± 4,8) e 72 h (91,0 ± 7,5; veículo 112,6 ± 12,4), não houve toxicidade na dose de 12,5 µg/mL em células HaCat, pois não houve morte celular acima de 80%. O tratamento com as demais doses de CpLP mostrou um efeito proliferativo pronunciado após 24 (111,0% ± 6,9; veículo 101,1 ± 4,3) e 48 h (114,5% ± 5,6; veículo 106,4% ± 4,8), especialmente após 72 h (128,9% ± 12,07; veículo 112,6% ± 12,4) na dose de 1,56 µg/mL (

Figura 15).

Figura 15. Efeito de CpLP na citotoxicidade e proliferação de células HaCat.



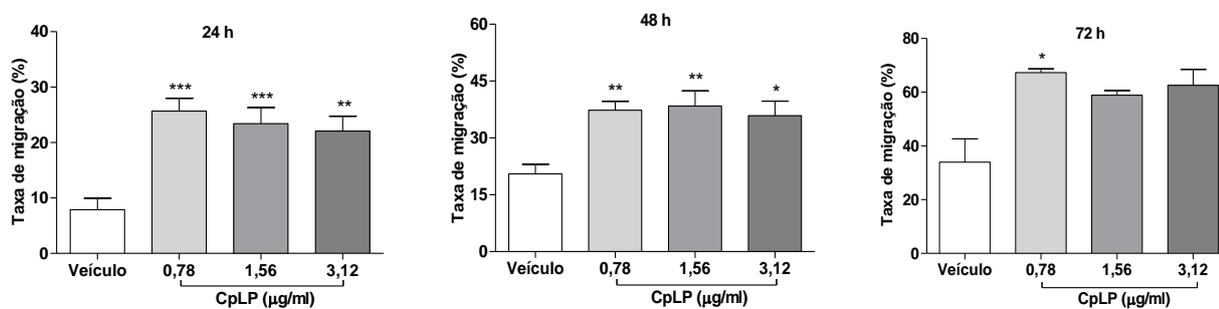
A viabilidade dos queratinócitos foi expressa pela intensidade de SRB ligado após 24, 48 e 72 h de incubação com CpLP (0,78 - 12,5 µg/mL) ou água, que foi o veículo utilizado. As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 células/mL. Os resultados foram expressos como média \pm DP de 3 experimentos independentes. ANOVA one-way seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para análise estatística dos dados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam uma diferença significativa entre os grupos tratados com CpLP e de controle. # $p < 0,001$ representa uma redução significativa na viabilidade em comparação com o grupo controle.

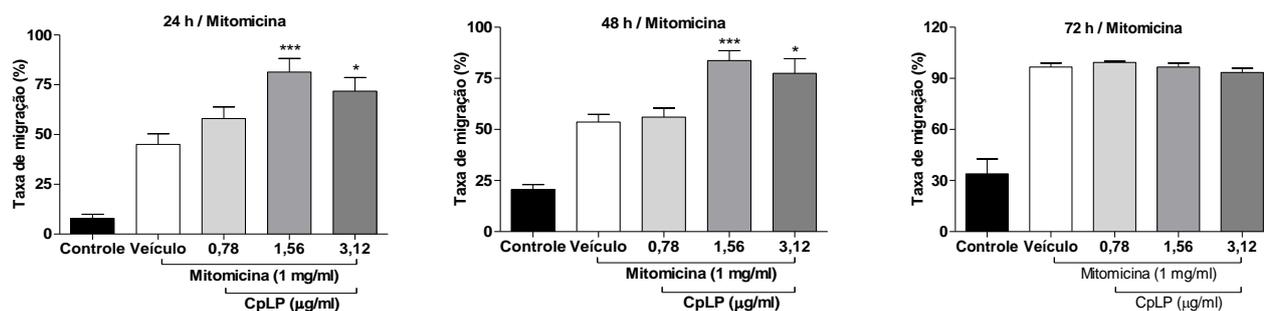
5.2.2 A fração CpLP estimula a migração celular *in vitro*

O teste de migração celular (*Scratch*) mostrou que CpLP estimula a cicatrização de feridas *in vitro*. O tratamento com CpLP estimulou a migração de queratinócitos após 24 (25,7% \pm 6,83), 48 (38,4% \pm 12,7) e 72 h (67,3% \pm 2,4) e na presença de mitomicina, onde a divisão celular é interrompida, houve aumento de a taxa de migração após 24 (81,3% \pm 20,6) e 48 h (83,7% \pm 15,2). A área do arranhão do grupo tratado com CpLP foi menor do que o grupo controle após 24, 48 e 72 h (Erro! Fonte de referência não encontrada.). É possível visualizar a migração das células fechando o espaço aberto do arranhão principalmente após 48 e 72 horas (

Figura 17).

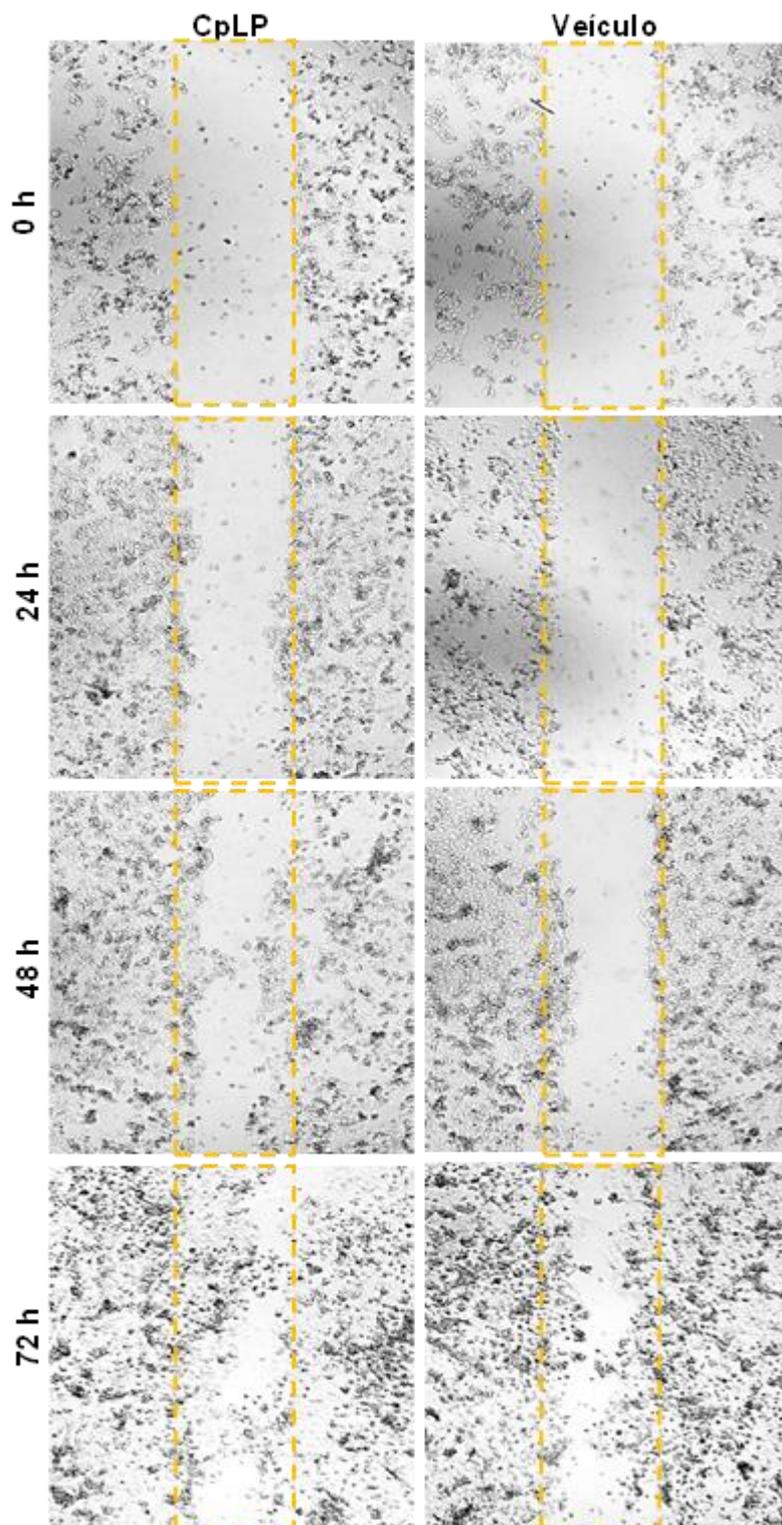
Figura 16. Efeito de CpLP na migração de queratinócitos HaCat.





A taxa de migração celular foi avaliada pelo software T-scratch após 24, 48 e 72 h de incubação com CpLP (0,78 - 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) com ou sem pré-tratamento com mitomicina (inibidor de proliferação, 1 mg/mL). Os queratinócitos foram semeados a uma densidade de 5×10^4 células/mL. Os resultados foram expressos como média \pm DP de 3 experimentos independentes. ANOVA one-way seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para análise estatística dos dados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa entre os grupos tratados com CpLP e veículo.

Figura 17. Fotomicrografia em microscopia óptica de queratinócitos HaCat observados após arranhão da monocamada celular do teste de cicatrização *in vitro*.

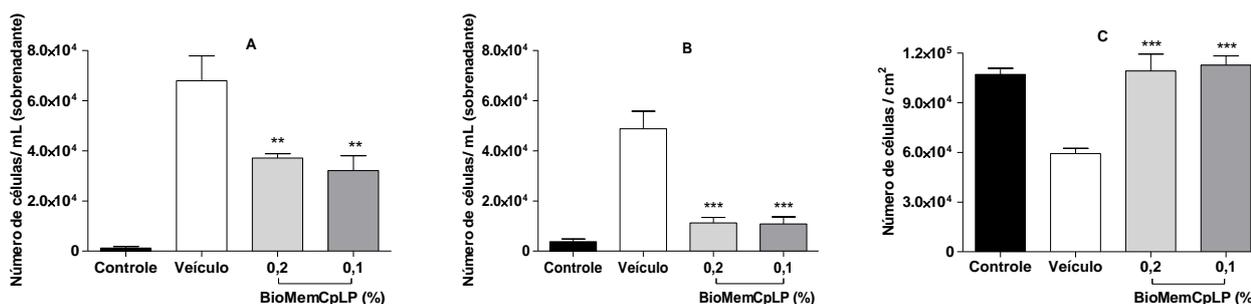


Análise microscópica imediatamente após a raspagem (0 h) e após 24, 48 e 72 horas de cicatrização. A linha tracejada representa a área de rascunho. Visualmente, é possível notar que mais células migraram para a área lesada no grupo LP, principalmente após 72 horas. Ampliação original: 100x.

5.2.3 A BioMemCpLP (0,2 e 0,1%) estimula a adesão de células HaCat

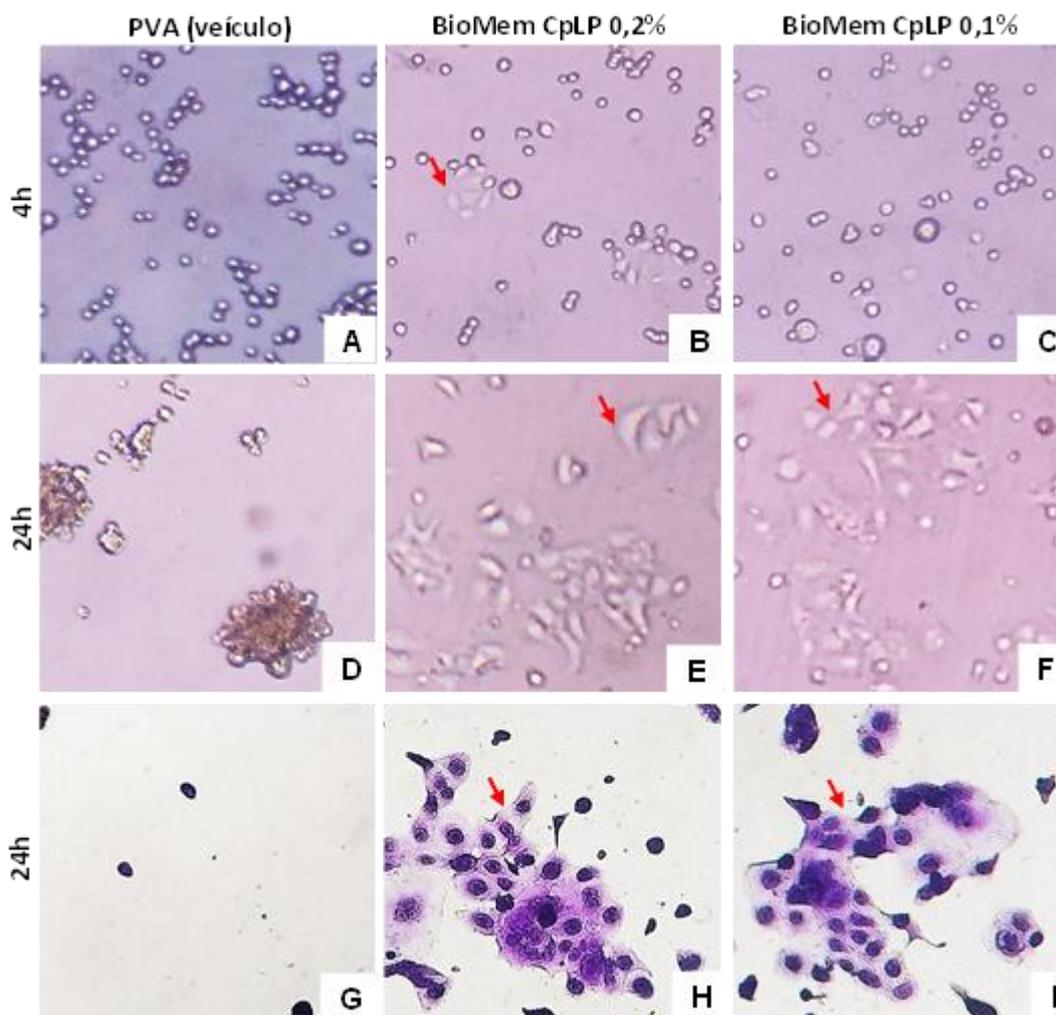
Os queratinócitos mostraram capacidade de aderir ao biomaterial após serem colocados na BioMemCpLP (0,1 e 0,2%), porém não foram capazes de aderir ao biomaterial composto apenas pelo veículo PVA. Após sucessivas coletas do sobrenadante e contagem das células suspensas, observou-se maior adesão celular nos grupos com CpLP, pois houve redução significativa do número de células no sobrenadante após 4 e 24 h. Ao final do teste, foi obtido um aumento significativo de células aderidas ao BioMemCpLP queratinócitos $1,1 \times 10^5$ células/cm² $\pm 1,8 \times 10^4$) (**Figura 18.A, 18.B e 18.C**) em relação ao controle, de acordo com o aumento da intensidade da cor púrpura do cristal violeta. É possível visualizar nas imagens o surpreendente a ação promovida pela Biomembrana capaz de favorecer a adesão celular na placa enquanto não se vê células aderidas nas placas com apenas o veículo (**Figura 19**).

Figura 18. Efeito de BioMemCpLP (0,2 e 0,1%) na adesão de células HaCat.



Representação do número de células não aderidas contadas nos sobrenadantes durante o ensaio de adesão de queratinócitos em BioMemCpLP após 4 (A) e 24 h (B). (C) número de células/cm² aderidas à Biomembrana e coradas com cristal violeta após 24 h. O grupo controle não recebeu Biomembrana e o grupo veículo recebeu Biomembrana composta apenas por PVA. Os dados foram expressos como média±DP de triplicado. ANOVA one-way seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para análise estatística dos dados. **p<0,01 e ***p>0,005 indica uma diferença significativa entre os grupos tratado com BioMemCpLP e os grupos de veículo.

Figura 19. Fotomicrografia em microscopia óptica da adesão dos queratinócitos HaCat em BioMemCpLP.



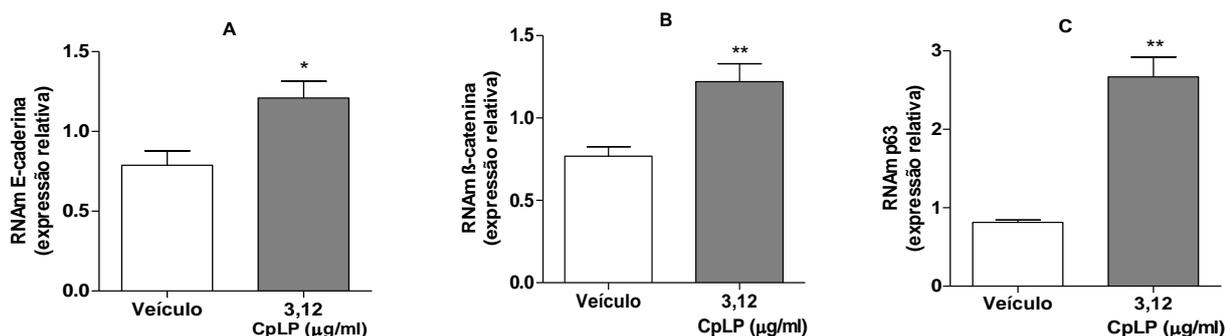
As células foram semeadas a uma densidade de 5×10^4 células/mL. Um registro fotográfico dos poços foi feito após 4 (A, B e C) e 24 (D, E e F) horas da incubação. Após 24 h de cultivo, as células foram coradas com cristal violeta (G, H e I). Células aderidas entre si e à BioMemCpLP são observadas em B, E, F, H, I, mas células não aderidas à Biomembrana veículo (somente PVA) como mostrado em A e D, onde encontram-se esféricas. Em G não é possível visualizar células coradas pois não estavam aderidas à placa portanto permaneceram no sobrenadante. As setas apontam para exemplos de células aderidas à Biomembrana e com morfologia normal. Ampliação original 100x.

5.2.4 CpLP estimula a expressão de E-caderina, B-catenina e P63

Os queratinócitos foram estimulados a expressar uma maior quantidade de E-

caderina ($1,2 \pm 0,1$; veículo $0,78 \pm 0,15$), β -catenina ($1,2 \pm 0,2$; veículo $0,7 \pm 0,1$) e p63 ($2,67 \pm 0,5$; veículo $0,8 \pm 0,05$) (**Figura 20.A, 20.B, 20.C**). Essas proteínas estão envolvidas na migração dos queratinócitos para o local da ferida até que o epitélio seja reconstituído.

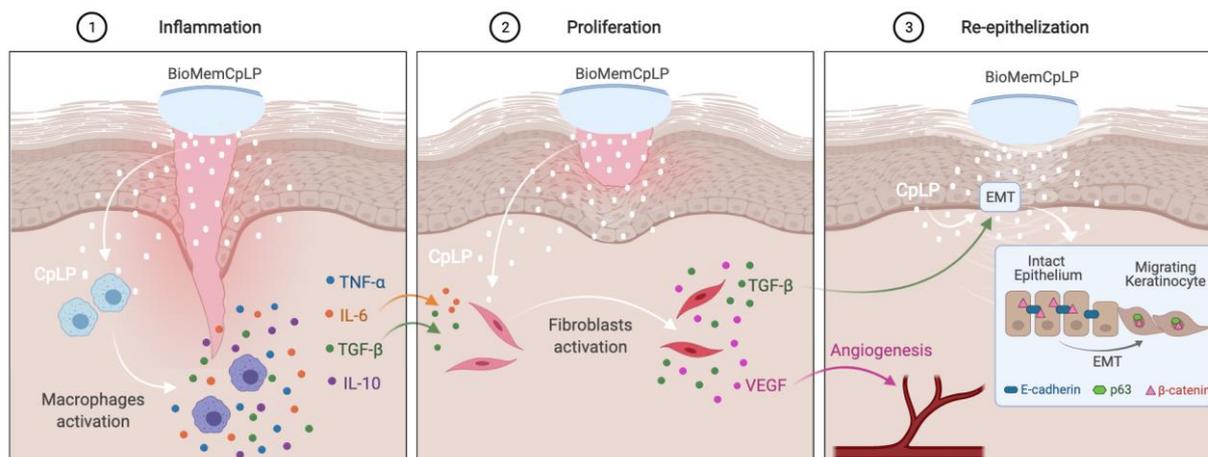
Figura 20. Efeito do tratamento com CpLP na liberação de mediadores envolvidos na proliferação, migração e reepitelização de células HaCat.



A fração proteica CpLP (3,12 µg/mL) estimulou o aumento de E-caderina (A), β -catenina (B) e P63 (C) nos queratinócitos após 24 h, confirmado por PCR. ANOVA one-way seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para análise estatística dos dados. Os resultados foram expressos como média \pm DP de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indica uma diferença significativa entre os grupos tratados com CpLP e veículo.

Diante dos resultados encontrados neste trabalho e de acordo com estudos pré-clínicos anteriores com a BioMemCpLP foi proposto um resumo gráfico (**Figura 21**) que resalta os principais mecanismos pelos quais as proteínas atuam justificando seu pronunciado efeito cicatrizante.

Figura 21. Resumo das ações propostas da BioMemCpLP



Fonte: elaborada pelo autor com Biorender. A BioMemCpLP, após ser aplicada sobre a úlcera, libera seus compostos bioativos capazes de atuar diretamente nos macrófagos modulando o processo inflamatório por meio da liberação de citocinas pró (TNF- α , IL-6) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10), favorecendo o início da fase proliferativa. Esse curativo pode ativar fibroblastos, promovendo migração e proliferação pela sinalização do TGF- β e angiogênese pelo VEGF. Além disso, atua nos queratinócitos promovendo a migração dessas células para ativar o processo EMT via β -catenina e proliferação aumentando a expressão de p63 que melhora a reepitelização do tecido lesado.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que a fração isolada do látex de *Calotropis procera* (CpLP), utilizada como princípio bioativo da Biomembrana BioMemCpLP, não confere toxicidade, estimula a proliferação, migração e adesão celular através da ativação de mediadores envolvidos na cicatrização de feridas. Essas descobertas sugerem que este curativo é biocompatível e pode acelerar o processo de cicatrização. A BioMemCpLP foi utilizada para o tratamento de úlceras crônicas decorrentes da hanseníase e demonstrou, apesar das diferentes complicações associadas às úlceras, uma excelente ação cicatrizante, acarretando inclusive na cura da ferida na maioria dos pacientes (88,2%).

A planta investigada neste estudo, *Calotropis procera*, é um arbusto de porte médio com distribuição ao longo das regiões tropicais do globo. É nativa da Índia e do Oriente Médio e nesses locais a planta é utilizada para diversos fins de saúde. Atualmente, a planta também está amplamente distribuída na região nordeste do Brasil, onde foi classificada como uma planta invasora. O uso medicinal desta planta pode inclusive reduzir sua disseminação e favorecer o equilíbrio com plantas nativas.

Apesar da planta ser conhecida por produzir e armazenar compostos que podem ser letais para mamíferos (cardenolídeos) após a ingestão, ela é amplamente introduzida na medicina local e atualmente tem sido estudada como ferramenta biotecnológica para produção de queijo (RAMOS *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2023).

As indicações populares de *C. procera* envolvem o uso do látex que pode facilmente ser extraído abundantemente da planta cortando ou quebrando os pecíolos das folhas. Portanto, por ser um extrato e não uma substância isolada, o rendimento da extração torna-se mais eficiente.

Devido a todas as indicações, que incluem ação anti-inflamatória e hipoglicemiante, nosso grupo de pesquisa tem investigado compostos no látex de *C. procera* há mais de 20 anos. Desde então, o potencial terapêutico das proteínas do látex de *C. procera* tem sido demonstrado em diferentes doenças humanas (RANGEL *et al.*, 2022). A fração proteica do látex, incorporada na Biomembrana utilizada neste estudo foi previamente testada, dentre outras condições, restaurando a arquitetura normal dos eritrócitos em animais acometidos com infecção bacteriana letal (SILVA *et al.*, 2019) e regulando negativamente a inflamação e restaurando a homeostase da coagulação sanguínea na infecção aguda por *Salmonella* (SOUSA *et al.*, 2020).

Conhecendo o potencial do material biológico que compõe a BioMemCpLP em testes pré-clínicos, iniciou-se um estudo clínico em úlceras crônicas a fim de avaliar o possível efeito cicatrizante da Biomembrana em úlceras derivadas da hanseníase que são conhecidas por serem extremamente complexas e de difícil cicatrização que reduzem a autonomia do paciente impedindo a realização de atividades cotidianas de locomoção, higiene, lazer e até convívio com amigos e familiares.

Existem muitos produtos disponíveis no mercado para o tratamento de feridas e úlceras cutâneas, independentemente da sua etiologia. Apesar da eficácia desses produtos para favorecer a cicatrização total das feridas, quase todas as pessoas que sofrem de úlceras de hanseníase e, geralmente há mais de uma no corpo, não têm meios de renda para seguir o tratamento necessário que leva um longo período até a cura. Portanto, os fitoterápicos podem ser uma escolha terapêutica mais acessível economicamente e igualmente eficaz em relação aos tratamentos comercializados atualmente para úlceras crônicas.

Este estudo prospectivo, randomizado e multicêntrico mostrou que o tratamento inovador com uma Biomembrana composta de proteínas extraídas do látex de *Calotropis procera* (BioMemCpLP) demonstrou ser um recurso terapêutico bem tolerado e eficaz para tratar úlceras crônicas decorrentes da hanseníase.

A hanseníase é uma doença típica negligenciada. Sua ocorrência geográfica está amplamente associada a países pobres e ainda em desenvolvimento, tendo Brasil e Índia entre as populações mais impactadas. Contudo, a maioria das pessoas afetadas está subassistida e tem nos fitoterápicos naturais sua esperança. Os sintomas da doença aparecem lentamente em um longo período após a infecção bacteriana (*Mycobacterium leprae*). As pessoas infectadas desenvolvem uma arquitetura anormal do sistema nervoso em seu terminal, com mais complicações nas extremidades do corpo, como nos pés. As pessoas acometidas pela hanseníase passam por importantes adversidades secundárias caracterizadas principalmente pelo aparecimento de feridas que se tornam feridas crônicas (úlceras). As úlceras persistem mesmo após a cura da infecção pelos antibióticos específicos utilizados. Quase todas as úlceras hansênicas resistem à cicatrização e tornam-se um impedimento para que as pessoas afetadas tenham uma vida funcional. As úlceras plantares sofrem complicações adicionais, uma vez que essas feridas são continuamente submetidas a impactos de caminhada e expostas a superfícies sujas ou lesivas.

Neste estudo, os pacientes foram distribuídos de maneira homogênea entre os grupos exceto pelo grupo que foi tratado com Hidrocolóide que incluiu maior quantidade não curados da hanseníase, ou seja, pacientes com tratamento antimicrobiano em andamento. A poliquimioterapia utilizada no tratamento da hanseníase pode influenciar positivamente na cicatrização da úlcera, portanto é possível afirmar que úlceras tratadas com Hidrocolóide podem ter fechado mais rapidamente por conta do tratamento via oral. Por outro lado, pacientes tratados com a Biomembrana não sofrem influência destes medicamentos.

Durante o estudo, alguns pacientes foram descontinuados e seus dados foram analisados parcialmente tendo em vista o não comparecimento à instituição para realizar o curativo. Esse fato pode ser justificado pela difícil locomoção desses pacientes que não dispõe de maneiras seguras de deslocamento, adicionalmente a falta de recursos financeiros inviabiliza a continuidade do tratamento no estabelecimento de saúde. Além disso, muitos pacientes residem no interior do estado e não puderam sequer iniciar o tratamento. Outro fator limitante é que estes pacientes resistem aos novos tratamentos pois já utilizaram diversas terapias sem sucesso ou ainda apresentam úlceras com complicações que inviabilizam a inclusão no estudo. Esses motivos também explicam o número reduzido de pacientes incluídos no estudo, já que, mesmo após meses de recrutamento, a quantidade de pacientes tratados foi inferior a quantidade de pessoas cadastradas portadoras de úlceras crônicas decorrentes da hanseníase.

As características demográficas dos pacientes incluídos no estudo não influenciaram na ação cicatrizante da Biomembrana, porém o tempo de úlcera é um fator limitante em que quanto mais antiga é a ferida, mais difícil é a cicatrização completa. Por outro lado, úlceras recentes tem mais chance de cura, independente do tratamento. A Biomembrana foi capaz de causar a reepitelização completa de 44% das úlceras com mais de dois anos, mostrando com esse resultado a capacidade de modificar o microambiente pro-inflamatório instalado há anos.

A BioMemCpLP foi capaz de reduzir significativamente a área das úlceras em comparação aos tratamentos com Sulfadiazina de prata e Hidrocolóide a partir da terceira semana e até o final do tratamento. Além disso, todos os pacientes tratados com a Biomembrana tiveram uma melhora no decorrer do tratamento, fato que pode ser evidenciado pela redução significativa da área e conseqüentemente uma maior taxa de cicatrização em comparação ao início do tratamento, o que não ocorreu nos grupos

controles. Outro achado de extrema relevância é que a Biomembrana reduz o tempo de ferida aberta, ou seja, as úlceras alcançam a cura mais rapidamente. Além disso, em pacientes tratados com a Biomembrana, a proporção de úlceras curadas foi maior que nos grupos controles e foi demonstrado que a probabilidade de alcançar cicatrização completa independente das demais variáveis clínicas é 67,52 vezes maior.

De maneira semelhante a BioMemCpLP, diversos biomateriais extraídos de produtos naturais têm alcançado sucesso como alternativa aos curativos tradicionais. Curativos a base de polímeros como o PVA desempenham um importante papel na hemostasia e geralmente possuem características imprescindíveis para o bom desfecho da lesão como a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não imunogenicidade e propriedades mecânicas. Esses curativos, em comparação com os curativos tradicionais, apresentam muitas vantagens, como regulação do ambiente úmido, rápida cicatrização, máximo contato com a superfície da ferida e cicatrização eficiente. Dentre esses curativos pode-se citar membranas compostas de materiais poliméricos como alginato, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, poliuretano, celulose, dextrana, gelatina, seda, polianilina, hidrogel e PVA incorporados a substâncias ativas ou extratos vegetais (GALLELLI *et al.*, 2020; MAAZ *et al.*, 2021; JAMES *et al.*, 2022). Corroborando com os resultados do tratamento com a BioMemCpLP, uma biomembrana composta do látex natural da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e polivinilmetiléster tem mostrado bons resultados na cicatrização de úlceras venosas e úlceras de pé diabético, favorecendo a fibroplasia e formação do novo tecido (FRADE *et al.*, 2004; FRADE; NETTO; FOSS, 2012).

O tratamento com a Biomembrana, além de contemplar estas características inerentes aos biomateriais, possui baixíssimo custo quando comparado aos curativos modernos disponíveis no mercado. Seu custo estimado é no mínimo 3 vezes mais barato que o hidrocoloide.

O sucesso do tratamento com a Biomembrana certamente é justificado pela sua influência nas fases da cicatrização atuando diretamente em células de extrema importância no processo de cura da úlcera. Em estudos *in vitro* e em animais, a BioMemCpLP modulou a atividade macrofágica, estimulando a proliferação dessas células e a liberação de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β orquestrando uma cicatrização mais rápida e eficiente por acelerar a fase inflamatória e estimular a fase proliferativa (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2016; NUNES, *et al.*, 2021).

Os macrófagos são células chave nesse processo, visto que feridas com número reduzido de macrófagos têm reepitelização retardada, angiogênese prejudicada, deposição de colágeno diminuída e baixa proliferação celular. Em feridas crônicas, a desregulação da fase inflamatória contribui potencialmente para a não cicatrização e para o aumento do risco de infecções. Portanto, a Biomembrana favorece a cicatrização por promover a transição de macrófagos de fenótipo M1 para M2 através do equilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias (AITCHESON *et al.*, 2021; YANG, *et al.*, 2022).

A fisiopatologia destas feridas crônicas envolve um estado inflamatório que não evolui para as demais fases e apesar do uso das terapias atuais, essas feridas não cicatrizam. O fenótipo do macrófago deve mudar para o perfil anti-inflamatório M2 à medida que outras etapas da cicatrização favorecem um reparo adequado. Na fase proliferativa, a população geral de macrófagos é predominantemente M2 que promove efeitos anti-inflamatórios. Essas células produzem altos níveis de fatores de crescimento, como VEGF, TGF- β 1, PDGF e IGF-1 auxiliando na proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais para formação de tecido de granulação, angiogênese e por fim reepitelização. Os macrófagos M2 também suprimem a inflamação por meio da regulação positiva da IL-10, evitando danos celulares incrementais inerentes à inflamação sustentada (KRZYSZCZYK *et al.*, 2018; MINUTTI *et al.*, 2017).

A BioMemCpLP também atua na ativação e proliferação de fibroblastos e queratinócitos (NUNES, *et al.*, 2021). Sabe-se que a diminuição da viabilidade e as alterações fenotípicas dos fibroblastos é outro aspecto que dificulta a cicatrização de úlceras plantares, causando um processo de cicatrização lento e contribui para a condição crônica da ferida. Este ambiente é caracterizado pela apoptose de fibroblastos e células precursoras vasculares, prejudicando alguns processos cruciais para a cicatrização. O uso da Biomembrana contribui para a manutenção desses processos que incluem a produção e remodelação da matriz extracelular (MEC), migração e proliferação de fibroblastos, formação do tecido de granulação, síntese de colágeno (MENDOZA-MARÍ *et al.*, 2022; PASTAR *et al.*, 2021). Adicionalmente, ocorre a reepitelização que é alcançada pela proliferação, migração e diferenciação dos queratinócitos, processos em que a Biomembrana também atua (NUNES, *et al.*, 2021). Este processo constitui-se essencial para o fechamento bem-sucedido da ferida, tendo em vista que, em úlceras crônicas, há uma notável disfunção de queratinócitos (TANG *et*

al., 2021).

Cabe destacar que uma úlcera com mais de seis anos cicatrizou totalmente quando tratada com Biomembrana. Além dessas observações, incluindo o melhor desempenho de cicatrização, associado à Biomembrana, é importante considerar aspectos além da eficácia. Primeiro, o uso combinado da Biomembrana com Sulfadiazina de prata ou Hidrocolóide não foi avaliado neste estudo. Um protocolo combinado poderia até melhorar o desempenho da cicatrização, já que ambos os produtos têm ações diferentes. O uso de Sulfadiazina de prata é o único produto comumente disponível nas unidades de saúde pública para o tratamento de úlceras hansênicas. Este estudo e os dados históricos registrados nessas unidades de saúde, sugerem que a Sulfadiazina de prata não é indicada para úlceras maiores e apenas desempenha o papel de agente profilático contra infecções, conferindo ação antimicrobiana, além disso não tem ação direta nas fases da cicatrização da cicatrização.

Apesar da amostragem limitada, é possível atestar o notável benefício deste curativo na cicatrização de úlceras plantares que são extremamente complexas, de difícil cicatrização e que tanto impactam negativamente na vida dos pacientes. As úlceras crônicas representam uma epidemia silenciosa que manifesta uma ameaça significativa à saúde pública global e à economia (MAAZ *et al.*, 2021). Portanto, a rapidez com que se observa melhorias na evolução clínica da úlcera evitando complicações como o surgimento de infecções e amputações de membros e considerando seu baixo custo, o uso da BioMemCpLP justifica o uso padronizado em centros de saúde especializados e oferece perspectivas para novos estudos que contemplem diferentes tipos de lesões. Adicionalmente, nenhum paciente relatou sintoma que caracterize uma reação adversa à Biomembrana.

C. procera é abundantemente encontrada em ambas as regiões mais afetadas com casos de hanseníase. A produção da Biomembrana é fácil, rápida e envolve baixo custo. Todas essas condições são favoráveis para promover novos estudos com esse objetivo. Os mecanismos conhecidos subjacentes à estimulação da cicatrização por proteínas do látex de *C. procera* sugerem que a Biomembrana pode ser eficiente no tratamento de úlceras associadas a outras condições clínicas. Diante disso, sabe-se que há um longo caminho até que a BioMemCpLP se torne acessível à população. Além de estudos adicionais, necessita-se de transformar a produção manual em uma produção

em larga escala e padronizada, mantendo sua eficácia para que finalmente seja disponibilizada no SUS e, desse modo, atender aos inúmeros pacientes acometidos com úlceras crônicas.

O efeito notadamente cicatrizante da biomembrana bem como a segurança pode ser justificado por mecanismos investigados nos estudos *in vitro*. A fração isolada do látex *Calotropis procera* que compõe a Biomembrana não apresentou toxicidade de acordo com os testes básicos *in vitro* realizados. Essas descobertas sugerem que a BioMemCpLP é biocompatível. Estudos recentes usando filmes para cicatrização também mostraram resultados semelhantes, como filmes de hidrogel à base de xiloglucano-poli álcool vinílico (XG-PVA), filmes de alginato de sódio/iodopovidona (NaAlg/PVPI), filmes de quitosana/fumarato de polietileno glicol (Ch/PEGF), adesivo nanofibroso isolado de polivinil álcool/proteína de soja e, finalmente, filmes de poli (ϵ -caprolactona) (HASHEMI DOULABI *et al.*, 2018; KHABBAZ; SOLOUK; MIRZADEH, 2019; PICONE *et al.*, 2019; SERRANO *et al.*, 2004; SUMMA *et al.*, 2018).

O processo normal de cicatrização de feridas é extremamente complexo e, portanto, requer a coordenação de muitos fatores, por exemplo, ativação de células como plaquetas, neutrófilos, monócitos e macrófagos, que, uma vez ativadas, coordenam a liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Nas feridas crônicas, como úlceras diabéticas, úlceras por pressão, úlceras varicosas e úlceras decorrentes da hanseníase, apresentam anormalidades ou processos atípicos que retardam a cicatrização, por isso há necessidade de curativos para auxiliar este processo (KAO, 2020). Testes que atestam a biocompatibilidade de um material, por exemplo, citotoxicidade, proliferação, adesão e cicatrização *in vitro* são amplamente utilizados em testes pré-clínicos para utilização de novos tratamentos com ação cicatrizante, bem como a investigação da liberação de moléculas envolvidas nesse processo. Diferentes aspectos celulares foram analisados para avaliar as alterações moleculares induzidas pela fração CpLP em células HaCat.

A proliferação e estimulação da migração queratinócitos observada no teste de cicatrização *in vitro* mostra que a fração tem ação específica sobre essas células, porém, *in vivo*, é provável que haja uma comunicação epidérmico-mesenquimal, pois essas células também são estimuladas por citocinas produzidas por macrófagos como TGF- β durante a reepitelização (BANZRAGCH DORJSEMBE, HEE JU LEE; KIM, BATSUREN DULAMJAV, TUNSAG JIGJID; NHO, 2017; HIRAI *et al.*, 2019; KLEIN *et al.*,

2020). O achado deste provável mecanismo é reforçado pelo fato de que CpLP estimulou a proliferação de macrófagos *in vitro* e em feridas excisionais de camundongos a fração estimulou a liberação de mediadores essenciais para a cicatrização de feridas em suas diferentes fases como TNF- α , IL-6, IL-10, TGF- β e VEGF. (FIGUEIREDO *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2021).

Em um estudo anterior realizado por RAMOS *et al.*, 2016, CpLP aumentou os níveis de NO e IL-1 β em feridas excisionais de camundongos. De forma controversa um estudo *in vitro* com macrófagos RAW (NUNES *et al.*, 2021), a fração CpLP reduziu os níveis de NO e IL-1 β o que pode sugerir uma atividade pró-inflamatória não tão potente, mas suficiente para modular a produção de outras quimiocinas e permitir a mudança de fenótipo em macrófagos. Além disso, nas fases da cicatrização há uma variação de citocinas expressas, bem como uma oscilação nas quantidades sintetizadas. O excesso de NO gera radicais livres altamente reativos enquanto o aumento de IL-1 β instiga lesões adicionais nas células ou tecidos adjacentes ao redor da área lesada (AZMI *et al.*, 2019). Nesse cenário, a resposta inflamatória excessiva pode desencadear mais danos às células e tecidos, retardando o processo de cicatrização da ferida (KIM, M. *et al.*, 2017a). Portanto, com o equilíbrio inflamatório estabelecido, os macrófagos podem facilmente se transformar do tipo M1 para o tipo M2, podendo também estar presentes as populações de macrófagos heterogêneos e citocinas pró e anti-inflamatórias simultaneamente (NOVAK; KOH, 2013). Um composto isolado de *Silybum marianum* com ação cicatrizante também reduziu os níveis de NO e IL-1 em macrófagos RAW 264.7 e acelerou o processo de cicatrização de feridas em animais (HU *et al.*, 2020). Resultados semelhantes foram encontrados em testes com extratos de *Stellera chamaejasme*, *Achillea asiatica*, amora e própolis (DORJSEMBE, *et al.* 2017; KIM, J. H. *et al.*, 2019; KIM, M. *et al.*, 2017; VAN DE VELDE *et al.*, 2019).

A proliferação e a capacidade migratória de queratinócitos são características-chave na segunda fase da cicatrização. Portanto, a estimulação dessas células é um dos mecanismos pelos quais os extratos vegetais podem melhorar o processo de cicatrização de feridas (DANDANAVAR *et al.*, 2019). Alguns biomateriais também estimulam a proliferação de queratinócitos, como curativos à base de matriz nanofibrosa usando biopolímero poli (álcool vinílico) (PVA) incorporado com filme de sericina de seda (SS) e poli (acetato de vinil) (PVAc) contendo extrato de mangostim (filme de MG/PVAc) (BOONMAK *et al.*, 2018; GILOTRA *et al.*, 2018).

Outro possível mecanismo que justifica o uso de CpLP é a sinalização da quimiocina IL-6 que modula a expressão de TGF- β 1 em fibroblastos e desempenha um papel na migração e proliferação de queratinócitos através da modulação da expressão e função do receptor de TGF- β (TGF- β R). O aumento da secreção de TGF- β 1 na derme e a regulação positiva de TGF- β R na epiderme podem facilitar a diferenciação dos queratinócitos epidérmicos do fenótipo pró-migratório observado durante a reepitelização (LUCKETT-CHASTAIN *et al.*, 2017).

Além disso, o aumento da expressão do VEGF favorece a formação do tecido de granulação, que se caracteriza pela formação de uma nova rede microvascular na área lesada, a angiogênese, aumentando o reparo morfológico e funcional do tecido por meio do aporte de nutrientes ao danificado tecido. A expressão aumentada de VEGF em fibroblastos também foi observada em estudos de novos tratamentos para cicatrização, como o uso de terapia de ultrassom e filmes de fibroína de seda carregados com estrôncio / alginato de sódio (BERTIN *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). O VEGF também tem demonstrado ações não angiogênicas através da ativação de queratinócitos em receptores específicos (VEGFR), promovendo proliferação e quimiotaxia respostas que melhoram a cicatrização de feridas (ONG; DILLEY, 2018).

Vale ressaltar o efeito direto do CpLP nos queratinócitos HaCat na fase final da cicatrização, promovendo aumento da expressão de β -catenina, E-caderina e P63. Durante a fase de reepitelização da cicatrização de feridas, a via de sinalização Wnt/ β -catenina é ativada e modula a migração para o local da ferida e a proliferação celular (KIM *et al.*, 2017). Os queratinócitos no local da ferida passam pelo processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT), uma mudança no fenótipo de células aderentes para células migratórias. A perda de E-caderina, um componente chave das junções aderentes, e o acúmulo nuclear de β -catenina, um coativador transcricional que induz a expressão de proteínas envolvidas na EMT, são eventos cruciais necessários para o processo de mudança do fenótipo dos queratinócitos. Assim, pode-se supor que CpLP atue promovendo a manutenção do equilíbrio na plasticidade dos queratinócitos, ou seja, quando a expressão da E-caderina aumenta, as células adquirem caráter de célula a célula aderente e, por outro lado, por aumento da expressão de β -catenina faz as células migrarem para o local da lesão (KIM; KU; CHOI, 2020). Além disso, a β -catenina localizada no núcleo ativa vários genes-alvo envolvidos na proliferação celular (ATKINSON *et al.*, 2015). Nas úlceras crônicas, a migração dos queratinócitos durante a

fase proliferativa é a etapa mais limitante para uma cicatrização adequada (KIM, D.; KU; CHOI, 2020). Foi evidenciado em estudos anteriores que substâncias naturais também ativam a via β -catenina em queratinócitos HaCat, como Se-metilselenocisteína (MSC) e Lucidona, bem como isolados de *S. chamaejasme* e *A. marmelos* (KIM; KU; CHOI, 2020; KIM *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017; AZMI *et al.*, 2019).

A estimulação proliferativa de CpLP em queratinócitos também pode ser justificada pelo aumento da expressão de p63. A família de fatores de transcrição p53, p63 e p73 desempenha papéis críticos na regulação do ciclo celular, resposta a danos no DNA e diferenciação celular. P63 é um regulador transcricional do desenvolvimento ectodérmico necessário para a proliferação de células basais e manutenção de células-tronco (SCOTT BEELER *et al.*, 2019). O aumento da expressão de p63 também foi observado em queratinócitos HaCat cultivados em scaffolds nanofibrosos eletrofiados feitos de gelatina/hialuronano sulfatado (sHA) (BHOWMICK *et al.*, 2017). Da mesma forma, células HaCat cultivadas em uma matriz de alginato de mel demonstraram regulação positiva da expressão de p63 e E-caderina, auxiliando na progressão da cicatrização (NORDIN *et al.*, 2017).

7 CONCLUSÃO

A Biomembrana composta de CpLP estimula a cicatrização de úlceras plantares, inclusive demonstrou melhor eficácia quando comparada aos demais tratamentos utilizados no estudo. Estas descobertas não só confirmam as múltiplas propriedades fitomedicinais da planta, mas também indicam um novo tratamento a ser disponibilizado no SUS para tratamento de úlceras decorrentes da hanseníase. Vale ressaltar que o baixo custo para obtenção da BioMemCpLP é financeiramente mais viável para a aquisição pelo sistema de saúde quando comparado aos demais curativos disponíveis. Evidencia-se também que o impacto positivo na qualidade de vida dos pacientes com úlceras crônicas é incalculável.

Os resultados deste estudo fornecem evidências de que os compostos bioativos extraídos de *C. procera* são biocompatíveis. Os mecanismos envolvidos na ação cicatrizante de CpLP sugerem que esta fração proteica atua diretamente em queratinócitos promovendo a migração e adesão intercelular através da expressão de E-caderina e β -catenina além de estimular a proliferação celular em decorrência da expressão de p63 promovendo a reepitelização do tecido lesionado.

8 REFERÊNCIAS

AITCHESON, Savannah M. *et al.* Skin wound healing: Normal macrophage function and macrophage dysfunction in diabetic wounds. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 16, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26164917>

ALMEIDA, MARINA GABRIELLE GUIMARÃES DE. **DETERMINAÇÃO DE RISCO (TOXICIDADE/ALERGENICIDADE) DE PROTEÍNAS DO LÁTEX DE Calotropis procera COMO INSUMO TERAPEUTICO**. 2023. [s. l.], 2023.

AMINI-NIK, Saeid *et al.* determine wound healing β -Catenin – regulated myeloid cell adhesion and migration determine wound healing. **J Clin Invest**, [s. l.], v. 124, n. 6, p. 2599–2610, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI62059.factors>

AMINI, MOHAMMAD HUMAYOON , KAMRAN ASHRAF, FATIMAH SALIM, SIONG MENG LIM, KALAVATHY RAMASAMY, NURHUDA MANSHOOR, SADIA SULTAN, Wasim Ahmad. Important insights from the antimicrobial activity of Calotropis procera. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 103181, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103181>

ANDREY, Marco; FRADE, Cipriani; FOSS, Norma Tiraboschi. The vegetal biomembrane in the healing of chronic. [s. l.], v. 87, n. 1, p. 45–51, 2012.

ARAÚJO, Rosangela Vidal de Souza *et al.* Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 82, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v10i1.5470>

ATKINSON, Jennifer M. *et al.* Activating the Wnt/ β -catenin pathway for the treatment of melanoma - Application of LY2090314, a Novel selective inhibitor of glycogen synthase kinase-3. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125028>

AZMI, Lubna *et al.* In vitro wound healing activity of 1-hydroxy-5,7-dimethoxy-2-naphthalene-carboxaldehyde (HDNC) and other isolates of Aegle marmelos L.: Enhances keratinocytes motility via Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 4, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.01.017>

AZMI, Lubna *et al.* In vitro wound healing activity of 1-hydroxy-5,7-dimethoxy-2-naphthalene-carboxaldehyde (HDNC) and other isolates of Aegle marmelos L.: Enhances keratinocytes motility via Wnt/ β -catenin and RAS-ERK pathways. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 532–539, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.01.017>

BANZRAGCH DORJSEMBE, HEE JU LEE, Myungsuk; KIM, BATSUREN DULAMJAV, TUNSAG JIGJID, Chu Won; NHO. Achillea asiatica extract and its active compounds induce cutaneous wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.06.006>

BARUI, Ananya *et al.* Immunohistochemical Evaluation of p63 , E-Cadherin , Collagen I and III Expression in Lower Limb Wound Healing under Honey. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/239864>

BERTIN, LARISSA DRAGONETTI MD; POLI-FREDERICO, REGINA CÉLIA PHD; PIRES OLIVEIRA, DEISE APARECIDA ALMEIDA PHD; OLIVEIRA, PRISCILA DANIELE PHD; PIRES, FLÁVIA BELTRÃO MD; SILVA, ANA FLÁVIA SPADACCINI MD; OLIVEIRA, Rodrigo Franco PhD. Analysis of Cell Viability and Gene Expression After Continuous Ultrasound Therapy in L929 Fibroblast Cells. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], p. 369–372, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/PHM.0000000000001103>

BHOWMICK, Sirsendu *et al.* Reciprocal influence of hMSCs/HaCaT cultivated on electrospun scaffolds. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 4–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5941-4>

BOONMAK, Nattapol *et al.* Preparation of mangosteen extract-loaded poly(vinyl acetate) for use as an antibacterial spray-on dressing. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 46, p. 322–329, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.033>

CASEY, Georgina. Nutritional support in wound healing. [s. l.], v. 17, p. 55–57, 2016.

CHAVES, L *et al.* Drug Delivery Systems on Leprosy Therapy: Moving Towards Eradication ? [s. l.], 2020.

DANDANAVAR, Vijaya *et al.* Wound-healing potential of methanolic extract of *Rhaphidophora korthalsii* leaves possibly mediated by collagen and fibronectin expression in L929 cell line. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], n. 0, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5455/njppp.2019.9.0623404072019>

DHIVYA, Selvaraj; PADMA, Viswanadha Vijaya; SANTHINI, Elango. Wound dressings - A review. **BioMedicine (Netherlands)**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7603/s40681-015-0022-9>

FIGUEIREDO, Ingrid Samantha Tavares *et al.* 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**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 512–519, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.015>

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 Physiology and Biochemistry**, [s. l.], p. 781–789, 2007.

GALLELLI, Giuseppe *et al.* Nano-hydrogel embedded with quercetin and oleic acid as a new formulation in the treatment of diabetic foot ulcer: A pilot study. **International Wound**

Journal, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 485–490, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iwj.13299>

GILOTRA, Sween *et al.* Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 90, n. September 2017, p. 420–432, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.077>

HAN, George; CEILLEY, Roger. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>

HASHEMI DOULABI, Azadehsadat *et al.* Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend films for wound dressing application: in vitro biocompatibility and biodegradability assays. **Progress in Biomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 143–150, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0093-2>

HIRAI, Toshiro *et al.* Keratinocyte-Mediated Activation of the Cytokine TGF- β Maintains Skin Recirculating Memory CD8⁺ T Cells. **Immunity**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 1249–1261.e5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.002>

HU, Xiaolian *et al.* Characteristics of the global copper raw materials and scrap trade systems and the policy impacts of China's import ban. **Ecological Economics**, [s. l.], v. 172, n. February, p. 106626, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2020.106626>

JAMES R. BARDILL A, MELISSA R. LAUGHTER B, MICHAEL STAGER C, KENNETH W. LIECHTY A, MELISSA D. KREBS C, Carlos Zgheib. Topical gel-based biomaterials for the treatment of diabetic foot ulcers. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 138, p. 73–91, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.10.045>

KAO, Chao Hsing. Use of concentrate growth factors gel or membrane in chronic wound healing: Description of 18 cases. **International Wound Journal**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 158–166, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iwj.13250>

KHABBAZ, Bahareh; SOLOUK, Atefeh; MIRZADEH, Hamid. Polyvinyl alcohol/soy protein isolate nanofibrous patch for wound-healing applications. **Progress in Biomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00120-4>

KHABBAZ, Bahareh; SOLOUK, Atefeh; MIRZADEH, Hamid. Polyvinyl alcohol/soy protein isolate nanofibrous patch for wound-healing applications. **Progress in Biomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 185–196, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40204-019-00120-4>

KIM, Dongsoo; KU, Bonhee; CHOI, Eun Mi. Se-methylselenocysteine stimulates migration and antioxidant response in HaCaT keratinocytes: Implications for wound healing. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 58, p. 126426, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.126426>

KIM, Jae Hwan *et al.* Combination of mineral trioxide aggregate and propolis promotes

odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells through ERK signaling pathway. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1801–1809, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00609-5>

KIM, Myungsuk *et al.* *Stellera chamaejasme* and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42490>

KIM, Myungsuk *et al.* *Stellera chamaejasme* and its constituents induce cutaneous wound healing and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. August 2016, p. 1–12, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42490>

KLEIN, Katrin *et al.* A TGF- β - and p63-Responsive Enhancer Regulates IFN- κ Expression in Human Keratinocytes. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 204, n. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901178>

KRZYSZCZYK, Paulina *et al.* **The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>

LUCKETT-CHASTAIN, Lerin R. *et al.* Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor- β receptor I and II (TGF- β RI and II) function in epidermal keratinocytes. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 26, n. 8, p. 697–704, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/exd.13260>

MAAZ, Muhammad *et al.* Polymer-based biomaterials for chronic wound management: Promises and challenges. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 598, n. January, p. 120270, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120270>

MAYMONE, M B C *et al.* Leprosy: Treatment and management of complications. **Journal of American Dermatology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 17–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.10.138>

MENDOZA-MARÍ, Yssel *et al.* Epidermal growth factor effect on lipopolysaccharide-induced inflammation in fibroblasts derived from diabetic foot ulcer. **Scars, Burns & Healing**, [s. l.], v. 8, p. 205951312110673, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/20595131211067380>

MI, Zihao; LIU, Hong; ZHANG, Furen. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. April, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00567>

MINUTTI, Carlos M. *et al.* Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 61, p. 3–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>

MOJSOSKA, Biljana. Immunomodulatory Properties of Host Defence Peptides in Skin Wound Healing. **Biomolecules**, [s. l.], 2021.

MONTEIRO LD, ALENCAR CHM DE, BARBOSA JC, BRAGA KP, CASTRO MD DE,

Heukelbach J. Incapacidades físicas em pessoas acometidas pela hanseníase no período pós-alta da poliquimioterapia em um município no Norte do Brasil Physical disabilities in leprosy patients after discharge from multidrug therapy in Northern Brazil Incapacidades físic. **Cad. Saúde Pública**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 909–920, 2013.

MORGNER, Bianka *et al.* Effect of a DACC-coated dressing on keratinocytes and fibroblasts in wound healing using an in vitro scratch model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2022)**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10856-022-06648-5>

MORTON LM, A AND PHILLIPS, TJ. Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. **Journal of American Dermatology**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 589–605, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2015.08.068>

NASCIMENTO, Danielle Cristina De Oliveira *et al.* Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria monocytogenes*. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 745–753, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.03.012>

NATALLYA F R, HERWANTO N, PRAKOESWA C R, INDRAMAYA D M, Rantam F A. Effective healing of leprosy chronic plantar ulcers by application of human amniotic membrane stem cell secretome gel. **Indian J Dermatol**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 250, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_6_17

NORDIN, Abid *et al.* Honey and epithelial to mesenchymal transition in wound healing: An evidence-based review. **Wound Medicine**, [s. l.], v. 18, p. 8–20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2017.06.003>

NOVAK, Margaret L.; KOH, Timothy J. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. **American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 183, n. 5, p. 1352–1363, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.034>

NUNES, MARILIA DE OLIVEIRA; SOUZA, Tamiris de Fatima Goebel; *et al.* In vitro biocompatibility and wound healing properties of latex proteins dressing. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 76, n. May, p. 0887–2333, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105230>

OLIVEIRA, P B *et al.* Use of *Calotropis procera* cysteine peptidases (CpCPs) immobilized on glyoxyl-agarose for cheesemaking. [s. l.], v. 403, n. May 2022, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134319>

OLIVEIRA PERRUCINI, PRISCILA DANIELE PT, PHD; POLI-FREDERICO, REGINA CÉLIA PHD; DE ALMEIDA PIRES-OLIVEIRA, DEISE APARECIDA PT, PHD; DRAGONETTI BERTIN, LARISSA PT, MSC; BELTRÃO PIRES, FLAVIA PT, MSC; SHIMOYA-BITTENCOURT, WALKIRIA PT, PHD; MARTINS SANTOS, Rodrigo PhD. Anti-Inflammatory and Healing Effects of Pulsed Ultrasound Therapy on Fibroblasts. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, [s. l.], p. 19–25, 2020. Disponível em: https://journals.lww.com/ajpmr/abstract/2020/01000/anti_inflammatory_and_healing_effects_of_pulsed.4.aspx

ONG, Huan Ting; DILLEY, Rodney J. Novel non-angiogenic role for mesenchymal stem cell-derived vascular endothelial growth factor on keratinocytes during wound healing. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 44, n. November, p. 69–79, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.11.002>

PASTAR, Irena *et al.* Cellular reprogramming of diabetic foot ulcer fibroblasts triggers pro-healing miRNA-mediated epigenetic signature. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1065–1072, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/exd.14405>

PICONE, Pasquale *et al.* Biocompatibility, hemocompatibility and antimicrobial properties of xyloglucan-based hydrogel film for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 784–795, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.078>

PINTO, Pablo *et al.* Leprosy piRnome : exploring new possibilities for an old disease. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69355-7>

PLOEMACHER, Thomas *et al.* Reservoirs and transmission routes of leprosy ; A systematic review. **Plos neglected tropical diseases**, [s. l.], p. 1–27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008276>

RAMOS, MÁRCIO V.; FREITAS, LARISSA B.N.; BEZERRA, EMANUEL A.; MORAIS, FRANCIMAURO S.; LIMA, JOÃO P.M.S.; SOUZA, PEDRO F.N.; CARVALHO, CRISTINA P.S.; FREITAS, Cleverson D.T. Structural Analysis Revealed the Interaction of Cardenolides from *Calotropis procera* with Na⁺/K⁺ ATPases from Herbivores. **Protein and Peptide Letters**, [s. l.], v. 29, p. 89-101(13), 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/0929866528666211207111011>

RAMOS, Márcio Viana *et al.* Plant latex and latex-borne defense. **Advances in Botanical Research**, [s. l.], v. 93, p. 1–25, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2019.09.002>

RAMOS, Márcio V. *et al.* Involvement of NO in the inhibitory effect of *Calotropis procera* latex protein fractions on leukocyte rolling, adhesion and infiltration in rat peritonitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 387–392, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.07.030>

RAMOS, Márcio V. *et al.* Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1238-2>

RANGEL, GISELE F. P.; RAMOS, MÁRCIO V.; DO CARMO, LUANA D.; RABELO, LIVIANE M. A.; SILVA, ALFREDO A. V.; DE SOUSA, TAMIRIS F. G.; LIMA JÚNIOR, ROBERTO C. P.; WONG, DEYSI V. T.; LEITÃO, RENATA F. C.; MAGALHÃES, PEDRO J. C.; SOUSA, BRANDON F.; FREDERICO, MA, Nylane M. N. Successful Pre-Clinical Management of Irinotecan-Debilitated Animals: A Protein- Based Accessory Phytomedicine. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 18, p.

3163-3171(9), 2022. Disponível em:
<https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1871520622666220610115617>

RAZIYEVA, Kamila *et al.* Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. **Biomolecules**, [s. l.], p. 1–25, 2021.

REBECA PINHEIRO SILVESTRE ROCHA. **Uso de biomembrana com proteínas vegetais no tratamento de úlceras do pé diabético**. 2021. - Universidade Federal do Ceará (UFC), [s. l.], 2021.

Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 3.125, de 07 de outubro de 2010. **Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase**. Diário Oficial da União, [Internet] 15 out 2010 [acesso em 20 jun 2015]. Disponível: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt3125_07_10_2010.html

SAÚDE, Ministério da. **Guia de vigilância em saúde**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_4ed.pdf

SAÚDE, Organização Mundial da. Rumo à zero hanseníase -Estratégia Global de Hanseníase 2021 - 2030. [s. l.], p. 1–30, 2021.

SCOTT BEELER, J. *et al.* P73 regulates epidermal wound healing and induced keratinocyte programming. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1–28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218458>

SERRANO, M. C. *et al.* In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. **Biomaterials**, [s. l.], v. 25, n. 25, p. 5603–5611, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.037>

SILVA, Ayrles F B *et al.* Erythrocytes morphology and hemorheology in severe bacterial infection. **Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 114, n. 11, p. 1–8, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760190326>

SKEHAN, P. *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

SOLIMAN, Amro M.; BARREDA, Daniel R. Acute Inflammation in Tissue Healing. **International Journal of Molecular Sciences Review**, [s. l.], 2023.

SOUSA, Brandon Ferraz *et al.* Latex proteins downregulate inflammation and restores blood-coagulation homeostasis in acute Salmonella infection. **Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 115, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200458>

SOUZA, Tamiris De Fátima Goebel De. **Efeito cicatrizante da fração metanólica das folhas de Sideroxylon obtusifolium: estudo in vitro e em queimaduras superficiais em camundongos**. 2019. [s. l.], 2019.

SUMMA, Maria *et al.* A biocompatible sodium alginate/povidone iodine film enhances wound healing. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v.

122, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.004>

SUZUKI, Daisuke; SENOO, Makoto. Letter to the Editor Expansion of epidermal progenitors with high p63 phosphorylation during wound healing of mouse epidermis. **Experimental Dermatology**, [s. l.], n. 6, p. 374–376, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/exd.12139>

TANG, Fengling *et al.* Bioactive glass promotes the barrier functional behaviors of keratinocytes and improves the Re-epithelialization in wound healing in diabetic rats. **Bioactive Materials**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 3496–3506, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.041>

TULAIN MARIA, Qura; YASIN, Dr. Tahir; ASIF RAHEEM, Muhammad. Comprehensive Exploration of the Pharmacological Importance of Calotropis (AKK) Species: A Review. **Irish Interdisciplinary Journal of Science & Research**, [s. l.], v. 08, n. 01, p. 49–65, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.46759/ijjsr.2024.8106>

UPPUTURI B, SRIKANTAM A, Mamidi RS. Comorbidities associated with non- healing of plantar ulcers in leprosy patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008393>

VAN DE VELDE, Franco *et al.* Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. **Food Research International**, [s. l.], v. 121, p. 453–462, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.059>

WADHWANI, Barkha Darra. A review on phytochemical constituents and pharmacological potential of Calotropis procera. **Royal Society of Chemistry**, [s. l.], p. 35854–35878, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d1ra06703f>

WOUNDS, Diabetic Skin; BIOMEMBRANE, Natural Latex. Originales Management of Diabetic Skin Wounds with a Natural Latex Biomembrane. [s. l.], v. 32, 2004.

XU, Mingyuan *et al.* Phagocytosis of apoptotic endothelial cells reprograms macrophages in skin wounds. **Journal of Immunology and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 12, n. January, p. 100038, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.regen.2021.100038>

Y-SCHWARTZMAN, Ulises Prieto *et al.* Tratamento da úlcera plantar devido à hanseníase. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 497–503, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/2177-1235.2019RBCP0229>

YANG, Hsin-ling *et al.* Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B Signaling Pathways. **BBA - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1864, p. 151–168, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.021>

YANG, Hsin Ling *et al.* Lucidone Promotes the Cutaneous Wound Healing Process via Activation of the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin and NF- κ B Signaling Pathways. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1864, n. 1, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.021>

YANG, Yang *et al.* FOXM1 accelerates wound healing in diabetic foot ulcer by inducing M2 macrophage polarization through a mechanism involving SEMA3C/NRP2/Hedgehog signaling. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 184, 2022. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109121>

9 APÊNDICES

APÊNDICE 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 (sufadiazina 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: _____

APÊNDICE 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 () **b**) 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: _____

APÊNDICE 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 20__.

Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

Sujeito da Pesquisa

APÊNDICE 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:

Tratamento com a BioMemCpLP



Tratamento com Hidrocolóide



Tratamento com Sulfadiazina de prata

Antes do tratamento

4 semanas

8 semanas

