SILVANA CEREIJIDO ALTRAN

**Efeitos *in vitro* da radiação infravermelha longa em fibroblastos humanos
oriundos do leito de feridas crônicas de etiologia venosa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

São Paulo
2018

SILVANA CEREIJIDO ALTRAN

**Efeitos *in vitro* da radiação infravermelha longa em fibroblastos humanos
oriundos do leito de feridas crônicas de etiologia venosa**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Cesar Isaac

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Altran, Silvana Cereijido
Efeitos in vitro da radiação infravermelha longa
em fibroblastos humanos oriundos do leito de
feridas crônicas de etiologia venosa / Silvana
Cereijido Altran. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Cesar Isaac.

Descritores: 1.Fibroblastos 2.Úlcera varicosa
3.Prata 4.Raios infravermelhos 5.Radiação
infravermelha longa 6.Cicatrização

USP/FM/DBD-489/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho à memória daqueles que pavimentaram todos os caminhos que me trouxeram até aqui. Aos meus pais: Celia Cereijido Altran e Oswaldo Altran Martins, meu eterno amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Cesar Isaac, pela orientação e ajuda; pela paciência e compreensão nos meus diversos momentos de “*stress*” e pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

À Dra Débora Levy e à Dra Walcy Rosolia Teodoro, pela acolhida, pela solicitude de sempre e pela preciosa ajuda para a realização deste trabalho. Agradeço também, aos demais colaboradores do LIM 31 e do LIM 17, sempre dispostos a ajudar.

À Divisão de Cirurgia Plástica e Queimaduras do Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo, especialmente na pessoa de Dr. Rolf Gemperli por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

À Rhodia Poliamida e especialidades, nas pessoas de Américo Luvizotto, Gabriel Gorescu e Tarcis Bastos, pela coordenação e apoio técnico na execução deste trabalho.

Ao LIM 04, nas pessoas de Bruno Valério do Rosário, Edna Maria Rodrigues dos Santos, Roqueline Alves Lago, Silvana Aparecida Biagioni, pela convivência diária e pelo apoio.

À Maria Aurora Gomes da Silva e Maria de Fátima Almeida pelo apoio constante.

Aos funcionários do LIM 50 pela disponibilidade de equipamentos e de atenção

À Eliane Falconi Monico Gazetto, pela competência e pelo carinho dedicado aos alunos da pós-graduação.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação Mario Mucio Maia de Medeiros, pelo apoio e companheirismo e à Dra Júlia Teixeira Nicolosi, por ter me aturado pacientemente nesses 4 últimos anos, compartilhando tarefas, responsabilidades e ensinamentos. Julia, sua contribuição foi preciosa.

Ao Dr André Oliveira Paggiaro e demais funcionários do Banco de Tecidos: Catarina Mariza Viale, Eugênio Polo, Izabel Lopes Exposito, Margareth Stuzeneker Sampaio Ribeiro e Mariana Parra Bianchi por estarem sempre dispostos a ajudar. Peço licença aqui para me dirigir particularmente a Renata Oliveira da Conceição, pela valiosa amizade compartilhada durante todos esses anos. “Re”, a jornada não foi fácil. Por muitas vezes suas palavras e atitudes ajudaram mais do que você imagina. Muito obrigada.

Aos meus irmãos: Simone, Sandra e José pelo apoio incondicional e constante preocupação com meu bem-estar

Aos meus amores, sobrinhos queridos: Bruno, Rafael, Victor e Karine. Sem vocês a vida não teria a mesma graça.

À “Nezinha”, pela atenção e carinho dedicados à minha família, da qual também faz parte.

Aos meus tios e primos, pela torcida e incentivo

Às irmãs de coração: Carol e Marília, que me acompanham, literalmente, desde os primeiros passos. Com elas compartilhei toda infância, adolescência e vida escolar, da pré-escola à faculdade. Meninas, não imagino como teria sido minha caminhada até aqui sem vocês ao meu lado.

À equipe médica e à equipe de enfermagem do ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo, pela coleta das amostras e prontidão para ajudar.

Aos doadores de amostras biológicas para pesquisa, itens fundamentais para realização deste trabalho

“A persistência é o caminho para o êxito”

Charles Chaplin

Este trabalho teve apoio financeiro CNPQ
projeto: 45247/2013-3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Revisão da classificação CEAP para desordens venosas crônicas	36
Tabela 2 - Classificação CIE para radiação infravermelha.....	43
Tabela 3 - Padrão ISO 20473 para subdivisão de IR	43
Tabela 4 - Redução de carga bacteriana após 24 h de exposição aos diferentes substratos Resultados expressos em %.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características ideais de curativos utilizados no tratamento de úlcera venosa.....	39
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema “hipótese de armadilha” proposta por Falanga et al ¹¹	2
Figura 2 - Esquema “hipótese de fibrina pericapilar” proposta por Browse e Burnard ¹²	2
Figura 3 - Esquema “hipótese de aprisionamento de células brancas”, proposta por Coleridge et al ¹³	3
Figura 4 – Anatomia normal e alterada dos membros inferiores ^{9,10}	10
Figura 5 - Sequência estrutural mínima de uma MMP ⁷⁵	22
Figura 6 - Foto de úlcera de etiologia venosa em terço distal de membro inferior esquerdo de paciente em tratamento no ambulatório de feridas da Divisão de Cirurgia Plástica HCFMUSP	35
Figura 7 -Imagens fotográficas do processamento dos fragmentos de pele realizado em cabine de segurança biológica.....	52
Figura 8 - Aspecto macroscópico das ataduras que deram origem às amostras de 6 mm de diâmetro utilizadas nesse trabalho	54
Figura 9 - Microfotografia da superfície de amostras das ataduras (a) So, (b) Ag, (c) FIR e (d) FIR+Ag. Aumento 1400 x.(MEV).....	54
Figura 10 -Fluxograma dos ensaios preliminares realizados no estudo.....	55
Figura 11 - .Imagem representativa (a) fibroblastos de pele normal (NHF) e (b) fibroblastos de úlcera venosa (VUF), aumento 100X	62
Figura 12 - Imagem representativa de fluorescência da sinalização para: (a) vimentina, (b) colágeno tipo I e (c) colágeno tipo III pelos VUFs após 72 h de cultivo em meio padrão (D ₁₀).....	63
Figura 13 - Curva de duplicação celular em relação ao tempo para NHFs	64

Figura 14 - Curva de duplicação celular em relação ao tempo para VUFs	64
Figura 15 - Viabilidade de NHFs expostos aos substratos Ag, FIR e FIR+Ag em comparação ao controle (So) ao longo de 24, 48, 72 e 96 h. Valores expressos em absorbância (Abs)	65
Figura 16 - Viabilidade de VUFs expostos aos substratos Ag, FIR e FIR+Ag em comparação ao controle (So) ao longo de 24, 48, 72 e 96 h. Valores expressos em absorbância (Abs)	66
Figura 17 - Avaliação da expressão de vimentina frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (Co), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p= 0,0018$)	68
Figura 18 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p= 0.197$)	69
Figura 19 - Avaliação da expressão de colágeno tipo III frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p= 0,337$)	70
Figura 20 - Avaliação da expressão de iNOS frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p=0,002$)	71
Figura 21 - Avaliação da expressão de VEGF frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p = 0,451$).....	72
Figura 22 - Expressão de TGF- β 1,2 e 3, por VUFs expostos aos substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag) durante 7 dias. Resultados expressos em ppm	73

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
et al	e outros
ex	exemplo
Fig	figura
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiela pneumoniae</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. aureus</i> (MRSA)	<i>Staphylococcus aureus</i> (resistente à Meticilina)
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

LISTA DE SIGLAS

ADP	Difosfato de Adenosina (<i>Adenosine Diphosphate</i>)
aFGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos ácido (<i>acid Fibroblasts Growth Factor</i>)
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de Cultura (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Trifosfato de Adenosina (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
bFGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (<i>basic Fibroblasts Growth Factor</i>)
BH ₄	Tetraidrobiopterina
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
C2C12	Linhagem celular de mioblastos murinos
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
Cam	calmodulina
CCO	Citocromo C Oxidase (<i>Cytochrome C Oxidase</i>)
CEAP	Clínica, Etiológica, Anatômica e Fisiopatológica (<i>Clinical, Etiologic, Anatomic and Pathophysiologic</i>)
CEP	Comissão de ética e Pesquisa
cFIR	cerâmicas emissoras de FIR
cGMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina (<i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i>)
CIE	Comissão Internacional de Iluminação (<i>International Commission On Illumination</i>)
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva (<i>Constitutive Nitric Oxide Synthase</i>)

CONEP	Comissão Nacional de Ética e Pesquisa
D ₁₀	Meio de cultura constituído por: 90% de DMEM, acrescido de 10% de SBF com 1% de antibióticos e antifúngico (estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) e 1% de glutamina
DMEM	Meio de Dulbecco Modificado por Eagle (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil Sulfóxido (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DPBS	Salina Fosfato -Tamponada de Dulbecco (<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>)
EDRF	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
EGF	Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>)
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
EPCs	Células endoteliais progenitoras (<i>Endothelial progenitor cells</i>)
ERK	Quinase Regulada por Sinalização Extracelular (<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>)
[¹⁸ F]-FDG	Fluorodesoxiglucose
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo (Flavine-Adenine-Dinucleotide)
FDA	órgão americano de Administração de alimentos e medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FADH ₂	Dinucleotídeo de Flavina e Adenina (<i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>) forma reduzida
FGF	Fator de Crescimento para Fibroblastos (<i>Fibroblasts Growth Factor</i>)

FIR	Radiação Infravermelha Longa (<i>Far Infrared Radiation</i>)
FMN	Flavina Mononucleotídeo (<i>Flavine Mononucleotide</i>)
GTP	Trifosfato de Guanosina (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
H ₄ B	Tetrahidrobiopterina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HEXHXXGXXH	sequência de aminoácidos onde, H (histidina), X (aminoácido qualquer), G (glicina)
HIF	Fator Induzível por Hipóxia (<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>)
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clícas
IFN	Interferon
IGF	Fator de Crescimento semelhante a Insulina (<i>Insuline Growth Factor</i>)
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
ISO	Organização Internacional para Padronização (<i>International Organization for Standardization</i>)
IVC	Insuficiência Venosa Crônica
KGF	Fator de Crescimento para Queratinócitos (<i>Keratinocytes Growth Factor</i>)
LASER	Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação (<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>)
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LLLT	Terapia Laser de Baixa Intensidade (<i>Low-Intensity Laser Therapy</i>)
L-NA	N ^G -nitrol-arginina
L-NAA	N ^G - amino-L-arginina
L-Name	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster

L-NIO	N-imino-etil-L-ornitina
LNMMMA	N ^G -Monometil-L-Arginina
LPS	Lipopolissacarídeo
MC3T3-E1	Linhagem de células semelhantes a osteoblastos derivadas de calvária murina
MCF-7	Linhagem de células humanas de câncer de mama
MCP-1	Proteína 1 Químioatrativa para Monócitos (<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>)
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIR	Radiação Infravermelha Média (<i>Middle Infrared Radiation</i>)
MMP	Metaloproteinases de Matriz (<i>Matrix Metalloproteinases</i>)
mtNOS	Óxido Nítrico Sintase Mitocondrial (<i>Mitochondrial NO Synthase</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5 dimetil- 2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i>)
NADH	Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>) em sua forma reduzida
NADPH	Nicotinamida- Adenina- Dinucleotídeo Fosfato (<i>Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate</i>)
NF-κB	Fator Nuclear kappa B (<i>Nuclear Factor Kappa B</i>)
NIH3T3	Linhagem de fibroblastos de embrião de camundongo
NHF	Fibroblastos Humanos normais (<i>Normal Human Fibroblasts</i>)
NIR	Radiação Infravermelha Curta (<i>Near Infrared Radiation</i>)
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal (<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>)
NOS	Óxido Nítrico Sintase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
PBM	Fotobiomodulação (<i>Photobiomodulation</i>)

PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PET	Tomografia por Emissão de Póstron (<i>Positron Emission Tomography</i>)
PGE2	prostaglandina
PMN	polimorfonucleares
ppm	parte por milhão
PRCGVPD	sequência de aminoácidos onde, P (prolina), R (arginina), C (cisteína), G (glicina), V (valina), D (ácido aspártico)
RANTES	Secretada e Regulada pela Ativação de Linfócitos T Normais (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted)
RAW 264.7	Linhagem de Macrófagos Murinos
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SW1353	Linhagem celular de condrosarcoma humano
TGF- β	Fator Beta Transformador do Crescimento (<i>Transforming Growth Factor</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>)
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VUFs	Fibroblastos de Úlcera Venosa (<i>Venous Ulcer Fibroblasts</i>)
TIMPs	Inibidores Tissulares de Metaloproteinases (<i>Tissue InhibitorMetalloproteinases</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag^+	Íon de prata
Ca^{2+}	Cálcio
cm^2	centímetro quadrado
CO_2	dióxido de Carbono
Cu_A	Cobre A
Cu_B	Cobre B
H^+	cátion de Hidrogênio (próton)
H_2O_2	peróxido de Hidrogênio
$\text{HO}^\bullet$	radical hidroxila
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
μm	micrômetro
$\mu\text{m/L}$	micromoles por litro
mmHg	milímetros de mercúrio
Mw	Megawatt
nm	nanômetro
nmol/L	nanomoles por litro
O_2	Oxigênio
$\text{O}_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
ONOO^-	peroxinitrito
NO	Óxido nítrico
THz	Terahertz

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

Resumos

Astract

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO	7
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	8
3.1	Úlcera Venosa.....	8
3.1.1	Definição.....	8
3.1.2	Prevalência e Fatores de Risco	8
3.1.3	Hipóteses para o desenvolvimento da úlcera	9
3.1.3.1	Hipótese de “cuffs” de fibrina – (Browse e Burnard)	10
3.1.3.2	Hipótese de aprisionamento de células brancas (Coleridge et al).....	11
3.1.3.3	Hipótese da “armadilha” (Falanga et al).....	11
3.2	Processo de cura de úlcera venosa	12
3.2.1	Cicatrização Fisiológica	12
3.2.1.1	Fase inflamatória.....	12

3.2.1.2	Fase proliferativa.....	14
3.2.1.3	Fase remodelação:	16
3.2.2	Reparação crônica.....	17
3.2.2.1	Tecido necrótico, esfacelo e escaras	17
3.2.2.2	Infecção.....	17
3.2.2.3	Quantidade excessiva de células inflamatórias.....	19
3.2.2.4	Fibroblastos senescentes.....	19
3.2.2.5	Desequilíbrio entre síntese de MMPs e TIMPs	21
3.2.2.6	Metabolismo de colágeno	24
3.2.2.7	Hipóxia	25
3.2.2.8	Citocinas e fatores de crescimento	25
3.2.3	Óxido nítrico.....	28
3.2.3.1	Hemostasia e inflamação	31
3.2.3.2	Angiogênese	31
3.2.3.3	Proliferação	32
3.2.3.4	Epitelização.....	32
3.2.3.5	Deposição de matriz e remodelação	33
3.2.4	Apresentação clínica	34
3.2.5	Classificação CEAP	35
3.2.6	Diagnóstico	37
3.2.7	Tratamento	37
3.2.7.1	Tratamento Conservador	37

3.2.7.2	Curativos e Coberturas	38
3.2.7.2.1	Curativos contendo Prata.....	40
3.2.7.3	Tratamento Cirúrgico	42
3.2.7.4	Tratamentos Inovadores	42
3.2.8	Efeito da radiação infravermelha na cicatrização	42
4	MÉTODO	50
4.1	Tipo de Estudo	50
4.2	Procedimentos éticos	50
4.3	Local do estudo	51
4.4	População e coleta das amostras	51
4.5	Padronização do Cultivo de Fibroblastos de Pele Normal (NHF- <i>normal human fibroblasts</i>) e de Úlcera Venosa (VUF – <i>venous ulcer fibroblasts</i>)	52
4.6	Substratos têxteis utilizados no estudo e identificação dos grupos.....	53
4.7	Testes preliminares	55
4.7.1	Caracterização por imunofluorescência indireta (ifi) – vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III	55
4.7.2	Ensaio de tempo de duplicação celular (<i>doubling time</i>) de fibroblastos oriundos de pele normal (NHF) e úlcera venosa (VUF).....	57
4.7.3	Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT	57
4.8	Imunofluorescência Indireta para vimentina colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF.....	58
4.9	Ensaio Multiplex	59
4.10	Testes Microbiológicos.....	60
4.11	Análises estatísticas	61

5	RESULTADOS	62
5.1	Morfologia Celular	62
5.2	Caracterização por imunofluorescência indireta – vimentina, colágeno do tipo I e colágeno do tipo III	63
5.3	Ensaio de tempo de duplicação celular (<i>doubling time</i>) de fibroblastos oriundos de pele normal (NHF) e de úlcera venosa (VUF)	64
5.4	MTT – Viabilidade e Citotoxicidade	65
5.5	Imunofluorescência indireta para vimentina, colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF	66
5.5.1	Vimentina.....	66
5.5.2	Colágeno tipo I.....	67
5.5.3	Colágeno tipo III.....	67
5.5.4	iNOS	67
5.5.5	VEGF	67
5.6	Ensaio Multiplex	73
5.7	Testes microbiológico.....	74
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÃO	85
8	ANEXOS.....	86
8.1	Anexo A – Aprovação CONEP/CEP.....	86
8.2	Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes submetidas a mastoplastia.....	88
8.3	Anexo C - Termo de Cnsentimento Livre e Esclarecido para paciente submetido ao tratamento de úlcera venosa	91

9	REFERÊNCIAS	94
---	-------------------	----

Apêndice

RESUMO

Altran SC, Efeitos *in vitro* da radiação infravermelha longa em fibroblastos humanos oriundos do leito de feridas crônicas de etiologia venosa.[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Úlceras decorrentes de disfunções venosas são comuns na prática clínica. Fatores como hipóxia, infecção, acúmulo de fibroblastos senescentes, metabolismo anormal de colágeno e desequilíbrio entre produção e absorção de matriz extracelular contribuem para a cronicidade dessas lesões. Até o momento, não existe tratamento ideal para essas úlceras. A radiação infravermelha longa (FIR) tem sido proposta como opção. Diversos estudos descrevem efeitos antimicrobiano e anti-inflamatório, melhora na circulação sanguínea, regeneração de colágeno, aumento na proliferação de fibroblastos e expressão de TGF- β , e aumento da síntese de óxido nítrico (NO), que tem papel importante em todas as fases da cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar, por imunoenaios, a ação de substratos têxteis emissores de radiação infravermelha longa (FIR), em associação ou não à prata (FIR+Ag), sobre cultura de fibroblastos oriundos de úlcera venosa (*venous ulcer fibroblasts* VUFs) quanto a citotoxicidade, expressão de vimentina, colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF, além do potencial antimicrobiano sobre cepas de bactérias frequentemente encontradas no leito de úlceras venosas. Ao que parece, o aditivo FIR sozinho, ou em combinação com prata, não exerceu efeito citotóxico sobre fibroblastos humanos (VUF). Houve aumento na expressão de vimentina em relação ao controle em todos os estímulos avaliados. Também foi observado aumento da expressão de iNOS estimulado pela prata. Não ocorreu aumento da expressão de VEGF e colágeno do tipo I e tipo do III. O efeito antimicrobiano de FIR foi comparável ao efeito classicamente descrito para a utilização de prata. Assim, acreditamos que o emprego de produtos têxteis emissores de FIR como curativos seja uma possível opção para o tratamento de úlceras venosas.

Descritores: fibroblastos; úlcera varicosa; prata; raios infravermelhos; radiação infravermelha longa; cicatrização.

ABSTRACT

Altran SC, *In vitro* effects of Far Infrared Radiation on human venous ulcer fibroblasts.[Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Ulcers resulting from venous dysfunctions are common in clinical practice. Factors such as hypoxia, infection, accumulation of senescent fibroblasts, abnormal collagen metabolism and imbalance between production and absorption of extracellular matrix contribute to the chronicity of these sores. There is no ideal treatment for those ulcers. Far Infrared Radiation (FIR) has been proposed as a treatment option. Several studies describe antimicrobial and anti-inflammatory effects, improvement in blood circulation, regeneration of collagen, increased proliferation of skin fibroblasts, higher expression of TGF- β and increased synthesis of nitric oxide (NO), which plays an important role in all phases of the wound healing process. The aim of this study was to evaluate the action of textile emitting FIR substrates, whether containing silver or not (FIR+Ag), on the culture of venous ulcer fibroblasts (VUFs) regarding to: cytotoxicity, vimentin, types I and III collagen, iNOS and VEGF expression as well as the antimicrobial potential on strains of bacteria frequently found in venous ulcers. Our results proved that FIR additives alone, or in combination with silver, did not exert a cytotoxic effect on human fibroblasts (VUF). There was an increase in vimentin expression in relation to the control in all evaluated stimuli. Increased stimulation of iNOS expression by silver was observed. No increase in the expression of VEGF and nor collagen types I and III was observed. An antimicrobial effect of FIR comparable to the effect classically described for the use of silver has been verified. Thus, we believe that the use of FIR-emitting textile products as curatives is a possible option for the treatment of venous ulcers.

Descriptors: fibroblasts; varicose ulcer; silver; infrared rays; far infrared rays; healing.

1 INTRODUÇÃO

Ferida cutânea é definida como: dano à estrutura anatomofuncional da pele que pode ter extensão variável, desde simples quebra de integridade epitelial até comprometimento de tecidos adjacentes, como subcutâneo, tendões, músculos, vasos, nervos, órgãos parenquimatosos ou até mesmo ossos¹.

O processo de cicatrização dessas feridas em condições fisiológicas, ocorre de maneira ordenada e eficiente, alcançando como resultado final, em um período de até 30 dias, a restauração funcional e anatômica do tecido danificado^{1,2}. Em condições patológicas, úlceras crônicas não seguem os estágios normais da cicatrização dentro do período esperado, desenvolvendo processo incompleto e com prolongamento de uma ou mais das etapas, fazendo com que essa úlcera ainda permaneça aberta após 3 meses ou mais^{1,3}.

Apesar da etiologia variada e frequentemente, multifatorial, a literatura descreve que 70-90% das feridas crônicas estão associadas à insuficiência venosa crônica (IVC) e representam a forma de manifestação mais grave e debilitante dessa enfermidade, causando incapacidade e dor significativa ao paciente afetado e acarretando despesas diárias e recorrentes para seu tratamento, que geralmente é prolongado^{4,5,6}. Estima-se que 5-8% da população mundial apresente distúrbios venosos que afetam os membros inferiores e que cerca de 1% possa desenvolver úlcera venosa, que pode ser primária (desenvolvimento espontâneo em consequência à hipertensão venosa) ou, menos frequentemente, secundária a uma causa subjacente identificável (como trombose venosa profunda ou trauma)^{7,8}.

O mecanismo exato pelo qual a hipertensão venosa leva ao surgimento da úlcera não está bem esclarecido^{9,10}. Algumas hipóteses propõem que formação de *cuffs* de fibrina pericapilar possa aprisionar fatores de crescimento¹¹ (Figura 1) e bloquear a passagem de oxigênio e nutrientes¹² (Figura 2), tornando-os indisponíveis para o reparo e que, a ativação e

aprisionamento de leucócitos na microcirculação acarrete o aumento de liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros produtos tóxicos (ex elastase e collagenase) que danificam o tecido circundante¹³ (Figura 3).

FONTE: Borges LE, 2011¹⁴. Adaptado.

Figura 1 - Esquema “hipótese de armadilha” proposta por Falanga et al¹¹

FONTE: Borges LE, 2011¹⁴. Adaptado.

Figura 2 - Esquema “hipótese de fibrina pericapilar” proposta por Browse e Burnard¹²

FONTE: Borges LE, 2011¹⁴. Adaptado.

Figura 3 - Esquema “hipótese de aprisionamento de células brancas”, proposta por Coleridge et al¹³

Os fatores bioquímicos que sustentam a cronicidade da úlcera venosa também não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que entre eles estão: hipóxia do tecido, necrose¹, infiltração excessiva de neutrófilos associada com liberação de ROS e enzimas destrutivas², acúmulo de fibroblastos senescentes¹⁵, metabolismo anormal de colágeno¹⁶, desequilíbrio entre produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) e os inibidores tissulares dessas metaloproteinases (TIMPs)^{17,18}, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)^{18,19,20} e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias: Fator de crescimento epidermal (EGF), Fator Básico de Crescimento para Fibroblastos (bFGF), Fator Beta Transformador do Crescimento (TGF- β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)^{21,22}.

Procedimentos terapêuticos para úlceras venosas incluem medidas adjuvantes, tratamento local clínico e/ou cirúrgico²³. Entre as opções clínicas, diversos tipos de curativos podem ser utilizados. Porém, apesar de uma ampla diversidade de curativos estar disponível no mercado, não existe um único curativo que seja considerado ideal para todas as feridas.

Assim, a melhor escolha deve levar em conta a capacidade do curativo em promover e manter um ambiente favorável à cicatrização^{24,25}.

Para incrementar a recuperação da insuficiência circulatória, a comunidade médica tem proposto terapias adjuvantes que incluem oxigenação hiperbárica, laser de baixa energia ou terapias utilizando radiação infravermelha longa (em inglês: *Far Infrared Radiation*- FIR)²⁶, que pode ser entregue por meio de duas modalidades distintas. A primeira (lâmpadas, saunas e geradores) é mantida por eletricidade e tem capacidade de aquecer os tecidos sobre os quais atua. A segunda consiste de cerâmicas emissoras de FIR (cFIR), que quando reduzidas a micro ou nanopartículas, podem ser incorporadas a fios que dão origem a tecidos e vestimentas com finalidade terapêutica, sem causar aquecimento^{27,28}. Assim, acredita-se que FIR induza tanto efeitos térmicos como não térmicos sobre os tecidos, incluindo ações analgésicas e anti-inflamatórias²⁹, aumento da dilatação microvascular, maior volume do fluxo vascular^{30,31}, aceleração da circulação sanguínea nos tecidos periféricos que contribui na transferência de mensageiros químicos, elevação da mobilidade dos fluídos corpóreos devido à diminuição dos aglomerados de água³², entre outros.

Estudos científicos pregam que FIR possa promover efeitos intracelulares, acelerando o processo de cicatrização de feridas pelo aumento da imunidade pela potencialização de ação dos neutrófilos, aumentando proliferação de fibroblastos³⁰ e maior infiltração de fibroblastos produtores de colágeno nas feridas³³, uma contribuição significativa, uma vez que a produção e remodelação dessa proteína são altamente prejudicadas no ambiente da úlcera venosa caracterizado por: hipóxia^{16,34}, ambiente altamente proteolítico responsável pela degradação de componentes da matriz, fatores de crescimento e seus receptores e acúmulo de fibroblastos senescentes, que por serem incapazes de responder adequadamente aos estímulos do meio, têm suas funções prejudicadas¹⁵.

Outra contribuição importante da FIR para a cicatrização de ferida é sua capacidade de induzir o aumento da síntese de óxido nítrico (NO)²⁶ que na fase inflamatória da cicatrização, auxilia na eliminação de patógenos, além de atuar na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular³⁵.

Concomitantemente, na fase proliferativa, ocorre formação de novos vasos a partir daqueles já existentes. Os principais agentes responsáveis por essa angiogênese são: bFGF, TGF- β e VEGF, sendo este considerado o fator angiogênico mais mais potente^{2,35}. O VEGF exibe um padrão de expressão recíproco com o NO, de quem depende para desempenhar muitas de suas funções angiogênicas, como estímulo da migração, diminuição da adesão e organização das células endoteliais^{35,36}.

Graças a múltipla ação de FIR, vestimentas confeccionadas com fios contendo cerâmicas emissoras de FIR (cFIR) já têm sido utilizadas, com bons resultados, para propósitos não médicos. Em 2010, a utilização de fio de polímiada incorporado com cFIR, patenteado (WO 2009/077834 A2) pela Rhodia Poliamida e Especialidades SA, sob o nome comercial Emaná, foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A partir de então, calças, bermudas e roupas íntimas confeccionadas com esse fio têm sido utilizadas e se mostrado eficazes na melhora da circulação, redução de medidas, combate a celulite, redução de dor e fadiga muscular e prevenção de câibras^{37,38}.

Quanto ao controle bacteriano, é consagrado, na literatura que íons e compostos contendo prata têm atividade antimicrobiana de amplo espectro decorrentes de mecanismos como bloqueio das vias enzimáticas de respiração e alteração do DNA e da parede celular microbiana^{24,39}.

Rigo et al⁴⁰ demonstraram que nanopartículas de prata alteram a funcionalidade mitocondrial de fibroblastos humanos, mas isso não parece induzir à morte celular. Apesar da atividade metabólica reduzida, os autores observaram que células permaneceram viáveis, sem sinais de apoptose. Estudo *in vivo* em que os mesmos autores utilizaram curativos contendo nanopartículas de prata, não evidenciou sinais de toxicidade, ainda que grande quantidade de prata tenha sido observada no citoplasma dos fibroblastos, o que não foi obstáculo para a cicatrização e recuperação da ferida⁴⁰.

Apesar de serem amplamente utilizadas no cenário clínico, tanto prata quanto radiação infravermelha longa (FIR), objetos deste estudo, permanecem alvo de investigação. A primeira por seu possível potencial citotóxico e a

segunda, pelo pouco conhecimento sobre sua influência sobre cada componente da cicatrização^{40,41}.

2 OBJETIVO

Avaliar *in vitro*, a interferência de produto têxtil emissor de radiação infravermelha longa associada ou não à prata iônica, em fibroblastos provenientes do leito de feridas crônicas de etiologia venosa, quanto à:

- Capacidade de proliferação e viabilidade celular.
- Síntese de sinalizadores do processo de cicatrização TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, VEGF, iNOS e colágeno dos tipos I e III.
- Capacidade de controle microbiano de FIR e Prata

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Úlcera Venosa

3.1.1 *Definição*

De acordo com a classificação da Clínica, Etiológica, Anatômica e Fisiopatológica (CEAP), úlcera venosa foi definida como “uma lesão aberta na pele da perna ou pé, que demonstra pouca ou nenhuma tendência a cicatrização espontânea e que ocorre na área afetada por hipertensão venosa ambulatorial e apresenta outros sinais de insuficiência venosa crônica”^{42,43,44}.

3.1.2 *Prevalência e Fatores de Risco*

A maioria dos estudos mostra a prevalência de úlcera ativa (não cicatrizada) de aproximadamente 0,3%, ou seja, em torno de 1 em cada 350 adultos, enquanto história de úlcera ativa ou cicatrizada ocorre em cerca de 1% da população adulta. A prevalência aumenta com a idade, sendo superior a 4% em indivíduos com mais de 65 anos⁴⁵.

Muitos fatores de risco estão envolvidos no desenvolvimento da doença venosa crônica, incluindo idade, gênero, número de gestações, etnia, posição ortostática, obesidade, ocupação, história prévia de trombose venosa profunda, história de diabetes mellitus e hipertensão. Contudo, não há consenso na literatura acerca da relevância individual de cada um desses fatores para o desenvolvimento da úlcera venosa⁷.

3.1.3 Hipóteses para o desenvolvimento da úlcera

O sistema venoso dos membros inferiores é composto pelas veias superficiais, pelas veias profundas e pelas veias perfurantes, que fazem comunicação entre elas (Figura 4). Todos esses sistemas são equipados com válvulas bicúspides de sentido único que se abrem apenas em direção ao sistema profundo, permitindo que o sangue flua em direção cefálica e, normalmente, evitam o refluxo^{9,10}.

O sangue flui das pernas em direção ao coração inicialmente pela ação do bombeamento dos músculos da perna. Em repouso, na posição ereta, a pressão no sistema superficial e profundo é 80 mmHg, que representa a pressão hidrostática na posição em pé⁹.

Em deambulação, o músculo da panturrilha contrai, as veias profundas são comprimidas e a pressão sobe transitoriamente no sistema profundo, impulsionando o sangue em direção cefálica. Quando a pressão aumenta no sistema profundo, as válvulas fecham, evitando o fluxo retrógrado e transmissão da pressão alta para o sistema superficial. O esvaziamento do sistema profundo leva a uma subsequente queda abrupta da pressão de 0 a 10 mm Hg, permitindo que as válvulas se abram e permitam o fluxo do sangue do sistema superficial para o profundo. A manutenção do sistema venoso e bomba da panturrilha intactos é essencial para evitar o fluxo retrógrado para o sistema superficial⁹.

Figura 4 – Anatomia normal e alterada dos membros inferiores^{9,10}.

A patogênese da ulceração venosa não é bem conhecida. De um modo geral aceita-se que a anormalidade fisiológica inicial e básica seja a hipertensão venosa, causada pelo refluxo, obstrução ou insuficiência da bomba do músculo da panturrilha, que afeta o sistema venoso superficial (veias safenas menores e maiores), o sistema venoso profundo, ou as veias perforantes entre os dois sistemas. No entanto, os mecanismos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento da úlcera não estão bem esclarecidos^{8,46}. Algumas hipóteses procuram explicá-los.

3.1.3.1 Hipótese de “cuffs” de fibrina – (Browse e Burnard)

A “hipótese cuffs de fibrina pericapilar” resumida por Browse e Burnand¹², propõe que, em decorrência da hipertensão venosa, grandes moléculas como o fibrinogênio vazem através dos poros dilatados dos vasos sanguíneos dérmicos danificados e distendidos. O fibrinogênio é polimerizado rapidamente à fibrina e produz cuffs em torno dos capilares. Esse acúmulo de fibrina tem

efeitos negativos diretos sobre a cicatrização de feridas, pois regula negativamente a síntese de colágeno e cria uma barreira física para a difusão de nutrientes e oxigênio, resultando em morte celular e ulceração (Figura-2; pág 2)^{9,12}.

3.1.3.2 Hipótese de aprisionamento de células brancas (Coleridge et al)

Em extensão à hipótese dos “*cuffs*” de fibrina, surgiram outras 2 hipóteses. Em 1988, Coleridge et al¹³ propuseram que a hipertensão venosa leve à diminuição do gradiente de pressão entre os sistemas arterial e venoso e à consequente redução da velocidade do fluxo entre os dois sistemas, o que poderia levar a um acúmulo de leucócitos na parede do endotélio. Alguns desses leucócitos tornam-se bloqueadores, obstruindo a luz dos capilares e causando isquemia tecidual local e bloqueio do transporte de oxigênio pelas hemácias. Outros, migram para o tecido, onde se tornam ativos, liberando enzimas proteolíticas, radicais livres e mediadores inflamatórios que podem causar danos celulares que levam a morte tecidual e formação da úlcera (Figura 3; pág 3)^{9,13}.

3.1.3.3 Hipótese da “armadilha” (Falanga et al)

Cinco anos mais tarde, Falanga e Eaglstein¹¹ propuseram que o fibrinogênio, macroglobulina α_2 e outras macromoléculas que vazam para a derme e tecido subcutâneo como resultado da hipertensão venosa ou dano capilar, aprisionam fatores de crescimento e outras substâncias homeostáticas. Consequentemente, as moléculas aprisionadas podem ficar indisponíveis para a manutenção da integridade do tecido e processo de reparo. (Figura 1; pág 2).

3.2 Processo de cura de úlcera venosa

3.2.1 Cicatrização Fisiológica

A cicatrização é um processo dinâmico e interativo envolvendo mediadores solúveis, células sanguíneas e parenquimatosas e matriz extra celular. Ela acontece em três fases que se sobrepõem no tempo: inflamatória, proliferativa, remodelação⁴⁷.

3.2.1.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória tem por finalidade: limitar o sangramento, estabelecer barreira imune contra micro-organismos invasores, iniciar a sinalização por citocinas e fornecer matriz provisória para a migração celular^{1,47,48}.

A primeira medida que o organismo toma no início do ferimento é controlar o sangramento, o que acontece pela vasoconstrição, (dada por mecanismos de reflexo neuronal) e formação de coágulo composto por colágeno, trombina, fibronectina, trombospondina e vitronectina. O coágulo formado e as plaquetas contidas em seu interior não são importantes apenas para a hemostasia, uma vez que o coágulo também funciona como matriz provisória para migração de células (neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais) e como reservatório para citocinas e fatores de crescimento necessários para as fases subsequentes da cicatrização. Já as plaquetas presas ao coágulo, liberam a partir de seus grânulos α , fatores de crescimento e citocinas como: PDGF, TGF- β , EGF, sendo PDGF e TGF- β responsáveis pela atração das primeiras células inflamatórias a chegarem no local da ferida^{1,21,35}. Essas plaquetas também contêm aminas vasoativas, como

serotonina, depositadas em seus corpos densos, o que propicia vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular¹.

Com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, os neutrófilos penetram na ferida. Sua primeira atividade no local é fagocitar corpos estranhos e bactérias, destruindo-os pela liberação de radicais livres de oxigênio (ROS), que são antimicrobianos, e de proteases (ex. collagenases), que participam da degradação inicial da MEC^{1,49,50}. Cabe ainda aos polimorfonucleares (PMN), fornecer citocinas pró-inflamatórias com papel nas fases subsequentes da cicatrização, como IL-1, que contribuirá futuramente com a migração de queratinócitos e TNF- α que pode ter influência significativa sobre a angiogênese e síntese de colágeno^{48,50}.

Após completar a tarefa, as células redundantes são descartadas por extrusão na superfície da ferida, bem como por apoptose, possibilitando a eliminação de toda a população de neutrófilos sem danificar o tecido ou potencializar a resposta inflamatória¹.

A presença dos neutrófilos é seguida de perto pelos monócitos derivados da corrente sanguínea e tecido adjacente, que ao chegarem a ferida, por estímulo de IL-2, TNF- α , PDGF e interferon γ (IFN- γ), são rapidamente transformados em macrófagos, a segunda população de células inflamatórias a invadir a ferida; cuja presença é considerada essencial para a cicatrização^{35,51}. Os macrófagos, a exemplo dos neutrófilos, participam do desbridamento da ferida via fagocitose e contribuem para estase microbiana via síntese de radicais de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO)⁵⁰. Outra função importante dos macrófagos é ativação e recrutamento de outros tipos celulares via liberação de mediadores, como fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), TGF- β , VEGF e EGF, que promoverão proliferação de fibroblastos, angiogênese e migração de queratinócitos^{35,50}. Além disso, macrófagos também podem ter papel regulatório sobre a apoptose dos neutrófilos, desativando células que de outra forma, poderiam levar a um estágio inflamatório prolongado⁵¹.

Linfócitos compreendem outro tipo de população celular inflamatória/imune, que rotineiramente invade a ferida em número menor que os macrófagos⁵⁰. Eles atingem o pico cerca de 1 semana após a lesão e fazem uma ponte de transição entre as fases inflamatória e proliferativa da

cicatrização. Apesar de serem considerados essenciais para cicatrização, o papel dos linfócitos nesse processo não é bem conhecido. Grande quantidade de evidências sugere a hipótese de que os linfócitos tenham papel ativo na modulação do ambiente da ferida. A depleção da maior parte de linfócitos T na ferida diminui sua resistência e conteúdo de colágeno⁵⁰.

3.2.1.2 Fase proliferativa

Esse processo complexo engloba angiogênese, fibroplasia e reepitelização⁵².

- **Angiogênese:** para que células dérmicas e epidérmicas migrem e proliferem no leito da ferida, elas necessitam de um suprimento sanguíneo adequado para entrega de nutrientes e troca de gases e metabólitos. Portanto, para que a cicatrização progrida normalmente, uma resposta angiogênica sadia precisa ser iniciada e mantida⁴⁹.

A angiogênese, na cicatrização, começa imediatamente após a lesão, quando a hipóxia local, secundária a ruptura dos vasos sanguíneos, ocorre. Tal evento fomenta a produção de fatores pró-angiogênicos: VEGF, bFGF e PDGF, inicialmente liberados pelas plaquetas e depois, pelas células residentes no leito da ferida. Em resposta, células endoteliais ativadas rompem suas interações com células endoteliais vizinhas, digerem a membrana basal e outros componentes da matriz extra celular (pela liberação de metaloproteinases), migram para o local da ferida, proliferam, formam contato célula-célula e eventualmente, novos vasos sanguíneos^{49,53}.

Hoje sabe-se que células progenitoras endoteliais (EPCs) também são necessárias para a revascularização da ferida. Normalmente residentes na medula óssea, elas são recrutadas para a circulação sanguínea em resposta a lesão. Na sequência, colonizam a microvasculatura de remodelação em região próxima às células endoteliais que delimitam a lesão. A mobilização das EPCs é mediada pelo NO, VEGF e MMPs, particularmente, MMP-9, enquanto a

diferenciação dessas células, possivelmente ocorra em resposta a fator 1 α derivado de células estromais e ao IGF⁴⁹.

A medida que o processo de angiogênese acontece, uma rica rede de capilares, derivada de ramificações de vasos saudáveis, é formada ao longo da ferida. Inicialmente, esses capilares são frágeis e permeáveis, o que contribui para o edema e o aparecimento do tecido de granulação cicatricial⁵² que será protegido da isquemia local, graças a vasodilatação provocada pelo NO, sintetizado por células endoteliais, em resposta a eNOS, em condição de hipóxia³⁵.

▪ **Fibroplasia:** fibroblastos localizados nas proximidades da ferida são atraídos para o local estimulados por fatores como TGF- β e PDGF, liberados por plaquetas e células inflamatórias¹. Uma vez no local, essas células proliferam de forma abundante e começam a depositar matriz provisória composta por glicosaminoglicanos, fibronectina e colágeno (sendo o colágeno III em maior proporção do que na pele sadia)^{35,52}. O tecido rosado, vascular e fibroso resultante, que substitui o coágulo no local da ferida é chamado tecido de granulação⁵². Uma vez que quantidade suficiente de matriz é depositada, fibroblastos locais, induzidos por TGF- β , secretado por macrófagos, mudam seu fenótipo para miofibroblasto, caracterizado pela presença de feixes de microfilamentos contendo actina ao longo da face citoplasmática da membrana celular, conferindo capacidade contrátil a essas células^{47,51}. Além disso, miofibroblastos exibem elos célula-célula e célula-matriz (fibrónexus), unidos por junções de desmossomos, o que é necessário para que os fibroblastos contraíam de forma sincronizada, copolimerizando fibrilas de colágeno dos tipos I e III em direção ao corpo da célula, resultando na redução da área do tecido de granulação, aproximando as bordas da ferida^{1,54}.

▪ **Reepitelização:** enquanto a integridade e resistência do tecido está sendo reestabelecida, a barreira externa também deve ser restaurada. Esse processo é caracterizado principalmente pela proliferação e influxo dos queratinócitos basais localizados próximos às bordas da ferida, que estimulados por TNF- α , IL-1, EGF e fator de crescimento para queratinócitos (KGF), perdem sua forte adesão à derme adjacente e começam a migrar sobre

a matriz provisória^{35,50}. Células tronco no bulbo dos folículos pilosos e nas glândulas apócrinas começam a se diferenciar em queratinócitos, repovoar o extrato basal e também passam a migrar sobre a borda da ferida. Uma vez que encontram o mesênquima da matriz extracelular, elas aderem próximas à borda interna da ferida e começam a depositar nova membrana basal. Em seguida, outra fileira de queratinócitos migra sobre a camada epitelial recém depositada para preencher a falha. Essas células migram e digerem MEC usando proteases até que entrem em contato físico e parem de migrar, sinalizadas por inibição por contato pelos queratinócitos vizinhos⁵⁵.

3.2.1.3 Fase remodelação:

Como o colágeno é o componente principal da derme, a fase de remodelação constitui na mudança do tipo de colágeno e a sua disposição⁵⁶.

O colágeno III, inicialmente abundante vai sendo degradado por metaloproteinases secretadas por macrófagos, células epidérmicas, células endoteliais e fibroblastos, enquanto o colágeno I tem a produção aumentada pelos fibroblastos, mantendo um equilíbrio entre síntese e degradação^{1,47,56}.

O arranjo das fibras colágenas, que inicialmente eram dispostas paralelamente a pele de forma aleatória, passam a ser entrelaçadas e organizadas ao longo da linha de *stress*, o que aumenta gradualmente a resistência da cicatriz^{51,56,57}. A medida que a ferida cicatriza, a densidade de fibroblastos e macrófagos é reduzida por apoptose. Com o tempo, o crescimento de capilares cessa, o fluxo sanguíneo para área e a atividade metabólica da ferida diminuem. O resultado final é uma cicatriz completamente madura com número diminuído de células e vasos sanguíneos e alta resistência¹. A resistência final adquirida depende da localização do reparo e de sua duração, mas a resistência original do tecido não será totalmente readquirida¹.

3.2.2 *Reparação crônica*

Ao contrário das feridas agudas, feridas crônicas não seguem os estágios normais da cicatrização, elas não são reparadas de forma ordenada e temporal. O processo de cicatrização é incompleto e prejudicado por diversos fatores que prolongam um ou mais estágios nas fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação. Esses fatores incluem necrose, infecção, quantidade excessiva de células inflamatórias, fibroblastos senescentes, hipóxia do tecido e níveis excessivos de citocinas inflamatórias¹.

3.2.2.1 *Tecido necrótico, esfacelo e escaras*

O leito da ferida pode estar coberto por tecido necrótico (tecido inviável devido a redução do suprimento sanguíneo), esfacelo (tecido morto, geralmente na cor creme ou amarelada) ou escaras (tecido necrótico seco, negro e duro). Tais tecidos podem prejudicar a cicatrização pela possibilidade de abrigarem organismos patogênicos. Sendo assim, a sua remoção ajuda a prevenir infecções⁵⁸.

3.2.2.2 *Infecção*

Toda ferida é contaminada por bactérias da pele adjacente, ambiente e fontes endógenas do paciente, independentemente da causa, tamanho, localização e manejo. O desenvolvimento ou não desenvolvimento de uma infecção depende da virulência, quantidade e tipo de micro-organismos, bem como suprimento sanguíneo no local e resistência do paciente^{1,59}. Normalmente aceita-se que contagens bacterianas maiores que 10^5 bactérias

viáveis por grama de tecido ou qualquer quantidade de *Streptococcus* α e β hemolíticos sejam considerados prejudiciais^{49,59, 60}. *Mycobacteria* e *Clostridium perfringens* também são sempre significantes⁵⁹.

Toxinas bacterianas (bem como bactérias vivas) induzem resposta inflamatória excessiva e dano ao tecido que pode levar a complicações como abscesso, celulite, osteomielite ou perda do membro (paciente diabético), já que tanto as células inflamatórias recrutadas, quanto as bactérias, produzem diversas proteases (incluindo MMPs) que degradam MEC e fatores de crescimento presentes no leito da ferida⁴⁹.

Em úlceras venosas, segundo Gjodsbol et al⁶¹, que avaliaram o perfil bacteriano por 8 semanas, as bactérias mais prevalentes são: *S aureus* (93,5%), *E faecalis* (71,7%), *Pseudomonas aeruginosa* (52,2%), estafilococo coagulase-negativa (45,7%), *Proteus ssp* (41,3%) e bactérias anaeróbias (39,1%)⁵⁹.

Bactérias como *Pseudomonas* e *Staphylococcus* MRSA, frequentemente formam comunidades poli microbianas chamadas biofilmes. Essas estruturas complexas são compostas por células microbianas embebidas em matriz polimérica secretada, que fornece um ambiente ótimo para a sobrevivência bacteriana, permitindo que escapem da resposta imune do hospedeiro, do ambiente hostil da ferida e resistam ao tratamento por antibióticos^{49,59}.

Sinais de infecção de ferida são por vezes sutis, especialmente em pacientes idosos, que podem não ter resposta inflamatória rápida. Infecções por micobactérias e fungos também podem não demonstrar sinais intensos de inflamação⁶⁰.

O guia de diretrizes no manejo de úlceras venosas produzido pela Associação Britânica de Dermatologistas e a Faculdade Real de Medicina (*Royal College of Physicians*) recomenda que a infecção deve ser considerada se um dos seguintes fatores estiver presente: pirexia, aumento da dor, aumento de eritema da pele adjacente, linfangite, ou crescimento rápido da úlcera, mas um alto índice de suspeição também deve ser considerado quando uma ferida inexplicavelmente, não cicatriza^{59,60}.

Sinais sistêmicos como febre, calafrios e leucocitose sugerem que a infecção pode ter evoluído para bacteremia ou septicemia⁶⁰.

3.2.2.3 Quantidade excessiva de células inflamatórias

Células inflamatórias acumuladas no ambiente da úlcera crônica liberam produtos tóxicos como elastase, fator de necrose tumoral e produzem várias (ROS) que danificam elementos estruturais da MEC e membranas celulares, levando a senescência prematura⁵. Além desses efeitos negativos diretos, ROS junto com citocinas pró-inflamatórias, induz a produção de serino proteases e MMPs que degradam e inativam componentes da MEC e fatores de crescimento necessários para a função celular normal. A inativação de inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs) por ação proteolítica aumenta esse processo⁴⁹.

3.2.2.4 Fibroblastos senescentes

O fibroblasto é um tipo celular importante em todos os estágios da cicatrização. Para desempenhar seu papel, é importante que eles migrem para a ferida, proliferem e respondam apropriadamente às citocinas/fatores de crescimento que modulam e dirigem a produção de matriz extracelular e o processo de contração da ferida^{62,63}. Além disso, fibroblastos fornecem regulação parácrina crucial para angiogênese e formação neo epidermal^{64,65}. No entanto, o ambiente das úlceras crônicas é desfavorável para essas células, prejudicando suas funções⁶⁴.

Estudos sugerem que úlceras venosas e seu ambiente hostil (estresse oxidativo, citocinas inflamatórias), estejam associadas com senescência prematura de fibroblastos e que haja uma correlação entre o número de células senescentes identificadas em biópsia de tecido e tempo de cicatrização^{10,63,66,67}. Entre as alterações fenotípicas e moleculares em células residentes da ferida, destacam-se:

- baixa densidade de receptores para fatores de crescimento e diminuição de resposta a esses fatores^{49,68}

- baixo potencial mitogênico^{49,68,69}
- motilidade reduzida em relação aos fibroblastos normais⁴⁹
- alterações na morfologia celular, eles são mais largos com maior massa molecular^{15,62,69}

- aumento de expressão de proteínas da matriz, como a fibronectina¹⁵.

Essa glicoproteína auxilia interações célula-célula e célula-substrato desempenhando papel importante na cicatrização, mas ela também tem sido considerada um importante componente das tampas fibrosas pericapilares associadas a hipertensão venosa¹⁵. Os produtos da degradação da fibronectina são fortes quimioatraentes para monócitos e macrófagos e provavelmente atuem como estimuladores na diferenciação de monócitos em macrófagos. Levando em conta essas duas características, o aumento da expressão de fibronectina por fibroblastos senescentes em úlceras venosas pode: (1) resultar em deposição de matriz pericapilar e atuar como barreira difusora, (2) promover aprisionamento, diferenciação e ativação de monócitos com consequências pró-inflamatórias e (3) fornecer substrato de abrigo para macrófagos no ambiente da úlcera, facilitando o processo de inflamação crônica¹⁵

- aumento da expressão de IL-1 e diminuição da expressão de IL-6 e IL-8¹⁵

- resposta proliferativa diminuída ao TNF- α , cujos níveis estão aumentados em úlceras crônicas¹⁵

- padrões alterados de expressão gênica¹⁵

- resistência à morte apoptótica, acumulando-se no local por longos períodos¹⁵

- aumento da expressão de metaloproteinases e diminuição da expressão de seus inibidores, o que pode contribuir para o desgaste da derme e quebra da matriz, facilitando a formação da úlcera e dificultando a cicatrização¹⁵.

Alguns autores hipotetizam, portanto, que o acúmulo de fibroblastos senescentes, com as características mencionadas acima, no local da ferida, tenha papel fisiopatológico importante no mecanismo associado à má cicatrização dessas lesões¹⁵.

3.2.2.5 Desequilíbrio entre síntese de MMPs e TIMPs

O desenvolvimento e elaboração de um coágulo no início da cicatrização, fornece a hemostasia e o alicerce que mais adiante, formará a matriz extracelular da ferida. Essa matriz extracelular existe principalmente para facilitar migração celular, adesão, contração da ferida e epitelização. A transformação, organização e manutenção da matriz extracelular, dependem de diversos processos intracelulares e extracelulares rigorosamente controlados, dos quais as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) e Inibidores Tissulares de Metaloproteinases (TIMPs) fazem parte⁷⁰.

MMPs são uma subfamília de endopeptidases dependentes de zinco coletivamente capazes de degradar essencialmente todos os componentes da matriz extracelular (ex. colágeno, elastina, fibronectina) bem como proteínas não matriciais⁷¹.

Atualmente, pelo menos 23 MMPs foram identificadas em seres humanos e, com base na organização de seus domínios e substratos de preferência, elas podem ser divididas em seis grupos: 1) collagenases: (MMP-1, , MMP-8 e MMP-13); 2) gelatinases: (MMP-2 e MMP-9); 3),estromelinas: (MMP-3 e MMP-10); 4) matrilisinas: (MMP-7); 5) metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP): (MMP-14, MMP-15, MMP-16), e 6) outras MMPs: (MMP-11, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23)^{72,73,74}. Em comum, todas essas metaloproteinases possuem um conjunto de características que as tornam únicas entre as enzimas; são elas: presença de um íon de zinco no sítio catalítico, secreção pela célula forma inativa (zimógeno), sequência de aminoácidos grosseiramente semelhantes, especificidade para degradar pelo menos um componente da matriz e inibição pelas TIMPs⁷⁰.

Membros da família MMP dividem ainda similaridades estruturais e sequenciais que incluem, no mínimo, um pré-domínio (pre), um pró-domínio (pro) e um domínio catalítico (Figura 5.). O pré-domínio (~80 aminoácidos), na posição N terminal, é removido após a síntese da enzima ter sido direcionada para o retículo endoplasmático. O pró-domínio, se estende então desde da extremidade N terminal, gerada após a retirada do pré-peptídeo até o início do

domínio catalítico. Ele contém uma sequência conservada **PRCGVPD**, sendo que o resíduo de cisteína, dentro dessa sequência, (*cysteine switch*) posiciona-se diretamente sobre o átomo de zinco no domínio catalítico que vem a seguir e, através de seu grupo tiol (SH), liga-se a ele, mantendo a inatividade da enzima. O domínio catalítico (~170 aminoácidos) conta com uma sequência conservada (**HEXHXGXXH**) em sua porção C terminal; é aí que se encontra o zinco catalítico, ligado aos 3 resíduos de histidina e ainda, 1 átomo de zinco estrutural e 3 átomos de cálcio. O quarto ligante do zinco catalítico é a cisteína do pró-domínio no zimogênio ou uma molécula de água na enzima ativa^{75,76}.

Figura 5 - Sequência estrutural mínima de uma MMP⁷⁵

Historicamente, as MMPs são conhecidas por predominantemente, degradar componentes estruturais da MEC. Apesar dessa degradação proteolítica ser parte essencial do reparo e remodelação durante a cicatrização, a função das MMPs não está restrita ao “*turn over*” da matriz^{71,77}. Elas também estão envolvidas direta ou indiretamente, em outras tarefas: 1) remoção do tecido desvitalizado, 2) migração e proliferação celular, por degradar proteínas da matriz responsáveis pelas ligações célula-célula, célula-MEC, 3) interações epidérmica-mesenquimal durante a migração de queratinócitos, 4) angiogênese, 5) regulação da atividade de certos fatores de crescimento/citocina (libertação, ativação, silenciamento), 6) alteração de receptores da superfície celular^{71,72,78}.

Em tecidos normais, a expressão de MMPs, quando ocorre, acontece em níveis baixos, mas sua expressão e ativação são rapidamente induzidas quando a remodelação ativa do tecido é necessária. Nessa circunstância, a expressão de MMPs pode ser induzida em muitos tipos celulares (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias, como linfócitos, monócitos e macrófagos) em resposta a citocinas, hormônios, oncogenes e contato das células com a MEC ou outros tipos celulares. As principais citocinas/fatores de crescimento que ativam transcritionalmente as

MMPs incluem interleucinas, interferons, EGF, KGF, FGF, VEGF, PDGF, fator de crescimento para hepatócito (HGF), TNF- α , e TGF- β ⁷⁸.

Para completar suas funções normais (ou patológicas), as MMPs precisam estar presentes no tipo de célula e localização perivascular corretos, no momento certo, em quantidade adequada e ainda, precisam ser ativadas ou inibidas apropriadamente. A atividade das MMPs é regulada a nível de transcrição, ativação do zimógeno e inibição da atividade proteolítica^{71,79}.

A ativação da enzima secretada na forma inativa (zimógeno) envolve o rompimento da ponte entre o “pró-domínio” (PRCGVPD) e o íon de zinco (Zn⁺⁺) no sítio ativo, o que acontece pela ação de serino proteases e outras MMPs. Já a inibição da atividade da proteinase se dá por intermédio de proteínas plasmáticas inibidoras, como α 1-proteinase, α -2 macroglobulina, ou por proteínas de ligação a MMPs, como trombospondina 1 e 2, mas os principais reguladores de MMP são os inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs), que são inibidores específicos de MMPs⁷⁵.

TIMPs (inibidores tissulares de metaloproteinases) são reguladores endógenos da atividade das MMPs, eles são expressos por vários tipos celulares e estão presentes na maioria dos tecidos e fluídos corporais⁸⁰. TIMPs inibem a atividade proteolítica das MMPs ligando-se ao seu sítio ativo em razão estequiométrica 1:1, formando complexos não covalentes que são resistentes a desnaturação pelo calor e degradação proteolítica^{80,81}. Atualmente, a família de TIMP compreende 4 membros (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4). De um modo geral, todos eles são capazes de inibir qualquer MMP, contudo a eficácia de inibição de determinada MMP varia de um TIMP para outro. Exemplo:TIMP-1 é forte inibidor de muitas MMPs, exceto algumas MMPs do tipo membrana (MT) MMP. Do mesmo modo, tanto TIMP-1 quanto a TIMP-3 associam-se a forma latente de MMP-9, enquanto TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 são capazes de interagir com pró-MMP-2^{82,83}.

As primeiras evidências do papel dos TIMPs na proteólise da matriz vieram da observação de sua habilidade em inibir diversas MMPs *in vitro* e da associação do aumento de sua expressão com acúmulo de matriz. Essas observações levaram, em última análise, a ideia geralmente aceita de que os TIMPs inibem diretamente a proteólise de MEC dependente de MMPs e que

por essa razão, o aumento dos níveis de TIMP resulta em acúmulo de matriz (fibrose), enquanto a perda de TIMP leva ao proteólise excessiva da matriz (úlceras crônicas)^{81,82}.

Os altos níveis de atividade proteolítica observados no exsudato de úlceras venosas podem ser resultado de um desequilíbrio entre a expressão de MMPs e TIMPs. No leito da úlcera, a atividade proteolítica excessiva pode ser responsável pela degradação citocinas, fatores de crescimento e seus receptores e componentes da MEC, prejudicando a granulação da ferida¹⁷. Um balanço complexo entre MMPs e TIMPs é portanto necessário para uma cicatrização adequada⁸⁴.

3.2.2.6 Metabolismo de colágeno

Colágeno é um componente importante em todas as fases da cicatrização¹. No início do processo de reparo, fibronectina e colágeno do tipo III (mais frágil e superficial) constituem a matriz provisória. À medida que o processo avança, o colágeno do tipo I se acumula, conferindo maior resistência ao tecido^{35,56}. No ambiente da úlcera crônica, no entanto, a produção de colágeno é prejudicada. Vários estudos têm demonstrado que fibroblastos nas úlceras venosas são senescentes, com resposta diminuída a estímulos e consequentemente, menor atividade quanto à produção de componentes da MEC^{15,16}. Além disso, a síntese de colágeno tem se mostrado crucialmente dependente da disponibilidade de oxigênio molecular, tanto em cultura de tecidos quanto em modelos de cicatrização em animais. Uma vez que a presença de oxigênio é necessária para hidroxilação da prolina e lisina pela prolil hidroxilase, a molécula sintetizada por células hipóxicas no ambiente da úlcera não é hidroxilada adequadamente, o que leva à formação de uma tripla hélice instável, menos resistente às enzimas proteolíticas e ao calor quando comparadas às moléculas helicoidais intactas^{16,34}.

3.2.2.7 Hipóxia

A cicatrização é marcada pelo aumento de requerimentos metabólicos e é altamente responsiva a mudanças no fornecimento de oxigênio⁵¹. No ambiente da ferida, os principais fatores que afetam suprimento de oxigênio incluem hipoperfusão, tanto por razões sistêmicas (baixo volume, insuficiência cardíaca), quanto por causas locais (insuficiência arterial, vasoconstrição local, ou tensão excessiva sobre os tecidos)⁵⁰.

Se por um lado, a baixa tensão de oxigênio estimula a expressão de um fator de transcrição nuclear, chamado fator induzível por hipóxia (HIF), que regula a expressão de VEGF, estimulando a angiogênese, por outro, ela tem efeito deletério profundo sobre outros aspectos da cicatrização^{2,50}.

Em baixos níveis de oxigênio, fibroblastos e neutrófilos deixam de funcionar apropriadamente⁵¹. Os fibroblastos requerem oxigênio para ótima síntese de colágeno, particularmente nas etapas de hidroxilação⁵⁰. Os leucócitos polimorfonucleares descontrolados respondem à condição de hipóxia liberando proteinases e metabólitos de oxigênio tóxicos, que danificam as células endoteliais, levando a destruição celular, deposição de fibrina e a consequente diminuição de fornecimento de nutrientes e oxigênio, propagando um ciclo vicioso⁸⁵.

3.2.2.8 Citocinas e fatores de crescimento

As diversas atividades que acontecem durante a cicatrização são dirigidas por sinais químicos referidos como fatores de crescimento ou citocinas, liberados por vários tipos celulares envolvidos no reparo da ferida (plaquetas, células inflamatórias, células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais vasculares)^{2,57}. Originalmente, esses fatores eram chamados de fatores de crescimento porque essa era sua principal função observada. Com a aquisição

de novas informações, tornou-se evidente que vários desses fatores controlam muito mais que o crescimento celular. Migração celular, produção de matriz, expressão de enzimas e diferenciação também podem ser controlados por esses fatores².

Citocinas podem regular as atividades e funções celulares via mecanismos endócrino, parácrino, autócrino. Independente de qual for o mecanismo, a célula alvo responde por intermédio de um receptor de superfície celular. Vários tipos de receptores de superfície celular têm sido descritos, como receptores associados canais iônicos, receptor associado a proteína G, ou associado a enzima. A resposta provocada na célula é geralmente uma fosforilação ou desfosforilação de moléculas mensageiras secundárias graças à ação de fosfatases ou quinases, resultando na ativação ou desativação de proteínas no citoplasma ou núcleo da célula alvo. A fosforilação de proteínas nucleares é seguida pelo início da transcrição de genes alvo^{2,50}.

Interações entre fatores de crescimento e a MEC também são fundamentais para todas as etapas da cicatrização. Elas são dinâmicas e recíprocas, algumas são diretas (ex. ligação do VEGF a sulfato de heparano) e outras são indiretas, por intermédio de mediadores. Integrinas são a principal família de receptores de superfície celular que mediam adesão a MEC, elas consistem de uma porção extracelular que se liga a MEC e um domínio intracelular que se associa com o citoesqueleto^{50,86}.

Por poder se ligar e liberar diversos fatores de crescimento, a MEC pode exercer controle direto sobre suas atividades. O sequestro e liberação de fatores de crescimento pela MEC tem diversas consequências, incluindo prolongação da ação do fator de crescimento, localização da atividade desse fator ao ambiente imediato e variações na intensidade de atividade (aumento ou inibição). O sequestro também protege os fatores de crescimento contra a degradação, o que pode ser importante em feridas com alta atividade proteolítica⁵⁰

Citocinas produzidas principalmente por células T, leucócitos, macrófagos e algumas células endoteliais, estão envolvidas na emissão de sinais que promovem a comunicação entre as células durante a resposta imunológica e do reparo. Elas podem ser divididas em categorias como interleucina,

interferons, TGF, TNF entre outras⁸⁷. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α e IL-1 β , IL-6, e TNF- α tem papel importante no reparo da ferida por influenciarem vários processos no local, como estimulação de queratinócitos e proliferação de fibroblastos, síntese e quebra de proteínas da matriz, quimiotaxia para fibroblastos e regulação da resposta imune^{87,88}.

Quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são um subconjunto de pequenas citocinas que estimulam quimiotaxia e extravasamento dos leucócitos. Essa grande família de proteínas, com aproximadamente 50 membros em humanos, é subdividida em 4 sub-famílias: α - (CXC-) e β -(CC-) que englobam a maioria das quimiocinas, e duas subfamílias adicionais, as quimiocinas CX3C e quimiocinas-C, com apenas um ou dois membros cada. Quimiocinas exercem suas funções via ligação aos receptores acoplados a proteína G na superfície das células alvo, aos receptores CXC- e CC- que reconhecem apenas quimiocinas da subfamília correspondente. Estudos recentes forneceram evidências de um importante papel das quimiocinas no recrutamento de células inflamatórias para o local da ferida. Além disso, a presença de receptores para a quimiocinas nas células residentes, sugerem que quimiocinas também contribuam para a regulação da reepitelização, remodelação do tecido e angiogênese^{21,88}.

Já os fatores de crescimento “clássicos” são polipeptídeos sintetizados e liberados por vários tipos celulares (plaquetas, células inflamatórias, células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais vasculares). Eles são agrupados em 5 grandes famílias que parecem contribuir significativamente para o processo de cicatrização: família PDGF (PDGF e VEGF), família TGF- β (TGF- β 1- 3), família FGF (aFGF, bFGF e KGF), família EGF (EGF, TGF- α , Hb-EGF, anfiregulina e família IGF (IGF-I)^{57,89}.

De modo geral, as citocinas/fatores de crescimento são estáveis, mas o ambiente da úlcera crônica (hipóxia e alta atividade proteolítica) pode destruí-los. Contudo, a alteração na concentração desses fatores não é o único problema observado. Questões quanto a interação desses fatores com a MEC, idade do paciente, presença de infecção bacteriana e anormalidades fenotípica nas células encontradas em úlceras crônicas (que inclui baixa densidade de

receptores para citocinas/fatores de crescimento e baixo potencial mitogênico) , também devem ser levados em consideração^{2,22,49,57}.

Muitos estudos *in vitro* avaliaram o efeito de fluido de úlcera crônica e aguda adicionados a culturas celulares, reforçando que fluido de úlcera crônica demonstrou propriedade pró-inflamatória, diminui atividades celulares mitogênicas relacionadas com degradação de fatores de crescimento pelas MMPs e foi capaz de aumentar a expressão de MMP por fibroblastos dérmicos cultivados⁴⁴. Outro estudo *in vitro* demonstrou ainda, que o fluido e úlceras venosas diminuiu a proliferação de fibroblastos neonatais, aumentou a expressão da atividade SA- β -Gal e induziu morfologia características indicativas de senescência nessas células. Se assumirmos que o fluido é um reflexo no microambiente da úlcera, os resultados encontrados sugerem que o ambiente da úlcera venosa afeta, pelo menos em parte, a função dos fibroblastos, induzindo-os a senescência⁹⁰.

Nesse processo de cicatrização, o metabolismo do óxido nítrico merece consideração a parte. Discutiremos esse assunto no item a seguir

3.2.3 Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki⁹¹, descobriram uma molécula sinalizadora de curta duração produzida por células endoteliais do revestimento dos vasos sanguíneos. Inicialmente essa molécula foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), porque se difundia do endotélio para as células musculares lisas adjacentes, relaxando o músculo e dilatando os vasos sanguíneos⁹². Cerca de sete anos mais tarde, descobriu-se que na verdade, essa molécula tratava-se do óxido nítrico⁹³, a quem hoje é atribuído um importante papel no reparo de feridas, graças a sua influência funcional sobre angiogênese, inflamação, proliferação celular, deposição de MEC e remodelação⁹⁴.

O óxido nítrico constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, que atua como molécula sinalizadora parácrina nos sistemas

nervoso, imune e circulatório^{95,96}. Trata-se de um radical livre, gasoso, inorgânico, com meia vida curta, que possui 1 elétron na camada de valência, estando 1 elétron não emparelhado. Esse caráter radicalar lhe confere uma alta reatividade, especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O_2) e ânion superóxido (O_2^-) ou metais de transição como ferro, cobalto, manganês e cobre^{97,98}.

Ao contrário de outras moléculas sinalizadoras, como fatores de crescimento/citocinas, que se ligam a receptores na superfície celular, o NO difunde-se através da membrana plasmática de sua célula alvo e, ao invés de regular a transcrição gênica ligando-se a um receptor intracelular específico, ele regula diretamente a atividade de enzimas alvo intracelulares. Um bom exemplo é sua ligação reversível ao ferro, no sítio ativo da enzima guanilil-ciclase^{96,99}. Essa enzima catalisa a desfosforilação do trifosfato de guanosina (GTP) a monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que atua como mensageiro secundário para muitas funções celulares importantes, particularmente para sinalização de relaxamento do músculo liso¹⁰⁰. Porém, o NO também pode agir de forma independente do GMP cíclico. Alguns de seus efeitos são derivados de reações químicas com oxigênio, levando a formação de espécies reativas (ROS), como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($HO^{\bullet}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são normalmente associados com dano celular, mas também podem interagir com proteínas que controlam a atividade de genes e adaptam as células às circunstâncias de mudanças^{101,102}. Outros efeitos do NO são decorrentes de sua capacidade de reagir com o sítio de ligação ao tiol do fator de transcrição nuclear kappa ($NF-\kappa\beta$), regulando a expressão de muitos genes com papéis importantes nas respostas imunológicas e ao estresse, inflamação e apoptose^{101,102}.

No organismo, o NO é gerado a partir de três isoformas da enzima óxido nítrico síntase (NOS) a saber: neuronal (nNOS ou NOS-I), induzível (iNOS ou NOS-II) e endotelial (eNOS ou NOS-III). Todas elas catalisam a mesma reação, a conversão de L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, requerem nicotinamidaadenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), ferro ligado a heme, flavina adenina nucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN), tetraidrobiopterina (BH_4) como cofatores essenciais e são inibidas por análogos

da arginina N substitutos, como a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), N^G- amino-L-arginina (L-NAA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name). Esses análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estéreos específicos da NOS^{95,98,103,104}.

Apesar de catalisarem a mesma reação, as três isoformas de NOS diferem em relação a regulação, amplitude, duração da produção de NO e distribuição nas células e tecidos¹⁰³.

A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), encontrada em neurônios, músculo esquelético, pâncreas e rins e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), encontrada predominantemente ligada a membrana de células endoteliais, são chamadas de óxido nítrico sintase constitutivas (cNOS), porque estão permanentemente ativas (mesmo na ausência de agentes indutores), gerando baixas concentrações de NO (em escala de nmol/L). Essas isoformas de NOS (cNOS) são ativadas pelo aumento da concentração de Ca²⁺ via calmodulina^{35,94,98,105}. Já a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), normalmente não é expressa nas células em estado basal, ela foi observada pela primeira vez em macrófagos ativados, mas pode ser induzida em vários tecidos por uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (ex. TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ), fatores de crescimento secretados e liberados na área da ferida, hipóxia, produtos bacterianos como lipopolissacarídeos e ácido lipoteicoico^{35,94,98,106}. Ao contrário das cNOS, a expressão da iNOS é regulada pela ligação permanente a calmodulina, o que permite que enzima atue de forma independente da concentração de cálcio intracelular e leve a liberação de NO em níveis muito mais altos (em escala μ mol/L) e por mais tempo^{35,107}. Segundo Davies et al.¹⁰⁸, após a indução, a iNOS é ativa por 20 horas e sintetiza NO em concentrações 1000 vezes maior que as cNOS^{35,98,106}.

A indução de iNOS pode ser suprimida por TGF- β , IL-4, IL-10 sozinhos ou sinergicamente com macrófagos, por IL-8 e por glicocorticoides, que inibem a indução, mas não a atividade das enzimas já induzidas⁹⁸.

Todas as três isoformas são expressas na pele: nNOS (queratinócitos e melanócitos), eNOS (queratinócitos da camada basal da epiderme, fibroblastos da derme, capilares endoteliais e glândulas écrinas) e iNOS (pode ser induzido

em queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans e células endoteliais) e todas elas estão envolvidas no processo de cicatrização de feridas⁹⁴.

3.2.3.1 Hemostasia e inflamação

No início da cicatrização, iNOS é produzida em resposta a estimulantes como: hipóxia, micróbios e citocinas (ex. IL-1 β , TNF- α) secretadas por plaquetas, células endoteliais e macrófagos e pode atingir seu pico em menos de 48 horas, sugerindo que essa enzima esteja ativa, predominantemente, durante a inflamação^{35,109}, onde efeitos primários do NO, como : vasodilatação, atividade antimicrobiana, atividade anti-agregação plaquetária e indução da permeabilidade vascular (aumento de oxigenação e entrega de nutrientes), são relevantes^{35,109,110}

Esse efeito inicialmente pró-inflamatório do NO no início da fase inflamatória, parece ser convertido em efeito anti-inflamatório no final dessa fase, porque a medida que os níveis de NO aumentam, ocorre uma inibição tanto dos níveis da quimiocina atrativa para monócitos RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted – secretada e regulada pela ativação de linfócitos T normais) quanto da proteína-1 quimioatrativa para macrófagos (MCP-1), produzida pelos queratinócitos proliferativos na borda da ferida, permitindo que o processo de cicatrização siga adiante^{35,109}.

3.2.3.2 Angiogênese

A formação de vasos sanguíneos é indiscutivelmente, um dos componentes mais importantes do processo de cicatrização normal e, o NO, parece desempenhar papel central nesse processo, ativando fatores como VEGF, bFGF e TGF- β ^{36,111}. Dentre esses, VEGF é o fator angiogênico mais potente³⁵.

O VEGF auxilia a si próprio aumentando a produção de NO pelo estímulo de eNOS, o que o capacita o VEGF a desempenhar algumas de suas funções que dependem de NO, como estímulo da migração, diminuição da adesão e organização de células endoteliais no local da ferida - efeitos que também podem depender de NO produzido a partir de iNOS^{35,94}. O NO, por sua vez, aumenta a expressão de VEGF em queratinócitos estimulados, resultando em rápido acúmulo tanto de NO quanto de VEGF no local³⁵.

Na derme, as células endoteliais respondem ao VEGF proliferando e formando tubos capilares. A medida que os capilares se formam, as células endoteliais expressam eNOS que gera ainda mais NO. As concentrações aumentadas de NO protegem o novo tecido contra hipóxia e isquemia induzindo a vasodilatação e protegendo-o contra o dano por reperfusão³⁵.

3.2.3.3 Proliferação

Em geral, a capacidade do NO em regular proliferação é dependente de sua quantidade e da sensibilidade das células a ele. A proliferação de fibroblastos e células musculares lisas, por exemplo, é inibida em baixas concentrações de NO. Em contrapartida, células endoteliais e queratinócitos são estimulados a proliferar em baixas concentrações de NO e são inibidos, *in vitro*, sob condições em que os níveis de NO estão aumentados^{35,36}.

3.2.3.4 Epitelização

Ainda no início da cicatrização, na fase inflamatória, o NO pode estar diretamente envolvido na atração de monócitos e neutrófilos para o local da ferida. Uma vez instaladas, essas células começam a produzir citocinas, entre elas a IL-1, que de acordo com diversos estudos, é modulada pelo NO. Uma vez que a IL-1 é um potente quimioatraente para queratinócitos, sua

modelação pelo NO pode estar envolvida na organização do recrutamento, proliferação e diferenciação dessas células, que são capazes de expressar todas as 3 isoformas de NOS, sendo iNOS fortemente expressa pelos queratinócitos proliferativos localizados na borda da ferida^{104,109}.

O NO derivado de iNOS parece ser fundamental para a reepitelização, como aponta um estudo de Stallmeyer et al¹¹², em que feridas de espessura total provocadas em camundongos e tratadas com inibidor específico para atividade de iNOS, tiveram a quantidade de queratinócitos proliferativos fortemente reduzida, exibiram bordas das feridas com morfologia atrofiada e um processo de reepitelização severamente comprometido em relação aos animais do grupo controle¹¹¹.

3.2.3.5 Deposição de matriz e remodelação

As fases finais da cicatrização requerem aumento da síntese e deposição de colágeno e uma correlação entre NO e deposição de colágeno tem sido bem descrita, tanto em estudos com modelo animal quanto *in vitro*^{36,94,113}.

Na maioria dos estudos *in vivo*, o tratamento de feridas experimentais com doadores de NO, dieta de arginina ou aumento da expressão de iNOS por meio de terapia gênica, tem resultado no aumento do conteúdo de colágeno, ao passo que a inibição de NOS por inibidores competitivos aplicados sistematicamente ou sobre a superfície das feridas, tem diminuído deposição de colágeno, formação do tecido de granulação e resistência do tecido, prejudicando a cicatrização^{36,94}.

Estudos *in vitro* têm demonstrado convincentemente que os fibroblastos derivados de pele humana têm a capacidade de produzir espontaneamente NO, ligado a isoforma eNOS e, após estímulo com IFN- γ e lipopolissacraídeo (LPS), ligado à isoforma iNOS¹⁰⁴. Em outros ensaios, tanto fibroblastos derivados de ferida quanto de pele normal, aumentaram a produção de colágeno após tratamento com doadores de NO e diminuíram a produção após inibição de NOS^{36,113}.

Esses dados em conjunto, sugerem que a síntese de NO seja essencial para o acúmulo de colágeno e aquisição da resistência mecânica da ferida^{104,113,114}. No entanto, é provável que o momento e o nível de produção de NO na cicatrização sejam cuidadosamente balanceados para assegurar seus efeitos benéficos³⁵.

Já no que se refere a remodelação e contração das feridas, evidências do papel do NO não são muito claras. Estudos em camundongos com deficiência tanto em iNOS quanto eNOS, exibiram atraso considerável no fechamento da ferida^{36,115,116}.

3.2.4 *Apresentação clínica*

As úlceras venosas podem ser únicas ou múltiplas e de tamanhos e localizações variáveis, mas normalmente são maiores que a úlceras de etiologia não venosa e em 95% das vezes, elas ocorrem em torno da região maleolar, mais precisamente na região da perneira, assim chamada em referência às botas dos soldados britânicos^{9,45,117}. Normalmente, as úlceras venosas apresentam bordas de forma irregular que podem ser planas ou ligeiramente elevadas. O leito da ferida tende a ser raso e raramente ou nunca, observa-se escaras necróticas ou exposição de tendões⁹. A base geralmente é cor-de-rosa, com tecido de granulação e frequentemente coberta por esfácelo verde-amarelado proveniente da flora bacteriana normal da pele e exsudato abundante decorrente do extravasamento linfático e crescimento bacteriano¹¹⁸.

Outros sinais podem variar de acordo com a severidade da doença, mas algumas alterações típicas da pele, associadas à hipertensão venosa, podem ser observadas antes mesmo do desenvolvimento da úlcera. Essas alterações incluem: varicosidade, edema, dermatite venosa inferior geralmente com hiperpigmentação e lipodermoesclerose associada com espessamento e fibrose do tecido adiposo normal, sob a pele⁸ (Figura 6).

Figura 6 - Foto de úlcera de etiologia venosa em terço distal de membro inferior esquerdo de paciente em tratamento no ambulatório de feridas da Divisão de Cirurgia Plástica HCFMUSP

3.2.5 Classificação CEAP

Em 1994, o Fórum Venoso Americano desenvolveu uma classificação para úlceras venosas baseada em aspectos clínicos (C), etiologia (E), distribuição anatômica (A) e disfunção fisiopatológica (P), a classificação CEAP. A classificação clínica é baseada em sinais clínicos objetivos da doença venosa crônica (C0-6), diferenciando ainda se o paciente é assintomático (A) ou sintomático (S). Essa classificação clínica é organizada em ordem ascendente de severidade da doença (Tabela 1). A classificação etiológica reconhece ainda 3 categorias de disfunção venosa: congênita, primária e secundária (E_c , E_p , E_s). A classificação anatômica descreve a extensão anatômica da doença venosa – se nas veias superficiais (A_s), profundas (A_D) ou perforantes (A_P). A doença pode envolver 1, 2 ou todos os sistemas. Sinais clínicos e sintomas da disfunção venosa podem ser resultantes de refluxo (Pr), obstrução (Po) ou ambos (Pro)⁸.

Tabela 1 - Revisão da classificação CEAP para desordens venosas crônicas

Sistema Básico revisado para a Classificação (CEAP) - Clínica, Etiológica, Anatômica e Fisiopatológica	
CEAP	Definição
<i>Classificação clínica</i>	
C0	ausência de sinais visíveis ou palpáveis de doença venosa
C1	telangiectasias ou veias reticulares
C2	varizes
C3	edema
C4a	pigmentação e/ou eczema
C4b	lipodermatoesclerose e/ou atrofia branca
C5	ulcera venosa cicatrizada
C6	ulcera venosa ativa
Cs	sintomas incluindo dor, espessamento, irritação da pele, pêsco, câibras musculares bem como outras queixas atribuíveis à disfunção venosa
CA	assintomático
<i>Classificação etiológica</i>	
Ec	congenita
Ep	primária
Es	secundária (pós trombótica)
En	ausência de etiologia venosa identificável
<i>Classificação anatômica</i>	
As	veias superficiais
Ap	veias perfurantes
Ad	veias profundas
An	localização venosa não identificada
<i>Classificação fisiopatológica (básica)</i>	
Pr	refluxo
Po	obstrução
Pr,o	refluxo e obstrução
Pn	fisiopatologia venosa não identificada
FONTE: Eklof B et al ⁴² , modificado por Widner JM ¹¹⁹	

Um escore clínico de severidade, baseado no sistema de classificação CEAP (clínico, etiologia, anatomia e fisiopatologia) pode orientar na avaliação de doenças venosas crônicas. A maior pontuação de severidade, de acordo com CEAP, é aplicada a pacientes com úlceras ativas, crônicas (com mais de 3 meses de duração e especialmente, com mais de 12 meses de duração) e grandes (com mais de 6 cm de diâmetro)^{42,117}.

3.2.6 Diagnóstico

Existem diferenças características na apresentação clínica e nos achados ao exame físico, que possibilitam que, em 76% dos casos, o diagnóstico de úlcera venosa seja feito apenas por critérios clínicos^{9,117}. Entretanto, investigações como índice tornozelo-braquial, ultrassonografia colorida com *doppler*, pletismografia e venografia podem ser úteis em casos duvidosos ou para identificar o comprometimento anatômico (veias superficiais, perforantes e profundas, isoladas ou em combinação) e funcional (refluxo venoso, obstrução ou ambos)^{45,117}.

3.2.7 Tratamento

As opções de tratamento para úlcera venosa incluem medidas conservadoras (repouso, elevação da perna, compressão), tratamento local, medicações, substitutos de pele e opções endovasculares e cirúrgicas com os objetivos primários de controlar o edema, cicatrizar a úlcera e evitar sua recorrência^{8,23}. Se as úlceras não fecharem adequadamente com o tratamento padrão, terapias avançadas para feridas são consideradas. Porém, embora exista uma grande variedade de terapias avançadas, sua eficácia, efetividade comparativa e danos não estão bem estabelecidos¹²⁰.

3.2.7.1 Tratamento Conservador

O tratamento por compressão é parte fundamental de qualquer esquema terapêutico proposto para insuficiência venosa crônica (IVC). Em muitos casos,

ela é o único recurso disponível e muitos pacientes devem usá-la para o resto da vida¹²¹.

Os pacientes submetidos à terapia compressiva apresentam um aumento significativo na taxa de cicatrização e queda na taxa de recidiva da ulceração. Contudo, a taxa de desistência do tratamento é alta, porque no início, muitos pacientes não toleram a compressão nas áreas de hipersensibilidade adjacentes á úlceras ativas ou de cicatrização anterior¹¹⁸.

A terapia por compressão modula efeitos da hipertensão venosa facilitando o retorno venoso em direção ao coração, melhorando o funcionamento da bomba da panturrilha e drenagem linfática. Ela também reduz o edema por aumentar a pressão hidrostática local e diminuir a pressão venosa superficial, prevenindo o vazamento de fluidos e macromoléculas , melhorando o fluxo sanguíneo cutâneo e auxiliando a fibrinólise¹⁰.

Diferentes artifícios de compressão estão disponíveis, isso inclui bandagens inelásticas como a bota de Unna, bandagens elásticas, bandagens em multicamadas, aparelhos ortopédicos, bombas de compressão e meias de compressão graduada¹⁰.

O tratamento da úlcera, em geral, inicia-se com a limpeza adequada, que envolve a aplicação de um líquido atóxico para a ferida, capaz de remover do seu leito: excesso de micro-organismos, esfacelo, exsudato e corpos estranhos, incluindo resíduos de pomadas e coberturas anteriores, sem causar danos ao tecido viável¹²².

O desbridamento, que pode ser feito por método cirúrgico, autolítico, biológico e enzimático completa a limpeza inicial, removendo tecidos não viáveis, infectados e hiperqueratósicos. Quando executado de maneira correta, ele ajuda a converter uma úlcera crônica em aguda, com melhora da perfusão do leito da ferida e uma resposta aguda da cicatrização^{1,10}.

3.2.7.2 Curativos e Coberturas

As feridas são normalmente cobertas por curativos sob as bandagens compressivas²³.

Entende-se por cobertura todo o material, substância ou produto que se aplica sobre a ferida, formando barreira física, com capacidade de, no mínimo, cobrir e proteger o seu leito, além de criar um ambiente adequado para o processo de cicatrização. Elas são usadas sobretudo para possibilitar cicatrização rápida e esteticamente aceitável, remoção ou controle do odor, redução de algia, prevenção ou controle de infecção e colonização intensa, absorção de exsudato da superfície da ferida e minimização do incômodo que a lesão provoca¹²².

Em condições ideais, os curativos aplicados diretamente sobre as úlceras devem apresentar algumas propriedades como demonstradas no Quadro1

Quadro 1 - Características ideais de curativos utilizados no tratamento de úlcera venosa.

- ✓ não aderir, para que a remoção seja indolor e não remova epitélio novo e formação
- ✓ ser absorvente, mas ao mesmo tempo, promover um microambiente úmido
- ✓ não deixar material remanescente na ferida
- ✓ agir como membrana semipermeável
- ✓ impermeável a micro-organismos
- ✓ fornecer isolamento térmico
- ✓ estéril
- ✓ atóxico
- ✓ não alergênico
- ✓ fácil disponibilidade
- ✓ relação custo-benefício satisfatório

FONTE: Borges LE, 2011¹²²

Curativos podem ser classificados como primários ou secundários. O curativo primário é colocado diretamente sobre a ferida e deve proporcionar a

absorção dos fluidos e evitar dessecação, infecção e adesão de um curativo secundário. O curativo secundário é aquele colocado sobre o primeiro para proteção absorção, compressão e oclusão adicionais. Existem muitos tipos de curativos desenvolvidos para alcançar as finalidades clínicas desejadas⁵⁰.

3.2.7.2.1 Curativos contendo Prata

A prata tem sido usada por séculos, tanto para propósitos higiênicos quanto para a cicatrização de feridas, graças a seu potente efeito bactericida e atividade antimicrobiana de amplo espectro^{24,40}. Tirando proveito dessas propriedades, diferentes formas de prata: (a) iônica (forma ativa), (b) elementar/metálica (na forma de partículas nanocristalinas), (c) compostos inorgânicos (ex. sulfaziadina) e, (d) compostos orgânicos (ex. prata coloidal) têm sido incorporadas a curativos destinados ao tratamento de úlceras crônicas, podendo estar disposta como revestimento (na superfície externa do curativo), no interior do curativo ou em ambas localizações^{40,123}. Alternativamente, a prata pode ser incorporada, como moléculas de prata complexas, em cremes, pomadas, hidrocolóides, hidrogéis ou a curativos em forma de espuma, que regulam a velocidade de entrega³⁹.

Quando a prata é usada com propósito antimicrobiano é o íon de prata (Ag^+) e não o átomo, que exerce o efeito desejado³⁹. A maioria dos Ag^+ são liberados dos curativos por oxidação (perda de elétron), quando átomos de prata entram em contato com o fluido da ferida, sendo que a taxa duração e pico de liberação variam muito dependendo do tipo de curativo utilizado^{24,39}. Curativos contendo prata metálica, por exemplo, que são fabricados com prata na forma de nanopartículas, liberam prata durante dias, em baixas concentrações²⁴.

Uma vez liberada na ferida, a prata atua na destruição de bactérias por 3 mecanismos: íons de prata ligam-se a parede celular bacteriana causando sua ruptura, inativam enzimas bloqueando a cadeia respiratória e se ligam ao DNA e RNA das bactérias, inibindo a replicação do genoma, transcrição e divisão

celular^{24,39,123}. Essa ação antimicrobiana da prata em múltiplos sítios possivelmente diminua as chances de resistência dos micro-organismos contra ela, diferente dos antibióticos, que geralmente têm apenas uma função celular como alvo¹²⁴.

A eficiência e citotoxicidade de curativos contendo prata no entanto, parecem ser afetadas por fatores como: grau de absorção, metabolização e excreção, capacidade de ligação dos compostos a sítios biológicos, tamanho das partículas, tipo e tamanho da ferida, tempo de exposição, mecanismo de entrega e vulnerabilidade do paciente^{125,126}. Questões como essas entre outras, foram discutidas por grupo de especialistas da Europa, América do Norte, extremo Oriente, África do Sul e Austrália que se reuniram em dezembro de 2011 para fornecer orientações internacionalmente reconhecidas para o uso adequado de curativos contendo prata, baseados em experiências da prática clínica e todas evidências disponíveis. O documento apresenta os mecanismos pelos quais os curativos com prata funcionam, a relação de evidências *in vitro* e *in vivo* para a prática clínica, identifica controvérsias comuns em relação ao uso da prata e fornece uma base lógica para o gerenciamento custo-benefício¹²³.

As diretrizes estabelecidas, depois desse encontro, recomendam que os curativos com prata sejam reservados para feridas infectadas ou com carga microbiana pesada, seguindo rigorosamente as orientações fornecidas pelo fabricante. Recomenda também que o tratamento com prata não exceda 2 semanas, especialmente em crianças, ao menos que exista razão clínica para isso.

A concentração de prata utilizada deve ser a mais baixa possível, apesar de se reconhecer que isso é algo difícil de estimar, já que a quantidade de prata entregue à ferida nem sempre está correlacionada com a quantidade de prata presente no curativo. Em experimentos laboratoriais, concentrações muito baixas de íons de prata (1 ppm ou inferiores) têm se mostrado eficazes contra bactérias, mas não está claro como o teor e disponibilidade de prata medidos em ambiente experimental poderia relaciona-se com o desempenho clínico¹²³.

3.2.7.3 Tratamento Cirúrgico

O tratamento cirúrgico da úlcera venosa pode ser direcionado a eliminar a causa da hipertensão venosa ou tratar a úlcera em si pelo enxerto de pele (autólogo, alogênico, xenogênico). Não há uma operação única aplicável para todos os tipos de úlcera venosa, e a cirurgia é apenas mais um tratamento entre os muitos que podem ser usados. Em princípio, a correção da insuficiência venosa superficial ou das veias perforantes deveria ser feita precocemente. A reconstrução da veia profunda por *by-pass*, *stent* ou plastia das válvulas raramente é indicada e deveria ser feita como último recurso. Veias perforantes incompetentes devem ser pesquisadas por ultrassonografia com Doppler em todos os casos e sua obliteração por técnicas endoscópicas tem mostrado acelerar a cicatrização das úlceras⁵.

3.2.7.4 Tratamentos Inovadores

Atualmente novos protocolos terapêuticos têm sido utilizados no processo de resolução de feridas crônicas⁵⁰: auto enxerto epitelial cultivado, substitutos de pele, terapia com fatores de crescimento e terapia gênica celular. Dentre outros, gostaríamos de destacar o uso de radiação infravermelha.

3.2.8 Efeito da radiação infravermelha na cicatrização

Radiação infravermelha é aquela porção invisível, dentro do espectro eletromagnético, que se estende do final do vermelho (visível) até micro-ondas¹²⁷. Ao contrário das radiações ionizantes (ex. raio X e raio γ), que têm energia suficiente para remover elétrons de átomos e moléculas criando íons

carregados, a radiação infravermelha normalmente induz apenas vibrações e rotações moleculares que podem se manifestar como aumento de temperatura^{128,129}.

De acordo com classificação da Comissão Internacional de Iluminação (CIE) a radiação infravermelha é classificada em 3 subdivisões, apresentadas na (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação CIE para radiação infravermelha

Nome/abreviação	Comprimento de onda	Energia do fóton (Thz)
Infravermelho curto/IR-A	0.7 - 1.4 μm (700 - 1400 nm)	215 - 430
Infravermelho médio/IR-B	1.4 - 3.0 μm (1400 - 3000 nm)	100 - 215
Infravermelho longo/IR-C	3.0-100 μm (3000 nm - 0.1 mm)	3 - 100

FONTE: Vatansever F, Hambling MR²⁷

Uma classificação alternativa, fornecida pela norma ISO 20473, para subdivisão da irradiação infravermelha, é dada na Tabela 3.

Tabela 3 - Padrão ISO 20473 para subdivisão de IR

Nome/abreviação	Comprimento de onda (μm)
Infravermelho curto/NIR	0.78 - 3
Infravermelho médio/MIR	3.0 - 50
Infravermelho longo/FIR	50 - 1000

FONTE: Vatansever F, Hambling MR²⁷

Essas subdivisões refletem, em parte, os efeitos biológicos da radiação infravermelha, que não são uniformes ao longo do espectro; já que a medida que o comprimento de onda da radiação eletromagnética aumenta, o nível de energia por fóton e a profundidade de penetração na pele e tecidos subcutâneos diminuem^{127,129}.

A radiação infravermelha curta (NIR) e luz vermelha visível são ferramentas empregadas há muitos anos na chamada Terapia a Laser de Baixa Intensidade (LLLT), também conhecida como Fotobiomodulação (PBM)¹²⁸. Apesar de existirem diversos estudos *in vitro*, animais e clínicos que demonstrem seus efeitos benéficos, como: aumento da neovascularização, promoção da angiogênese, aumento da síntese de colágeno e promoção da cicatrização de feridas agudas e crônicas, os mecanismos celulares e

moleculares de ação da LLLT/PBM são esclarecidos apenas em alguma extensão¹³⁰. Está razoavelmente bem compreendido que as mitocôndrias sejam o principal alvo intracelular da luz vermelha visível e NIR, que são absorvidas pelos cromóforos mitocondriais como citocromo C oxidase (CCO), a unidade IV da cadeia respiratória mitocondrial^{130,131}.

A cadeia de respiratória mitocondrial (ou cadeia transportadora de elétrons) transporta elétrons de alta energia, por meio dos transportadores de elétrons: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH) e dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂), passando por 4 estruturas transmembrana extremamente complexas embutidas na membrana mitocondrial interna: NADH redutase (complexo I), succinonato desidrogenase (complexo II), citocromo b-c1 (complexo III) e citocromo c oxidase ou CCO (complexo IV), até chegar ao aceitador de elétrons final, o oxigênio molecular, para gerar água. A medida que elétrons de alta energia viajam ao longo da cadeia transportadora de elétrons, a energia é liberada em forma de H⁺ por bombas que lançam prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembrana, gerando um gradiente de prótons (H⁺) para que a enzima ATP sintase (unidade V), no final da cadeia, transforme ADP (difosfato de adenosina) para produzir ATP (trifosfato e adenosina)^{96,131,132,133}.

A CCO, última enzima da cadeia que transfere elétrons para o oxigênio, é composta por dois centros de cobre Cu_A e Cu_B e dois centros heme: heme_A e heme_B e não se liga apenas ao oxigênio^{131,132}. Em tecido sob estresse ou isquêmico, a CCO pode ligar-se também (através do sítio Cu_B) ao NO produzido a partir de uma NOS particular, a NOS mitocondrial (mtNOS), inibindo a respiração celular e diminuindo a síntese de ATP^{131,133,134}.

A absorção dos fótons emitidos pela LLLT/PBM, possivelmente ative a enzima (CCO) pela foto-dissociação da molécula inibidora, NO, do sítio do cobre B (Cu_B). Essa perda de NO permite o transporte de elétrons, consumo de oxigênio e rápido aumento de Adenosina Trifosfato (ATP) e resulta em considerável aumento do potencial de membrana mitocondrial que dá origem a uma breve explosão de ROS e indução de fatores de fatores de transcrição^{27,131}.

Muitos fatores de transcrição são regulados por alterações no estado redox celular. Entre eles fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator 1 induzível por hipóxia (HIF)-1 e fator semelhante ao HIF. Tais fatores de transcrição levam a síntese de proteínas que desencadeiam efeitos posteriores, como aumento da proliferação e migração celular, modulação dos níveis de citocinas, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios e aumento da oxigenação do tecido¹³¹. Acredita-se ainda que além de dissociar NO da CCO, LLLT/PBM também possa causar a dissociação de NO de estoques intracelulares, como formas nitrosiladas tanto da hemoglobina quanto da mioglobina, levando a vasodilatação, o que aumenta a disponibilidade de oxigênio para as células tratadas e o tráfego de células imunes dentro do tecido¹³¹.

Células imunes, aliás, parecem ser fortemente afetadas pela LLLT. Comprimentos de onda específicos são capazes de engatilhar a degranulação de mastócitos, o que resulta na liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α e consequente aumento de infiltração de leucócitos no tecido. LLLT também aumenta a proliferação, maturação e motilidade dos fibroblastos e aumenta a produção de FGF. Os linfócitos se tornam ativados e proliferam mais rapidamente e células epiteliais se tornam mais móveis, permitindo que o local da ferida feche mais rapidamente. A habilidade dos macrófagos em atuar como fagócitos também é aumentada sob a aplicação de LLLT¹³¹.

A radiação infravermelha longa (FIR), especialmente no comprimento de onda entre 8-14 μ m, também tem sido aplicada como recurso terapêutico³⁰ por meio de duas modalidades distintas^{27,30}. A primeira (saunas FIR e alguns geradores de FIR mantidos por eletricidade) usam irradiações ou densidades de potência (dezenas de mW/cm²) que são suficientes para aquecer os tecidos. A segunda (discos de cerâmica, pós e tecidos) não usam potência externa, elas dependem da energia do próprio corpo e têm irradiações tão baixas (0,1 – 5 mW/cm²), que não chegam a ocasionar o aquecimento do tecido quando usadas em temperatura ambiente^{27,28}.

Estudos *in vitro* e *in vivo* (modelos animal e humano) revelam que tanto a modalidade com aquecimento quanto a sem aquecimento, induzem efeitos sobre os tecidos em que atuam, como efeito anti-inflamatório sobre o endotélio vascular¹³⁵, aumento da angiogênese pela ativação de quinases ativadas por

mitógenos (especialmente quinase regulada por sinal extracelular- ERK)¹³⁶, aumento da microcirculação da pele (que reduz o edema do tecido, aliviando a dor)²⁶, aceleração da circulação sanguínea nos tecidos periféricos (que contribui na transferência de mensageiros químicos, elevação da mobilidade dos fluídos corporais devida a diminuição do tamanho dos aglomerados de água)^{32,137}, aumento da imunidade graças à potencialização da ação dos leucócitos¹³⁸, redução da carga microbiana (cepas *S.aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*)¹³⁹, aumento da proliferação de fibroblastos, maior regeneração de colágeno e de infiltração fibroblastos que expressam TGF- β 1 nas feridas³³ e efeito anti-oxidante pelo estímulo à limpeza (*scavenging*) de peróxido de hidrogênio em diferentes tipos celulares^{140,141,142,143}.

Outra contribuição importante da FIR para a cicatrização de feridas é sua capacidade de induzir produção de óxido nítrico (NO)^{26,31,144,145}, que na fase inflamatória da cicatrização, estimula a ação dos macrófagos na remoção de bactérias, de partículas estranhas e de tecido necrosado do leito da ferida, além de atuar no aumento da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular^{35,50}. Apesar dos resultados favoráveis obtidos com uso da FIR, poucas evidências sobre seu mecanismo de ação estão disponíveis³⁰.

Alguns pontos passíveis de questionamento são as similaridades e diferenças que possam existir entre os mecanismos de ação das duas modalidades de FIR (com e sem aquecimento) e se há um grau de similaridade entre as terapias FIR e LLLT/PBM, visto que o principal cromóforo associado à absorção FIR não é CCO e sim água²⁷.

Para Vatansever et al²⁷, o aumento do fluxo sanguíneo observado após a exposição às duas modalidades de FIR, pode ser uma pista que leve a algum esclarecimento. Segundo aos autores, o aumento do fluxo sanguíneo em consequência a exposição a FIR com aquecimento pode ser uma simples resposta ao aumento da termorregulação que ocorre quando o tecido é aquecido; por outro lado, eles especulam que o aumento do fluxo sanguíneo, também observado após a terapia a FIR sem aquecimento, possa ser similar em natureza, aquele observado com a aplicação da terapia LLLT/PMB; em outras palavras, a vasodilatação devida a liberação de NO de seus estoques na CCO bem como do NO ligado a hemoglobina e mioglobina²⁷.

As respostas celulares à FIR de baixa fluência, mesmo sendo essa irradiação incapaz de produzir aquecimento da água nos tecidos, podem, segundo opinião dos pesquisadores, residir no conceito de água nano estruturada, que são finas camadas (nm) que se acumulam sobre superfícies hidrofóbicas como membranas celulares e podem então, ser consideradas como “camadas d’água”. Se essa descrição estiver correta, é razoável assumir que quantidades relativamente pequenas de energia vibracional entregues pela FIR sem aquecimento possam perturbar a estrutura da membrana subjacente a camada de água nanoscópica sem elevar a temperatura.

Pequenas perturbações na estrutura da membrana podem ter grandes efeitos a nível celular se a membrana tiver um canal de íon. Canais de íons (tanto para cátions como para ânions) estão presentes em todas as membranas celulares, mas são particularmente comuns nas membranas mitocondriais. Se os canais de íons mitocondriais, (particularmente canais de cálcio) podem ser abertos por FIR sem aquecimento, aumentando assim a respiração mitocondrial, isso explicaria como os resultados gerais da terapia LLLT e terapia FIR sem aquecimento sejam tão similares²⁷.

Nos últimos anos, pesquisas biomédicas têm se voltado a ciência de materiais, visando o emprego de materiais de biocerâmica nos cuidados à saúde, os chamados materiais cerâmicos emissores de radiação infravermelha longa (cFIR), que quando reduzidos a micro ou nanopartículas, podem ser incorporados a fibras que dão origem a tecidos, roupas e cobertores usados com objetivo terapêutico, como exemplo: melhora da qualidade do sono, aumento da produção de leite em lactantes, alívio de cólicas menstruais e dor nas mãos de paciente com artrite, redução de peso (que pode ser consequência do aumento da circulação e fluxo sanguíneo periférico), tratamento de celulite, entre outros^{27,146}.

Diferente dos dispositivos de FIR alimentados por eletricidade, a fonte de energia que alimenta a emissão de FIR a partir cFIR, vem do corpo; onde a temperatura é normalmente mais elevada que a do meio. Nesse processo, a energia do corpo é transferida para os materiais cerâmicos, que refletem/emitem FIR de volta para o corpo com características de emissão que

dependem da composição do material cerâmico, do tamanho das partículas^{27,146}.

Efeitos da irradiação pela cerâmica na água, incluem redução dos aglomerados de água e enfraquecimento das pontes de hidrogênio da molécula¹⁰⁷. Tal mudança significa que a motilidade das moléculas de água é altamente ativada pela radiação FIR. Consequentemente, pode-se especular que a radiação FIR estimula a penetração de moléculas de água em vários locais dentro dos tecidos e também modula funções dinâmicas de fatores hormonais nos fluidos do corpo³².

Em uma série de estudos empregando biocerâmicas na forma de pó ou discos, Ting-Kai Leung et al observaram um auxílio não térmico e sem suporte elétrico externo para fornecer efeitos físico-biológicos, como aumento considerável da expressão de calmodulina (Cam) e discreto aumento de NO (que aumentou na presença de lipopolissacrídeo) em macrófagos murinos (RAW264.7)³⁰ e geração progressiva e cumulativa de NO intracelular em células humanas de câncer de mama (MCF-7)¹⁴⁷. Os autores também constataram efeitos anti-oxidantes da irradiação com biocerâmicas (6-14 μm) pelo estímulo de “limpeza” de peróxido de hidrogênio em macrófagos murinos (RAW264.7)¹⁴¹, células semelhantes a osteoblastos derivadas de cálcia murina (MC3T3-E1)¹⁴², fibroblastos (NIH3T3)¹⁴⁰ e mioblastos murinos (C2C12)¹⁴³ e efeito anti-inflamatórios tanto (*in vitro*) pela diminuição da produção de prostaglandina (PGE 2) em células de condrosarcoma (SW1353) tratadas com LPS¹⁴⁸, quanto *in vivo*. Em estudo *in vivo*, usando modelo animal de artrite reumatoide, em coelhos, colocados em gaiolas cercadas por folhas de papel cobertas por fina camada de cerâmica emissora de FIR (6-14 μm) durante 7 dias, o mesmo grupo de pesquisadores observou melhora da condição inflamatória caracterizada pela diminuição de fúor – 18 (FDG) detectada por análise de tomografia por emissão de pósitron (PET scan)¹⁴².

Toyokawa et al³³ utilizaram cerâmicas caseiras emissoras de FIR (5,6-25 μm , com intensidade máxima 8-12 μm) para estimular a cicatrização de feridas excisionais de profundidade total em ratos. Após exposição constante a FIR, os autores observaram a aceleração da cicatrização e com base em evidências

histológicas, constataram maior regeneração de colágeno e infiltração de fibroblastos expressando TGF- β 1³³.

Apesar da necessidade de estudos mais aprofundados sobre o uso terapêutico de cFIR, acredita-se que ela possa representar um meio eficiente de radiação de amostras biológicas, já que esse método exhibe apenas efeitos não térmicos quando realizado em temperatura ambiente. Além disso, trata-se de uma terapia não invasiva, acessível e prática, podendo ser usada em casa,^{142,146}.

4 MÉTODO

4.1 Tipo de Estudo

Este é um estudo *in vitro*, prospectivo, controlado, não randomizado, não cego.

4.2 Procedimentos éticos

O estudo teve a provação da CONEP/ Comitê de Ética e Pesquisa HCFMUSP sob o número: CAAE 17101313.3.0000.0068 (Anexo A) e foi realizado em parceria com Rhodia Poliamida e Especialidades e apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ – 454247/2013-3), respeitando contrato de sigilo número 103.655 firmado entre Rhodia Poliamida e Especialidades SA e Hospital das Clínicas da FMUSP.

Antes do início do estudo, a pesquisadora explicou aos participantes os objetivos e metodologia utilizada na pesquisa, além de prestar esclarecimentos quando foram necessários.

A todos os indivíduos convidados a participar do estudo foram assegurados: privacidade, sigilo, ausência de despesas pessoais, disponibilidade da equipe para eventuais esclarecimentos e possibilidade de desvinculação do protocolo a qualquer momento, sem que isso resultasse em prejuízo a continuidade de seu tratamento na instituição.

Após serem suficientemente esclarecidos a respeito das informações constantes no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexos B e C) lidas ou ouvidas por eles, e estarem de acordo com elas, os pacientes

assinaram o termo com a finalidade de autorizar a doação do tecido para pesquisa.

4.3 Local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Cultura Celular e Cicatrização - Laboratório de Investigação Médica (LIM 04 - HCFMUSP), com participação do Laboratório de Investigação em Reumatologia (LIM 17), onde foram feitos os Imunoensaios Multiplex e do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM 31), onde foram realizados os ensaios de imunofluorescência. Testes microbiológicos foram terceirizados pela Controlbio.

4.4 População e coleta das amostras

Fibroblastos oriundos de pele normal (NHF - *normal human fibroblasts*) foram obtidos a partir de amostras de pele não-cicatricial, doadas por 12 pacientes do gênero feminino de idade entre 20 e 50 anos, sem morbidades, submetidas à mamoplastia redutora de caráter estético realizada no Centro Cirúrgico do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (ICHC) por cirurgião plástico membro da equipe de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP. O material foi doado ao nosso grupo com intuito exclusivo de pesquisa.

Fibroblastos provenientes do leito de úlcera venosa (VUF - *venous ulcer fibroblasts*) foram obtidos de 12 pacientes do gênero feminino, faixa etária de 40 a 65 anos, portadoras de úlcera de membros inferiores cuja existência era superior a 6 meses e decorrente de insuficiência venosa com classificação (CEAP) C6 (presença de lesão), sem comprometimento arterial, tratadas no ambulatório de cirurgia plástica do Instituto Central do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses indivíduos não apresentavam comorbidades que pudessem modificar a fisiopatologia das úlceras ou unicamente hipertensão arterial sistêmica, não estavam fazendo uso de corticoides, anti-inflamatórios ou quimioterápicos. Não foram incluídos portadores de úlceras de outras etiologias, bem como, portadores de insuficiência arterial. Todas as feridas apresentavam tecido de granulação em moderada quantidade, pouco ou nenhum tecido necrótico e ausência de sinais clínicos de infecção e não estavam sendo tratadas com curativo contendo prata na sua composição.

4.5 Padronização do Cultivo de Fibroblastos de Pele Normal (NHF- *normal human fibroblasts*) e de Úlcera Venosa (VUF – *venous ulcer fibroblasts*)

Em cabine de segurança biológica, amostras de tecido de pele normal e de tecido de granulação foram lavadas e desinfetadas após serem submetidas à sequência de banhos descrita abaixo:

PBS → etanol 70% → PBS → etanol 70 % → PBS → PBS

Em seguida, as amostras foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 mm² e transferidas para tubos cônicos, contendo solução collagenase IA 1 mg/mL (Sigma: C2674). (Figura 7).

Figura 7 -Imagens fotográficas do processamento dos fragmentos de pele realizado em cabine de segurança biológica

Enzima e fragmentos foram mantidos em refrigeração (4°C) durante 12 horas. Terminada essa etapa, os fragmentos foram submetidos a três ciclos de centrifugação (1500 rpm por 5 minutos), intercalados por lavagem em PBS e aspiração do sobrenadante. Após a última lavagem, o botão celular foi homogeneizado em meio de cultura, por nós, denominado **D₁₀**, composto por 90% de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – (Gibco: 12800-017), acrescido de 10% de soro fetal bovino/SFB (Vitrocell/Embriolife: 11), 1% de antibióticos e antifúngico (estreptomicina 100 µg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL - Gibco: 15240-062) e 1% de L-glutamina - 200 mM (Gibco: 25030-081) e transferido para frasco de cultura celular com superfície de cultivo de 25 cm². As culturas foram mantidas em ambiente com temperatura controlada a 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%. A troca de meio de cultivo foi efetuada a cada 72 horas, até que a superfície do frasco de cultivo apresentasse 70% a 80% de confluência celular (aspecto de subconfluência), momento em que foram amplificadas ou congeladas, para realização dos ensaios subsequentes.

4.6 Substratos têxteis utilizados no estudo e identificação dos grupos

Todos os substratos têxteis em estudo, foram confeccionados, pela Rhodia Poliamida e Especialidades SA, com fio de poliamida 66 com as mesmas características físicas (densidade linear, alongamento, número de filamentos por fio), segundo protocolo desenvolvido pela empresa (Figura 8). As amostras só diferem quanto aos aditivos presentes na matriz polimérica, de acordo com o que segue (Figura 9):

- Testemunha (So): poliamida 66 aditivada com dióxido de titânio (0,3%)
- Prata (Ag): poliamida 66, aditivada com dióxido de titânio (0,3%) e 60 ppm de prata iônica
- Infravermelho (FIR): poliamida 66 aditivada com 2.2% de materiais (mistura de dióxido de titânio, sulfato de bário e aluminossilicato) emissores de infravermelho longo (faixa de comprimento de onda de 5 a 20 micron)

- infravermelho e prata (FIR+Ag): poliamida 66 aditivada com mesmo teor e mesma composição do substrato infravermelho e 60 ppm de prata iônica

A emissão do infravermelho ocorre em ampla faixa de temperatura. Os testes de eficácia *in vivo* (feitos pela Rhodia) foram realizados em temperatura ambiente. Estudos *in vitro* (incluindo análises microbiológicas) foram feitos a 35 – 37°C.

Figura 8 - Aspecto macroscópico das ataduras que deram origem às amostras de 6 mm de diâmetro utilizadas nesse trabalho

Figura 9 - Microfotografia da superfície de amostras das ataduras (a) So, (b) Ag, (c) FIR e (d) FIR+Ag. Aumento 1400 x.(MEV).

4.7 Testes preliminares

Figura 10 -Fluxograma dos ensaios preliminares realizados no estudo

4.7.1 Caracterização por imunofluorescência indireta (ifi) – vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III

Vimentina e colágeno são proteínas com funções estruturais e funcionais sabidamente expressas por fibroblastos^{1,86,149}.

A análise de expressão de vimentina e colágeno dos tipos I e III pelos VUFs neste ensaio, visou auxiliar a caracterização dos VUFs como tais.

Em microplaca preta de fundo chato com 96 poços (Corning 3599), foram semeadas, em meio **D₁₀**, aproximadamente 4×10^3 VUFs, entre 2ª e 4ª passagem, provenientes de 3 pacientes. A placa foi incubada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície dos poços. Passado esse período, o meio **D₁₀** foi substituído. As culturas foram então incubadas nas condições mencionadas anteriormente por 72 horas.

As células cultivadas foram então fixadas às placas de cultivo, o que aconteceu com a retirada do meio **D₁₀**, seguida por duas lavagens dos poços com 100 uL de DPBS (Dulbecco's Tampão Salina Fosfato), adição de paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich P-6148) e manutenção da placa sob refrigeração (a 4°C) até o momento da análise.

Já fixadas, as células foram permeabilizadas com solução de Triton X-100 a 0,1% (Sigma Aldrich 93443) a 4°C por 15 minutos, lavadas com DPBS e bloqueadas com solução 5% de DPBS (Sigma Aldrich A9418) e BSA tipo 3 (*Bovine serum albumine*, albumina bovina; Sigma A4503) por 40 minutos a temperatura ambiente, sob agitação constante.

Os anticorpos primários: anti-vimentina (utilizando 50µL; Flex Monoclonal mouse anti-vimentin clone 9 – ready to use. Dako IR630), anti-colágeno I (diluição 1:100; (rabbit) antibody - Rockland (600.401.103 - 0.5) e anti-colágeno III (diluição 1:100; (rabbit) antibody – Rockland (600.401.105 – 0.1) foram adicionados aos poços e então, a placa foi mantida sob refrigeração (4°C) por 24 horas.

Após esse período, os poços foram lavados com DPBS e acrescidos de uma solução contendo (DPBS + intercalante Hoechst, Thermo Fisher Scientific 33342, diluição 1:1000 + anticorpo secundário 1:1000). Para vimentina, o anticorpo secundário utilizado foi (R-phycoeritrina goat anti mouse, Invitrogen P852 - 1:1000) e para colágeno dos tipos I e III (Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L), Invitrogen/Thermo Fisher Scientific A11008 – 1:1000). Seguiu-se então novo período de incubação por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante, após o qual os poços foram lavados com DPBs e mantidos em 100 uL dessa solução para análise feita em equipamento ImageXpress – Molecular Devices. As células positivas e suas respectivas intensidades foram determinadas usando o software MetaXpress – Molecular Devices. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.7.2 *Ensaio de tempo de duplicação celular (doubling time) de fibroblastos oriundos de pele normal (NHF) e úlcera venosa (VUF)*

Esse teste foi feito na intenção de conhecer o tempo médio de duplicação celular, tanto para NHF quanto para VUF.

Em placas de 24 poços (Corning Costar 3524), 3 amostras de NHF e 6 amostras de VUF entre 2ª e 4ª amplificações, foram semeadas (aproximadamente 10×10^3 / poço) em triplicadas. Após a adesão, os fibroblastos foram mantidos em meio de cultura **D₁₀**. Nos momentos 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas, as células foram soltas dos poços de cultura e contadas em câmara hemocitométrica. Os resultados foram analisados no programa *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software, Inc, USA)¹⁵⁰ e expressos em horas.

4.7.3 *Teste de Viabilidade e Citotoxicidade Celular por MTT*

O MTT (3- (4,5 – dimethylthiazol – 2 –yl) – 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um método colorimétrico no qual enzimas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, reduzem os componentes do tetrazólio a produtos formazan corados. A intensidade da coloração, que pode ser lida em espectrofotômetro, é proporcional a atividade metabólica das mitocôndrias, o que nos permite inferir se o produto em estudo teve alguma ação positiva ou negativa sobre a viabilidade celular^{151,152}.

Em placas de 96 poços (Corning – CLS 3599) foram semeadas, 4×10^3 HFN (n=12) e VUF (n= 9) de 2ª a 4ª passagem, usando meio **D₁₀**. As culturas foram incubadas em incubadora a 37°C e atmosfera de CO₂ 5% por 48 h. Passado esse tempo, o meio **D₁₀** foi substituído por meio fresco e os substratos em estudo (So, Ag, FIR e FIR+Ag) em forma de discos com 6 mm de diâmetro, foram adicionados aos poços. Os mesmos substratos também foram mantidos

em poços sem células durante todo o experimento. A leitura de absorbância destes, correspondeu ao valor “*background*”, descontado da leitura nos valores de absorbância de seus respectivos pares.

Cabe observar que nas placas onde FIR e FIR+Ag foram testados, poços com e sem células foram intercalados, evitando a possibilidade de haver efeito acumulativo da FIR entre poços vizinhos.

Após 24, 48, 72 e 96 h, os poços tiveram meio de cultura e substratos removidos e foram adicionados de uma solução composta por 90% de DMEM e 10% de solução MTT (Sigma C2674) na concentração de 5 mg/mL. Seguiu-se então novo período de incubação (temperatura 37°C – atmosfera de CO₂ – 5%) por 3 horas, após o qual a solução de MTT foi removida e substituída por dimetil sulfoxido (DMSO- Sigma Aldrich – D5879), mantendo incubação por mais 30 minutos.

Após a agitação por 1 minuto, a absorbância foi medida em leitor automático de placas de cultura (Promega) com comprimento de onda de 560 nm, e filtro de referência de 560 nm.

Os poços com meio de cultura, sem células, foram considerados como *background* e o seu valor descontado dos valores obtidos para as demais amostras. Os resultados foram expressos em absorbância.

4.8 Imunofluorescência Indireta para vimentina colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF

Esse ensaio foi realizado para avaliar possíveis efeitos que os substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag) pudessem exercer sobre a expressão de vimentina, colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF pelos VUFs, após 7 dias de exposição.

Em microplacas pretas de fundo chato de 96 poços (Corning 3599), foram semeados, em meio **D₁₀**, aproximadamente 4x10³ VUFs, entre 2^a e 4^a passagem, provenientes de 3 pacientes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas, para que houvesse a adesão das células à superfície dos poços. Passado esse período, o meio **D₁₀** foi

substituído e discos (6 mm) de substratos So (controle), Ag, FIR e FIR+Ag foram adicionados aos poços, em triplicata. As culturas foram então incubadas nas condições mencionadas anteriormente durante 7 dias, sendo que no 3º dia, adicionamos novo meio **D₁₀** e novos substratos a cada poço. A partir daí, as mesmas etapas descritas no item (4.7.1) foram realizadas, utilizando como anticorpos primários: anticorpo para vimentina (50 µL de solução pronta para uso - Flex Monoclonal mouse anti-vimentin clone 9 – Dako IR630), colágeno do tipo I (diluição 1:100; (rabbit) antibody Rockland (600.401.103-0.5), colágeno III (diluição 1:100; (rabbit) antibody -, Rockland 600-401-105-0.1) iNOS (diluição 1:100 (mouse) antibody- Thermofisher Scientific MA5-12184) e VEGF (diluição 1:50 (rabbit) antibody- Thermofisher Scientific PA3-030A). Os anticorpos secundários utilizados, na diluição 1:1000, foram: (Alexa Fluor TM 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, A11008) para colágeno do tipo I, colágeno do tipo III e INOS e (R-phycoeritrina goat anti mouse - Invitrogen P852) para vimentina e VEGF. Os resultados foram expressos em intensidade de fluorescência.

4.9 Ensaio Multiplex

Neste ensaio pretendemos avaliar possíveis efeitos inibitórios ou estimulatórios, que os substratos em estudos pudessem exercer sobre VUFs, quanto a expressão de TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3.

Em placas multipoços de 24 poços, foram semeados, em triplicata, usando meio **D₁₀**, aproximadamente 1×10^4 VUFs oriundos do leito de úlceras venosas (n=6), entre 2ª e 4ª passagem. Após a adesão celular, o meio de cultura foi substituído e 2 discos de 6 mm de cada substrato (So, Ag, FIR e FIR +Ag) foram depositados sobre membranas de *transwells*, que foram adicionados aos poços, com o cuidado de intercalar poços vazios entre aqueles em FIR e FIR+Ag estavam sendo testados, a fim de evitar efeito acumulativo.

As placas foram mantidas incubadas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ por 7 dias, havendo troca dos substratos e adição de meio de cultura no 3º dia.

Passados os 7 dias, os sobrenadantes foram recolhidos, centrifugados (1.500 rpm) sob refrigeração por 5 minutos e congelados - 80°C para posterior análise pelo método de imunoensaio *Multiplex bead-based* (Millipore, MA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Paralelamente a coleta do meio sobrenadante para avaliação por Multiplex, foi realizada a coleta da amostra destinada a dosagem de proteínas totais. Essa coleta consistiu em lavagem dos poços com PBS, seguida pela lise celular provocada pela adição 1000 µL de solução NaOH 0,5M, que ao fim do procedimento foi congelada para posterior análise em espectrofotômetro 280 Å (Nanodrop ND 1000). Os resultados foram expressos em mg/mL.

Os cálculos foram feitos considerados a proporção de analito em relação proteínas total. Proporção essa expressa em ppm.

4.10 Testes Microbiológicos

A prata é um conhecido agente antimicrobiano de amplo espectro. No entanto, questões referentes a custo-benefício, eficácia e toxicidade tem sido levantadas ^{40,123}.

Encomendamos este estudo na intenção de comparar o efeito anitimicrobiano entre FIR e Ag sobre cepas de algumas bactérias comumente presentes em úlceras venosas e dependendo do resultado, levantar a possibilidade de substituir a prata por FIR no futuro.

Amostras dos substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag) foram enviadas a CONTROLBIO onde foram testadas de acordo com a metodologia : *American Association of Textile Chemist and Colorists*: AATCC 100/2012 quanto ao seu potencial antimicrobiano contra cepas de: *Staphylococcus aureus* (ATCC

6538), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (ATCC 33591), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus coagulase negativa* (ATCC 14990), *Enterococcus faecalis* (ATCC 7080), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352). Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da quantidade de bactérias após 24 horas de contato dos substratos com as cepas mencionadas.

4.11 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram organizados em tabelas usando planilha eletrônica MS- Excel (*Microsoft- Office, Microsoft, INC2013*). Para os resultados do ensaio de *doubling time* (4.7.2) foi calculada a média das triplicatas e os dados inseridos no software GraphPad Prism 7 *software (GraphPad Software, Inc, USA)* utilizando-se as funções regressão linear e não-linear.

Para os ensaios de MTT (4.7.3) e Multiplex (4.9) foi usado o pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) em sua versão 9 (SAS Institute Inc., USA). Com a finalidade de avaliar se houve diferença significativa entre os grupos, utilizamos um teste de Análise de Variância para modelos mistos (ANOVA Mixed Models), considerando a ocorrência de efeitos significativos quando o valor $p < 0,05$. Partindo desse princípio, para identificar quais foram os grupos diferentes entre si, fizemos um teste de comparação múltipla pelo método de Turkey.

Para os ensaios de imunofluorescência indireta (4.8) foram empregados os testes ANOVA One Way e Dunnett., utilizando GraphPad Prism Software, Inc., USA, na versão 5.

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia Celular

À microscopia óptica foram observadas diferenças entre NHF e VUF (Figura 11): NHF apresentam formato afunilado regular e com maior índice de confluência celular na placa de cultura, enquanto VUFs apresentaram forma irregular, poligonal, citoplasma alargado, características morfológicas nucleares menos uniformes, além de menor taxa de confluência em cultura.

Figura 11 - .Imagem representativa (a) fibroblastos de pele normal (NHF) e (b) fibroblastos de úlcera venosa (VUF), aumento 100X

5.2 Caracterização por imunofluorescência indireta – vimentina, colágeno do tipo I e colágeno do tipo III

Após cultivo celular sem adição de qualquer estímulo, verificou-se a positividade na fluorescência para sinalização de vimentina, colágeno tipo I e colágeno tipo III como apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Imagem representativa de fluorescência da sinalização para: (a) vimentina, (b) colágeno tipo I e (c) colágeno tipo III pelos VUFs após 72 h de cultivo em meio padrão (**D₁₀**)

5.3 Ensaio de tempo de duplicação celular (doubling time) de fibroblastos oriundos de pele normal (NHF) e de úlcera venosa (VUF)

O tempo de duplicação das NHFs foi 50 ± 8 h (Figura 13). Para VUFs, o tempo de duplicação foi 62 ± 8 h (Figura 14).

Figura 13 - Curva de duplicação celular em relação ao tempo para NHFs

Figura 14 - Curva de duplicação celular em relação ao tempo para VUFs

5.4 MTT – Viabilidade e Citotoxicidade

Não foram observadas variações estatisticamente significativas na absorbância de células NHF e VUF nos quatro momentos estudados quando se comparou a exposição a diferentes estímulos (Figuras 15 e 16). Sugerindo que nenhum dos estímulos foi citotóxico

Figura 15 - Viabilidade de NHFs expostos aos substratos Ag, FIR e FIR+Ag em comparação ao controle (So) ao longo de 24, 48, 72 e 96 h. Valores expressos em absorbância (Abs)

Figura 16 - Viabilidade de VUFs expostos aos substratos Ag, FIR e FIR+Ag em comparação ao controle (So) ao longo de 24, 48, 72 e 96 h. Valores expressos em absorbância (Abs)

5.5 Imunofluorescência indireta para vimentina, colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF

5.5.1 Vimentina

Foi observado aumento da expressão de vimentina pelos VUFs expostos aos substratos (Ag, FIR e FIR+Ag) por 7 dias, quando comparados a CO (Figura 17).

5.5.2 Colágeno tipo I

Não houve diferença estatística significativa na expressão de colágeno tipo I entre VUFs expostos aos diferentes substratos testados (Figura 18).

5.5.3 Colágeno tipo III

Não houve diferença estatística significativa na expressão de colágeno tipo III entre VUFs expostos aos diferentes substratos testados (Figura 19).

5.5.4 iNOS

Foi observado, aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão de iNOS pelos VUFs expostos ao substrato Ag por 7 dias, quando comparados aos VUFs expostos aos demais substratos pelo mesmo período (Figura 20).

5.5.5 VEGF

Não houve diferença estatística significativa na expressão de VEGF entre VUFs expostos aos diferentes substratos testados (Figura 21).

Figura 17 - Avaliação da expressão de vimentina frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (Co), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p=0,0018$)

Figura 18 - Avaliação da expressão de colágeno tipo I frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p=0.197$)

Figura 19 - Avaliação da expressão de colágeno tipo III frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p=0,337$)

Figura 20 - Avaliação da expressão de iNOS frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p=0,002$)

Figura 21 - Avaliação da expressão de VEGF frente a exposição aos diferentes substratos sendo (a) controle (SO), (b) substrato Ag, (c) substrato FIR, (d) substrato FIR+Ag e (e) resposta gráfica, em histograma, dos resultados obtidos ($p = 0,451$)

5.6 Ensaio Multiplex

Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de TGF- β 1, 2 e 3 pelos VUFs em contato com os substratos em estudo.

Figura 22 - Expressão de TGF- β 1,2 e 3, por VUFs expostos aos substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag) durante 7 dias. Resultados expressos em ppm

5.7 Testes microbiológico

Tabela 4 - Redução de carga bacteriana após 24 h de exposição aos diferentes substratos Resultados expressos em %.

	So	Ag	FIR	FIR + Ag
<i>S.aureus</i> (ATCC 6538)	***	97,45	99,81	99,41
<i>S.aureus</i> (MRSA) (ATCC 3359)	***	98,48	98,57	98,33
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	***	99,88	99,99	99,99
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (ATCC 14990)	***	98,35	98,76	98,53
<i>E. faecalis</i> (ATCC 7080)	***	96,85	96,55	96,55
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 9027)	***	99,99	98,78	99,99
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 4352)	65	99,98	90,77	99,98

6 DISCUSSÃO

Úlceras venosas são comuns na prática clínica e representam a forma de manifestação mais grave e debilitante da insuficiência venosa crônica, acarretando dor severa e mobilidade reduzida ao paciente afetado, afetando significativamente sua qualidade de vida^{4,5}.

A presença de infecção e o excesso de células inflamatórias recrutadas em resposta à ela produzem quantidade excessiva de ROS e proteases que degradam componentes da MEC, fatores de crescimento e membranas celulares levando a senescência prematura de fibroblastos, que se acumulam no leito da úlcera venosa em razão de sua resistência à morte apoptótica^{15,49}. Para o combate às bactérias presentes no leito das feridas, compostos contendo prata têm sido utilizados graças a sua atividade antimicrobiana de amplo espectro.

Hoje, apesar da grande variedade de curativos disponível no mercado para tratamento dessas úlceras, não existe o tratamento ideal para todas as feridas²⁴. Diversas modalidades de tratamentos têm sido usadas tanto experimentalmente quanto clinicamente. Entre elas está a radiação infravermelha longa (FIR), especialmente no comprimento de onda entre 8-14 μm ³⁰.

Autores de estudos empregando FIR acreditam que essa radiação possa exercer tanto efeitos térmicos quanto não térmicos sobre os tecidos em que atua²⁶, incluindo efeito anti-inflamatório sobre o endotélio vascular¹³⁵, aumento da angiogênese¹³⁶, redução da carga microbiana¹³⁹ e aumento na proliferação de fibroblastos com maior regeneração de matriz extracelular³³.

Apesar de serem amplamente utilizados no cenário clínico, tanto Ag quanto FIR, permanecem sendo objetos de investigação. A primeira por controvérsias relacionadas a sua possível ação citotóxica e a segunda pelo pouco conhecimento sobre sua influência no processo de cicatrização^{30,40,123}.

O objetivo desse estudo foi avaliar a ação de substratos têxteis emissores de FIR associado ou não à prata iônica sobre fibroblastos oriundos de úlcera venosa (VUFs) quanto a: viabilidade celular (possíveis efeitos citotóxicos), produção de colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF e potencial antimicrobiano frente a cepas de bactérias comumente encontradas no leito de úlceras venosas.

Foram selecionadas pacientes doadoras de pele normal e de fragmentos de leito de úlceras venosas de acordo com os critérios apresentados no item 4.4. Não houveram exclusões durante o tempo de desenvolvimento do estudo.

Apesar de existirem diversos métodos de obtenção celular a partir de fragmentos de tecidos, optamos por digestão enzimática (colagenase IA) para os dois tipos de tecido, pois, em nossa experiência, essa forma de digestão resulta em maior quantidade de células viáveis^{153,154}.

A observação sob microscopia óptica feita após o cultivo (Figura 5.1) revelou diferenças morfológicas entre NHF e VUF, sendo que os últimos apresentaram citoplasma mais alargado e características morfológicas nucleares menos uniformes, assim como foi observado por Stanley et al⁶² ao compararem diferenças morfológicas entre os dois tipos celulares.

Uma vez obtidas, as células foram caracterizadas (item 4.7.1; Figura 12) e expostas aos diferentes estímulos, a saber: So, Ag, FIR e FIR+Ag (Rhodia Poliamida e Especialidades SA, patente europeia EP2676662B1– item 4.6; figuras 8 e 9) para realização de testes preliminares a fim de verificar se os aditivos dos substratos têxteis (prata iônica e partículas emissoras de FIR) seriam tóxicos aos NHF e VUFs (item 4.7.3).

Logo de início, deparamo-nos com um problema técnico que permaneceu em todos os ensaios. Após a retirada dos substratos dos poços de cultura observamos, a olho nu, uma lesão no tapete celular provavelmente provocada pelo instrumental de remoção dos substratos e/ou ainda pela baixa tensão de oxigênio a que as células podem ter sido submetidas-no ponto de contato com substratos (vide Apêndice).

Lesões no “tapete celular” também foram relatadas por Bernard FX et al¹⁵⁵ em trabalho no qual os autores depositaram Tulle Gras (rede de viscosa e vaselina) sobre cultura de fibroblastos humanos.

Essa lesão no tapete celular, nos levou a adotar grupos So (substrato sem aditivos) e não Co (ausência de substrato) como controle dos experimentos. Como a extensão do dano foi variável entre os poços, acreditamos que esse seja responsável, ao menos em parte, pelos grandes desvios-padrão observados no ensaio de MTT (Figuras 15 e 16), que parece não ter demonstrado ação citotóxica da Ag e/ou FIR sobre NHF e VUF ao longo do tempo avaliado.

O ensaio de “*doubling time*” (item 5.3; Figuras 13 e 14) revelou maior tempo de duplicação para VUF em relação a NHF. Esse resultado foi ainda mais evidente em estudos realizados por outros pesquisadores que utilizaram diferentes metodologias^{69,90}. Tomadas em conjunto, as diferenças morfológicas e atraso na multiplicação ao compararmos NHFs com VUFs, são indicativos de que VUFs são células senescentes que parecem estar associadas à deficiência na cicatrização¹⁵.

Concluídos os ensaios preliminares, prosseguimos com ensaios de imunofluorescência indireta para avaliar a expressão de vimentina, colágeno dos tipos I e III, iNOS e VEGF diante da exposição de VUFs aos diferentes estímulos por 7 dias (item 4.8).

Em tecidos adultos, a vimentina é expressa por vários tipos celulares, em particular fibroblastos, células endoteliais e células de linhagem hematopoética¹⁴⁹. Por isso, sua expressão observada no ensaio de imunofluorescência (item 5.5; Figura 17) era prevista. Por outro lado, o aumento dessa expressão decorrente da exposição aos substratos foi um achado que nos surpreendeu. Ao contrário do que se supunha anteriormente, o papel da vimentina não está relacionado somente às propriedades mecânicas e estruturais das células, como reorganização do citoesqueleto e regulação da morfologia e plasticidade celular^{156,157}. Estudos revelam outras funções-chave como: organização de várias proteínas envolvidas na fixação, migração, sinalização e diferenciação celular^{156,157}. Ausência de vimentina leva a prejuízo na cicatrização devido a: fragilidade dos fibroblastos e comprometimento severo de sua capacidade contrátil e migratória^{149,156}, abolição do acúmulo de colágeno¹⁵⁶, deficiência na migração de células inflamatórias¹⁵⁷, comprometimento da integridade do endotélio vascular (provavelmente reflexo

de defeitos na adesão célula-célula)^{156,157}, queratinização limitada e atraso da reepitelização¹⁵⁶. Não temos conhecimento de outros autores que tenham avaliado a ação da prata iônica e/ou FIR sobre a expressão de vimentina por fibroblastos.

Li H *et al*¹⁵⁸, desenvolveram estudo de cicatrização de ferida cutânea de espessura total (*in vivo*), usando camundongos transgênicos microRNA-Pirates 378a (portanto, com função microRNA 378a inibida). Esses animais exibiram processo de cicatrização acelerado em relação aos seus controles, bem como aumento da expressão de vimentina e integrina $\beta 3$, dois moduladores importantes da cicatrização que são moléculas alvo de microRNA 378a e portanto, podem ter expressão resgatada por microRNA- Pirates 378a. Fibroblastos de linhagem NIH/3T3 transfectados (microRNA- Pirates 378a) utilizados no estudo acima citado exibiram maior mobilidade durante ensaios de migração, efeito que foi hipoteticamente atribuído a aumento da expressão de vimentina e integrina $\beta 3$ também observado nessas células.

Como esperado, VUFs expressaram colágeno dos tipos I e III (Figuras 18 e 19) que não foi alterada em nossos ensaios mediante a exposição aos substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag), o que difere de estudos como Toyokawa *et al*³³ e Chiu WH *et al*¹⁵⁹ que discutiremos a seguir.

Também não foram observadas alterações na expressão de TGF- β frente aos diferentes estímulos (Figura 22). O TGF- β compreende um grupo de proteínas extremamente complexo em termos de estrutura, forma (isoformas), funções celulares, tipo de receptores e molécula de sinalização intracelular¹⁶⁰ e recebeu esse nome por acreditar-se, erroneamente, que ele fosse capaz de transformar células normais em malignas³⁵. Três tipos de TGF- β (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ e TGF- $\beta 3$) foram identificados em seres humanos. Essas três isoformas têm ações biológicas semelhantes, mas não idênticas, sobre as células⁸⁹. Dentre eles, o TGF- $\beta 1$ é predominante na cicatrização⁸⁸, onde tem diversas funções¹⁶¹, como: atração de células inflamatórias, recrutamento e proliferação de fibroblastos, estímulo a produção de proteínas da MEC e controle de sua degradação, inibição da produção de iNOS, colaboração na neovascularização (estimulando a produção de VEGF pelos queratinócitos) e no processo de contração da ferida^{35,162}.

Em estudo *in vivo*, Toyokawa *et al*^{β3} construíram racks com paredes forradas por folhas de alumínio revestidas por cerâmicas emissoras de FIR (5,6-25 μm , com intensidade máxima 8-12 μm) e, por meio de aquecedor elétrico, mantiveram a temperatura local constante entre 26,5°C – 27,5°C. Com a utilização do rack descrito, os pesquisadores visavam estimular a cicatrização de feridas excisionais de profundidade total provocadas em ratos. O resultado foi aceleração da cicatrização acompanhada por evidências histológicas do aumento de infiltração de fibroblastos produtores de TGF- β 1 e maior regeneração de colágeno, sem especificar tipos, que foi revelada por coloração Azan Mallory, após 1 semana.

Em outro estudo, usando células de linhagem NIH-3T3 e camundongos atímicos SKH-1 como modelos, Chiu WH *et al*¹⁵⁹ avaliaram se FIR (3 ~25 μm), entregue por cerâmica geradora de FIR (gerador WS™ TY301 – Far IR Medical Technology, Taipei, Taiwan), inibiria sinais de fotoenvelhecimento (diminuição da produção de colágeno do tipo I, aumento da expressão de MMP-1 e MMP-9) induzidos por UV. Como resultado, os autores observaram aumento significativo de pró-colágeno tipo I, provocado pela indução da via TGF β /Smad e inibição do aumento da expressão de MMP-1 e MMP-9 pelas células NIH-3T3. Em modelo animal, os mesmos autores relatam nas análises histológicas da pele em contato com FIR, diminuição da espessura e inibição da degradação de fibras de colágeno, o que nos parece um contrassenso.

Curiosamente, outro grupo de pesquisadores também investigou a ação de aplicação única ou repetida de irradiação infravermelha (com intensidade máxima de 1100 – 1120 nm, tratando-se, portanto, de irradiação infravermelha curta) sobre expressão de pró-colágeno I e MMP1. Os autores usaram como amostra para análise, pele de oriunda de nádega de 20 voluntários, 13 deles receberam irradiação infravermelha curta, uma única vez, entregue por lâmpada; os outros 7 receberam tratamento 3 vezes por semana durante 4 semanas. Ao final do estudo, os autores chegaram à conclusão de que a aplicação única de irradiação infravermelha aumentou a expressão de pró-colágeno do tipo I dentro de 24 horas sem alterar a expressão de MMP1. Em contrapartida, aplicações múltiplas de irradiação infravermelha resultaram na diminuição da expressão de pró-colágeno I e aumento da expressão de

MMP1¹⁶³. Não encontramos na literatura, trabalhos que relacionassem radiação infravermelha longa com expressão de colágeno do tipo III. Encontramos essa correlação apenas para radiação infravermelha curta (700 – 1400 nm).

Fibroblastos de pele humana 1BR3G foram usados para testar os efeitos de um dispositivo de emissão de luz pulsada com filtro de 800-1200 nm (Mini Silk FT). Nesse protocolo, fibroblastos foram irradiados 2 vezes sucessivas com uma frequência de 10 Hz, com fluência total de até 60 J/cm² por 15 s em cada etapa. Após 48 h de incubação, os fibroblastos foram colhidos da placa de cultura e testados quanto a proliferação celular (citometria de fluxo), alteração da expressão gênica (níveis de mRNA para colágeno dos tipos I e III e MMP-1) e produção de proteínas (ácido hialurônico, versicano e decorino). Análises feitas 48 h após a irradiação revelaram que 1BR3G aceleraram a taxa de proliferação e aumentaram a produção de ácido hialurônico e versicano. Um aumento dos mRNA para colágeno dos tipos I e III e MMP-1 também foi revelado pelo ensaio de reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT PCR). Em conclusão, luz pulsada intensa emissora de infravermelho (IV) aplicada em fibroblastos cultivados aumenta sua proliferação e atividade¹⁶⁴.

Fibroblastos humanos cultivados foram irradiados 2 vezes sucessivas com 1.5 J/cm² de laser 532 nm e 1064 nm, respectivamente. mRNA de pró-colágeno, MMPs e TIMPs foram analisados 24 e 48 horas após a irradiação por reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT PCR). Ambos os lasers aumentaram significativamente a expressão de pró-colágeno dos tipos I e III, TIMP1 e TIMP2, mas diminuíram a expressão de MMP1 e MMP2, sendo que aumento/diminuição das taxas pró-colágeno, TIMP e MMP para laser 1064 nm foram maiores que para o laser 532 nm. Demonstrando que ambos os lasers aceleraram efetivamente a síntese de colágeno e inibem sua degradação¹⁶⁵.

Não há, na literatura científica, consenso quanto aos possíveis efeitos da radiação infravermelha quer longa ou curta, sobre fibroblastos humanos oriundos de feridas crônicas, assim temos dificuldade em correlacionar os dados obtidos nesse estudo.

Quanto ao sistema de óxido nítrico (NO) optamos por avaliar a enzima denominada iNOS, pois, ela está envolvida em todas as fases da cicatrização.

A expressão de iNOS foi observada para todos os substratos (So, Ag, FIR e FIR+Ag – item 5.5.4; Figura 20). Na literatura, estudos usando cultura de fibroblastos normais descreveram a expressão de iNOS somente após estímulo com interferon γ recombinante humano (hrINF- γ) e LPS, ao passo que a expressão da isoforma eNOS (não dosada por nós) foi espontânea^{104,166}. A expressão espontânea de iNOS pelos VUFs em cultura é outra característica que os diferencia dos NHFs. Possivelmente, o estímulo para expressão de iNOS tenha sido dado ainda *in vivo*, no ambiente hostil da ulcera de onde essas células foram obtidas.

Também observamos aumento da expressão de iNOS quando VUFs foram expostos à Ag iônica, o que pode sugerir que a prata tenha uma atividade pró-inflamatória, já que é na fase inflamatória da cicatrização que a expressão de iNOS ocorre de forma mais abundante, principalmente por macrófagos estimulados por citocinas pró-inflamatórias e produtos bacterianos, embora fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais também produzam iNOS, em menor extensão, quando estimulados^{35,101}.

É consagrado que NO e ROS sintetizados por macrófagos contribuem para a estase microbiana⁵⁰. Sabe-se também que em situações em que iNOS produz NO em excesso, esse reage com ROS produzidos por polimorfonucleares e macrófagos, formando peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso radical livre com potencial para danificar o tecido¹⁶⁷. Levando isso em conta e considerando que a fonte majoritária de iNOS na úlcera são macrófagos e não fibroblastos¹⁰¹, não sabemos até que ponto o estímulo a produção de iNOS pelos VUFs, dado pela Ag, pode ser prejudicial ou benéfico. O lado prejudicial pressuposto seria o aumento da produção de peroxinitrito com consequente dano ao tecido e o lado benéfico seria o retorno da “ferida”, aqui representada por VUF, para um estado inflamação aguda, retirando-a de um estado de estagnação^{167,168}.

Na fase inflamatória, o NO produzido partir de iNOS, além de atividade anti-microbiana, também tem ação vasodilatadora, anti-agregação de plaquetas e indutora de permeabilidade vascular^{35,36}. Nas fases mais tardias, vários estudos indicam que NO derivado de iNOS esteja fortemente relacionado com síntese e deposição de colágeno^{36,94,113}, proliferação de queratinócitos¹⁰¹ e

contração da ferida¹⁰¹, além de auxiliar VEGF em atividades pró-angiogênicas, como estímulo da migração, diminuição da adesão e organização de células endoteliais, sendo que esses efeitos auxiliares ao VEGF também são prestados por NO sintetizado a partir de eNOS^{35,36}.

Em nosso estudo, a expressão de VEGF, um potente indutor da angiogênese^{35,169}, não foi alterada frente aos diferentes estímulo (Figura 21), o que não chegou a nos surpreender. A expressão de VEGF é induzida em vários tipos celulares (ex. células do músculo liso vascular, fibroblastos, células endoteliais) por fatores de crescimento (TGF- β , bFGF, PDGF), citocinas (IL-1 β e IL-6), NO e por hipóxia. Esses dois últimos aumentam a atividade do fator-1 induzível por hipóxia (HIF-1), um fator de transcrição chave na regulação do gene VEGF. O VEGF produzido, por sua vez, aumenta a produção de NO pela eNOS, estabelecendo um padrão de expressão recíproco entre NO e VEGF que contribui para a regulação da angiogênese em tecidos normais^{169,170}. No entanto, de acordo com Rau CS et al¹³⁶, FIR pode auxiliar o processo angiogênico de modo independente de VEGF. Esses autores avaliaram o efeito angiogênico de FIR entregue por emissor (WS™ TY301 – Far IR Medical Technology, Taipei, Taiwan) sobre células endoteliais de microvasculatura de pele humana e constataram aumento da formação do tubo em gel de MEC e de migração de células através de poros de filtro de poliéster sem aumento correspondente da expressão de VEGF, fosforilação de eNOS e produção de NO e concluíram que os efeitos angiogênicos observados após a exposição a FIR, foram decorrentes da ativação da via MEK/ERK e não da VEGF/Akt/eNOS.

Reconhecendo a eficácia da prata como agente antimicrobiano e ao mesmo tempo pensando nos possíveis efeitos citotóxicos atribuídos a ela^{40,123}, procuramos comparar a eficácia dos substratos contendo prata iônica e/ou FIR no combate a algumas cepas de bactérias comumente encontradas em úlceras venosas. A ação de FIR e FIR+Ag foi comparável à ação da prata (isolada) para maioria das cepas avaliadas, exceto para *K. pneumonia*, que ainda assim teve redução de carga bacteriana de 90,77% para FIR em comparação a 99,98% em relação a Ag e FIR+Ag (Tabela 4). Esses resultados estão de acordo com estudo de Chung et al¹³⁹, que ao utilizarem nanofibras de álcool

polivinílico (PVA) impregnadas com nanopartículas de Germânio (Ge) e dióxido de silício (SiO₂), observaram redução da carga microbiana de *S.aureus* (99,9%), *E.coli* (99,9%) e *K. pneumoniae* (34,8%). Os autores atribuíram menor efeito contra *K.pneumoniae* (Gram negativa) a sua estrutura de parede celular mais complexa em relação às bactérias Gram positivas (*S.aureus*, *E.coli*).

Na fotobioestimulação (luz visível e NIR), a interação da luz com as células é atribuída a excitação de cromóforos intracelulares, como citocromo c oxidase. Esses cromóforos transferem seus elétrons excitados para O₂ nas proximidades, gerando assim baixas concentrações de ROS que tem papel importante na ativação e controle de muitos processos celulares. Esse fenômeno de geração de ROS pela exposição a NIR tem sido explorado com o propósito de esterilização e como erradicação de bactérias em feridas contaminadas¹⁷¹. Não há, na literatura científica, explicação do mecanismo exato da ação da radiação infravermelha sobre as bactérias.

Vários estudos mencionados neste trabalho usaram cerâmicas emissoras de FIR na forma de pó empacotado^{30,147,148}, discos³², folhas de revestimento³³, emissor (WS™ TY301 – Far IR Medical Technology, Taipei, Taiwan)^{136,172} com os mais diferentes propósitos e, normalmente, alcançaram os resultados esperados. Destacamos aqui que em nenhum desses estudos a cerâmica teve contato direto com células ou tecidos. Sendo essa uma diferença marcante entre tais ensaios e os nossos, nos quais o contato foi necessário já que substratos contendo prata (Ag e FIR+Ag) foram comparados em relação ao substrato contendo FIR e, a prata, precisa estar em contato com meio líquido (meio de cultura) para ionizar e desempenhar suas funções^{24,39}.

A radiação infravermelha tem sido utilizada cotidianamente, nas mais diversas apresentações como saunas revestidas por painéis de cerâmicas, dispositivos médicos (geradores de FIR), lâmpadas e cerâmicas incorporadas a cobertores, luvas e vestimentas²⁷. Essas modalidades de tratamento têm resultado em melhora de processos alérgicos, melhora do sono, redução de peso e medidas (em consequentes a melhora da circulação), alívio de cólicas menstruais, redução de celulite, entre outros benefícios²⁷.

Baseados em diversos estudos que atribuem à cerâmica emissora de FIR propriedades anti-inflamatória¹⁴⁸, anti-microbiana¹³⁹ e anti-oxidante^{140,141,142} e aumento da produção de NO^{30,147}, colágeno e expressão de TGF- β ³³, acreditamos que utilização desses produtos como curativo no tratamento adjuvante da cicatrização, onde se insere nosso estudo, parece um campo bastante promissor a ser pesquisado.

7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que o contato com produto têxtil emissor de FIR acrescido ou não de prata, não é citotóxico aos fibroblastos derivados de úlceras venosas (VUFs). O efeito antimicrobiano somado ao estímulo que os substratos exercem sobre a produção de iNOS, nos leva a crer em sua capacidade de retirar a ferida de um estado de estagnação e ao mesmo tempo, em favorecer o processo angiogênico, o que torna o emprego de tais substratos como curativos, uma possível opção para o tratamento de úlceras venosas no futuro.

8 ANEXOS

8.1 Anexo A – Aprovação CONEP/CEP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeitos de radiação infra-vermelha longa associada à prata iônica no leito de feridas crônicas de etiologia venosa

Pesquisador: Cesar Isaac

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17101313.3.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 555.763

Data da Relatoria: 12/03/2014

Apresentação do Projeto:

O estudo buscará analisar os efeitos clínicos de um curativo com substrato têxtil emissor de radiação infravermelha longa e prata em feridas crônicas venosas. Haverá uma parte laboratorial em biopsias desse tecido que originarão culturas de células e nessas células serão analisados o metabolismo do óxido nítrico, capacidade e viabilidade de proliferação dos fibroblastos, síntese de colágenos, síntese de VEGF, FGF α TGF β , Síntese de Metaloproteinases e controle da população bacteriana com o curativo

Objetivo da Pesquisa:

analisar os efeitos clínicos de um curativo com substrato têxtil emissor de radiação infravermelha longa e prata em feridas crônicas venosas e a relação desse curativo com o desenvolvimento fibroblastos e formadores de matriz colágena

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos parecem mínimos, pois envolvem duas pequenas biopsias sob anestesia local no leito da ferida

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 555.763

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pode agregar informação relevante sobre o efeito terapêutico e o mecanismo desse tipo de curativo na cicatrização das feridas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerações atendidas. Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 486/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 13 de Março de 2014

Assinador por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

8.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes submetidas a mastoplastia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . "Efeitos de radiação infra-vermelha longa associada à prata iônica no leito de feridas crônicas de etiologia venosa".

2 PESQUISADOR: **Dr Cesar Isaac** (cargo/função Pesquisador Responsável, Médico, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas - Divisão de Cirurgia Plástica (LIM04) HC-FMUSP e professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, CRM SP: 56.601), **Prof Dr Marcus Castro Ferreira** (cargo/função: Pesquisador orientador, Professor Titular da Faculdade de Medicina da USP responsável pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, CRM: 12.926) e **Silvana Cerejido Altran** (cargo/função: Pesquisadora Executante,Biologista, Mestre em Ciências pela Universidade de São Paulo, CRB-SP: 33196/01-D)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MINÍMO

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

Rubricas: Representante legal:_____

Pesquisador:_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa testar um novo material de curativo para o tratamento de feridas crônicas de pacientes portadores de insuficiência venosa.

Como você decidiu se submeter a uma cirurgia de mastoplastia com finalidade estética gostaríamos de solicitar a doação da pele retirada, que, nesses casos, é geralmente desprezada, porém, pode ter utilidade em estudos como o nosso que visa à obtenção de células da pele para testar no laboratório a ação da substância.

Somente a pele que seria descartada na sua cirurgia será recolhida e utilizada na pesquisa. Não haverá nenhuma alteração no procedimento cirúrgico da mamoplastia, que será realizado da forma proposta pelo seu cirurgião. Nenhum desconforto ou risco é possível uma vez que nada se altera na cirurgia. Apenas o destino da pele retirada será modificado.

Neste projeto não haverá benefício direto para o participante, pois se trata de estudo experimental para avaliar o comportamento das células presentes na pele do corpo humano. O benefício esperado com o estudo será o maior conhecimento da ação de partículas emissoras de radiação infravermelha longa sobre tais células. Dessa forma, essas informações poderão auxiliar os profissionais de saúde a conhecerem melhor essas partículas e utilizá-las para melhorar a assistência prestada no tratamento de feridas.

Caso você deseje e autorize doação do excedente de pele, necessitamos assine esse termo de consentimento livre e esclarecido. Nenhum outro procedimento em você será realizado.

A pesquisa será realizada em laboratório com o excedente de pele que você doou.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O Prof^o Dr.^o Marcus Castro Ferreira, Dr.^o Cesar Isaac e a bióloga Silvana Cereijido Altran poderão ser encontrados no Laboratório de Cultura de Células do LIM dentro da Faculdade de Medicina da USP localizado na Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 1216, Cerqueira César, Telefones: 11 3062-0415. Caso tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 17,18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappelq@hcnet.usp.br

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição;

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

Rubricas: Representante legal: _____

Pesquisador: _____

Você possui o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “ **Efeitos da radiação infravermelha longa associada à prata iônica no leito de feridas crônicas de etiologia Venosa**”

Eu discuti com um dos pesquisadores (Silvana Cereijido Altran, Dr Cesar Isaac ou Prof Dr Marcus Castro Ferreira) sobre a minha decisão em consentir minha participação nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

(para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador Data / /

(carimbo ou letra legível)

8.3 Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para paciente submetido ao tratamento de úlcera venosa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1 TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA . "Efeitos de radiação infravermelha longa associada à prata iônica no leito de feridas crônicas de etiologia venosa".

2 PESQUISADOR: **Dr Cesar Isaac** (cargo/função Pesquisador Responsável, Médico, responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Cultura Celular e Feridas Cutâneas - Divisão de Cirurgia Plástica (LIM04) HC-FMUSP e professor colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica da FMUSP, CRM SP: 56.601), **Prof Dr Marcus Castro Ferreira** (cargo/função: Pesquisador orientador, Professor Titular da Faculdade de Medicina da USP responsável pela Disciplina de Cirurgia Plástica e Chefe da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP, CRM: 12.926) e **Silvana Cerejido Altran** (cargo/função: Pesquisadora Executante,Biologista, Mestre em Ciências pela Universidade de São Paulo, CRB-SP: 33196/01-D)

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MINÍMO

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 36 meses

Rubricas: Representante legal:_____

Pesquisador:_____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa testar um novo material de curativo para o tratamento de feridas crônicas de pacientes portadores de insuficiência venosa.

Será necessário coletar uma amostra do leito da ferida (biópsia), com anestesia local e sem a necessidade de internação hospitalar. A amostra terá o tamanho aproximado de uma moeda de 10 centavos para que no laboratório, possam ser obtidas as células que terão a capacidade de funcionamento avaliada. Este procedimento será realizado durante o curativo inicial e ao final de 30 dias.

Você irá receber um curativo para cobertura da ferida por bandagens. As bandagens usadas em seu curativo são diferentes das convencionais, elas irão conter prata para controlar a infecção e também partículas que emitem raios infravermelhos longos que de acordo com estudos anteriores aceleraram o fechamento da ferida porque atuam na cicatrização.

Nessa pesquisa acompanharemos por 1 mês a cicatrização de sua ferida, após troca diária das bandagens feita por você próprio (a) e, dos curativos feitos semanalmente pela equipe médica do Ambulatório de Feridas Da Cirurgia Plástica do HCFMUSP (CPL7505).

Paralelamente ao exame clínico, observaremos como a ferida está reagindo ao tratamento. Somente o tecido da ferida que seria descartado durante o curativo feito por seu médico é que será destinado às nossas pesquisas, de modo que não haverá nenhuma alteração no curativo habitual a não ser o tipo de bandagem utilizada.

Todo o material excedente será descartado segundo o procedimento padrão estabelecido pela resolução nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Nós garantimos que seu nome será mantido em segredo e que você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento que desejar, sem que a continuidade de seu tratamento na instituição seja prejudicada. As informações obtidas, neste estudo, serão analisadas em conjunto com dados de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas.

Você terá acesso aos responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas e poderá manter-se atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa em qualquer etapa do estudo.

Rubricas: Representante legal: _____

Pesquisador: _____

O principal investigador é o Dr. Cesar Isaac que pode ser encontrado no Laboratório de Cultura de Células do LIM 04 dentro da Faculdade de Medicina da USP localizada na av. Dr. Arnaldo, 455 sala 1216; Cerqueira César, CEP: 01246903 - São Paulo. Telefone(s) (011) 3062-0415.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Não haverá despesas pessoais aos participantes do estudo, exceto pelas despesas com transporte e alimentação que já são habituais em suas visitas ao hospital para a consulta médica e trocas de curativos. Do mesmo modo, não haverá compensação financeira ou benefícios diretos relacionados à sua participação, uma vez que este é um estudo experimental envolvendo células presentes no leito da ferida. Assim sendo, acredito ter sido suficientemente esclarecido(a) a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **"Efeitos de radiação infra-vermelha longa associada à prata iônica no leito de feridas crônicas de etiologia venosa"**

Eu discuti com a pesquisadora Silvana Cereijido Altran/ Dr Cesar Isaac sobre a minha decisão em participar deste estudo. Compreendi quais propósitos da pesquisa, que a doação do tecido de granulação retirado não acrescentará riscos ao meu curativo e que terei direito a receber esclarecimentos relacionados ao estudo.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e de compensação financeira.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento que desejar, sem que isso cause prejuízo ao meu atendimento nesta instituição.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

9 REFERÊNCIAS

1. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-1542.
2. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-289.
3. Albunáte JLCB, Isaac C, de Ladeira PRS, Carvalho VF, Ferreira MC. Úlceras venosas em membros inferiores. *Rev Med (São Paulo).* 2010;89(3/4):158-163.
4. Steed DL, Hill DP, Woodske ME, Payne WG, Robson MC. Wound-healing trajectories as outcome measures of venous stasis ulcer treatment. *Int Wound J.* 2006;3(1):40-47.
5. Angle N, Bergan JJ. Chronic venous ulcer. *BMJ.* 1997;314(7086):1019-1023.
6. O'Donnell TF, Lau J. A systematic review of randomized controlled trials of wound dressings for chronic venous ulcer. *J Vasc Surg.* 2006;44(5):1118-1125.
7. de Araújo IC, Yoshida WB, Abbade LP, Deffune E. The pernicious cycle of VLU's in Brazil: epidemiology, pathogeny and auxiliary healing methods. *J Wound Care.* 2013;22(4):186-188, 190, 192-183.
8. van Gent WB, Wilschut ED, Wittens C. Management of venous ulcer disease. *BMJ.* 2010;341:c6045.
9. Valencia IC, Falabella A, Kirsner RS, Eaglstein WH. Chronic venous insufficiency and venous leg ulceration. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(3):401-421; quiz 422-404.
10. Etufugh CN, Phillips TJ. Venous ulcers. *Clin Dermatol.* 2007;25(1):121-130.
11. Falanga V, Eaglstein WH. The "trap" hypothesis of venous ulceration. *Lancet.* 1993;341(8851):1006-1008.

12. Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet*. 1982;2(8292):243-245.
13. Coleridge S, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296(6638):1726-1727.
14. Borges LE, Caliri MHL. Ulceras Venosas. In: Borges LE, ed. *Feridas-Ulceras de Membros Inferiores*. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan; 2011:25-30.
15. Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg*. 1998;28(5):876-883.
16. Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S, Tekoppele JM, van Els B, Smith A. Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *Br J Surg*. 2008;95(3):319-325.
17. Subramaniam K, Pech CM, Stacey MC, Wallace HJ. Induction of MMP-1, MMP-3 and TIMP-1 in normal dermal fibroblasts by chronic venous leg ulcer wound fluid*. *Int Wound J*. 2008;5(1):79-86.
18. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, et al. The impact of differential expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the chronicity of venous leg ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2006;31(3):306-310.
19. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*. 2009;49(4):1013-1020.
20. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2000;8(1):13-25.
21. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
22. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *J Burn Care Rehabil*. 2005;26(4):306-319.

23. Kolluri R. Management of venous ulcers. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2014;17(2):132-138.
24. Morin RJ, Tomaselli NL. Interactive dressings and topical agents. *Clin Plast Surg*. 2007;34(4):643-658.
25. Meaume S, Senet P, Dumas R, Carsin H, Pannier M, Bohbot S. Urgotul: a novel non-adherent lipidocolloid dressing. *Br J Nurs*. 2002;11(16 Suppl):S42-43, s46-50.
26. Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Hsu YC, Lui WY, Wu CW. Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2006;22(2):78-86.
27. Vatansever F, Hamblin MR. Far infrared radiation (FIR): its biological effects and medical applications. *Photonics Lasers Med*. 2012;4:255-266.
28. Leung TK, Yang JC, Lin YS. The physical, chemical and biological effects by room temperature ceramic far-infrared ray emitting material irradiated water: a pilot study. *J Chin Chem Soc*. 2012;59:589-597.
29. Conrado LA, Munin E. Reduction in body measurements after use of a garment made with synthetic fibers embedded with ceramic nanoparticles. *J Cosmet Dermatol*. 2011;10(1):30-35.
30. Leung T, Lin YS, Chen YC, et al. Immunomodulatory effects of far-infrared ray irradiation via increasing calmodulin and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *Biomed Eng Appl Basis Commun*. 2009;21:317-323.
31. Hsu YH, Chen YC, Chen TH, et al. Far-infrared therapy induces the nuclear translocation of PLZF which inhibits VEGF-induced proliferation in human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30674.
32. Inoué S, Kabaya M. Biological activities caused by far-infrared radiation. *Int J Biometeorol*. 1989;33(3):145-150.
33. Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, et al. Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(6):724-729.
34. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol*. 1992;141(5):1085-1095.

35. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.
36. Schwentker A, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair. *Surg Clin North Am*. 2003;83(3):521-530.
37. Barone V. Fios "inteligentes" são foco da Rhodia. 2011; <http://www.valor.com.br/arquivo/894827/fios-inteligentes-sao-foco-da-rhodia>. Accessed 06 de junho de 2018.
38. Loturco I, Abad C, Nakamura FY, et al. Effects of far infrared rays emitting clothing on recovery after an intense plyometric exercise bout applied to elite soccer players: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Biol Sport*. 2016;33(3):277-283.
39. Vermeulen H, van Hattem JM, Storm-Versloot MN, Ubbink DT. Topical silver for treating infected wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(1):CD005486.
40. Rigo C, Ferroni L, Tocco I, et al. Active silver nanoparticles for wound healing. *Int J Mol Sci*. 2013;14(3):4817-4840.
41. Franková J, Pivodová V, Vágnerová H, Juráňová J, Ulrichová J. Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2016;14(2):e137-142.
42. Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. *J Vasc Surg*. 2004;40(6):1248-1252.
43. Mosti G, De Maeseneer M, Cavezzi A, et al. Society for Vascular Surgery and American Venous Forum Guidelines on the management of venous leg ulcers: the point of view of the International Union of Phlebology. *Int Angiol*. 2015;34(3):202-218.
44. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1964-1974.
45. Abbade LPF. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *An Bras Dermatol*. 2006;81(6):14.
46. Hasan A, Murata H, Falabella A, et al. Dermal fibroblasts from venous ulcers are unresponsive to the action of transforming growth factor-beta 1. *J Dermatol Sci*. 1997;16(1):59-66.

47. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-746.
48. Childs DR, Murthy AS. Overview of Wound Healing and Management. *Surg Clin North Am*. 2017;97(1):189-207.
49. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304-314.
50. Barbul A, Efron DT, Kavalukas SL. Wound Healing. In: Brunickardi CF, Andersen KD, Billiar TR, et al., eds. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10th ed. Mc Graw Hill Education 2015:241-271.
51. Janis JE, Harrison B. Wound Healing: Part I. Basic Science. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(3 Suppl):9S-17S.
52. Young A, McNaught C-E. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2011;29(10).
53. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. *Vasc Endovascular Surg*. 2005;39(4):293-306.
54. Porter S. The role of the fibroblasts in wound healing contraction and healing. *Wounds UK* 2007;3:33-40.
55. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19(3):441-453.
56. Isaac C, de Ladeira PRS, do Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Rev Med (São Paulo)* 2010;89(3/4):125-131.
57. Traversa B, Sussman G. The role of growth factors, cytokines and proteases in wound management. . *Primary Intention*. 2001;9(4):161-167.
58. Grey JE, Enoch S, Harding KG. ABC of Wound assessment. *BMJ*. 2006;332(7536):285-288.
59. Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2010;28(5):519-526.

60. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(2):185-206.
61. Gjodsbol K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J*. 2006;3(3):225-231.
62. Stanley AC, Park HY, Phillips TJ, Russakovsky V, Menzoian JO. Reduced growth of dermal fibroblasts from chronic venous ulcers can be stimulated with growth factors. *J Vasc Surg*. 1997;26(6):994-999; discussion 999-1001.
63. Stanley A, Osler T. Senescence and the healing rates of venous ulcers. *J Vasc Surg*. 2001;33(6):1206-1211.
64. Agren MS, Werthén M. The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds*. 2007;6(2):82-97.
65. el-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol*. 2002;147(2):230-243.
66. Harding KG, Moore K, Phillips TJ. Wound chronicity and fibroblast senescence--implications for treatment. *Int Wound J*. 2005;2(4):364-368.
67. Moore K, Huddleston E, Stacey MC, Harding KG. Venous leg ulcers - the search for a prognostic indicator. *Int Wound J*. 2007;4(2):163-172.
68. Raffetto JD. Dermal pathology, cellular biology, and inflammation in chronic venous disease. *Thromb Res*. 2009;123 Suppl 4:S66-71.
69. Raffetto JD, Mendez MV, Phillips TJ, Park HY, Menzoian JO. The effect of passage number on fibroblast cellular senescence in patients with chronic venous insufficiency with and without ulcer. *Am J Surg*. 1999;178(2):107-112.
70. Armstrong DG, Jude EB. The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2002;92(1):12-18.
71. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 1997;6(5):199-213.

72. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease - Part II: Proteolytic biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1900-1908.
73. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-839.
74. MacColl E, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Vein Structure and Function: Implications in Chronic Venous Disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;355(3):410-428.
75. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):161-174.
76. Pereira SI. *Análise da expressão e atividade da metaloproteinase-9 em fibroblastos do tipo selvagem e nocaute para a Proteína Príon Celular [dissertação]*. Curitiba: Ciências Biológica, Universidade Federal do Paraná; 2011.
77. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol*. 2015;44-46:113-121.
78. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res*. 2013;351(2):255-268.
79. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:463-516.
80. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):187-198.
81. Caley MP, Martins VL, O'Toole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4(4):225-234.
82. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015;44-46:247-254.
83. Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U. Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum Pathol*. 1999;30(7):795-802.
84. Liu YC, Margolis DJ, Isseroff RR. Does inflammation have a role in the pathogenesis of venous ulcers? A critical review of the evidence. *J Invest Dermatol*. 2011;131(4):818-827.

85. Fan K, Tang J, Escandon J, Kirsner RS. State of the art in topical wound-healing products. *Plast Reconstr Surg*. 2011;127 Suppl 1:44S-59S.
86. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009;17(2):153-162.
87. Fukuda TY, Tanji MM, Silva SR, Sato MN, Plapler H. Infrared low-level diode laser on inflammatory process modulation in mice: pro- and anti-inflammatory cytokines. *Lasers Med Sci*. 2013;28(5):1305-1313.
88. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003;83(3):835-870.
89. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg*. 1993;165(6):728-737.
90. Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY. The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: A potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J Vasc Surg*. 1999;30(4):734-743.
91. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
92. Silverthorn DE. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A; 2010.
93. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-526.
94. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin*. 2005;26(3):259-264.
95. Dusse LM, Vieira LM, Carvalho MD. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003;39(4):343-350.
96. Kierszenbaum AL, Tres LT. Sinalização Celular. In: Kierszenbaum AL, Tres LT, eds. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier; 2016:89-121.
97. Barreto RL, Correia CRD. Óxido Nítrico: Propriedades e Potenciais Usos Terapêuticos. *QuimNova*. 2005;28(6):1046-1054.

98. Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido Nítrico. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002;17(6):417-423.
99. Alberts B. *Biologia Molecular da Célula*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
100. Corbett SA. Systemic response to injury and metabolic support. In: Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthaus JB, Pollock RE, eds. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10th ed. New York: Mc Graw Hill; 2015:13-64.
101. Rizk M, Witte MB, Barbul A. Nitric oxide and wound healing. *World J Surg*. 2004;28(3):301-306.
102. Chen AC, Huang YY, Arany PR, Hamblin MR. Role of reactive oxygen species in low level light therapy. *Proc SPIE*. 2009;7165.
103. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-916.
104. Frank S, Kampf H, Wetzler C, Pfeilschifter J. Nitric oxide drives skin repair: novel functions of an established mediator. *Kidney Int*. 2002;61(3):882-888.
105. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*. 1992;176(2):599-604.
106. Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest*. 1997;99(12):2818-2825.
107. Leung TK. In Vitro and In Vivo Studies of the Biological Effects of Bioceramic (a Material of Emitting High Performance Far-Infrared Ray) Irradiation. *Chin J Physiol*. 2015;58(3):147-155.
108. Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg*. 1995;82(12):1598-1610.
109. Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*. 2002;7(1):1-10.
110. Horwitz LR, Burke TJ, Carnegie D. Augmentation of wound healing using monochromatic infrared energy. Exploration of a new technology for wound management. *Adv Wound Care*. 1999;12(1):35-40.

111. Soneja A, Drews M, Malinski T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Rep.* 2005;57 Suppl:108-119.
112. Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol.* 1999;113(6):1090-1098.
113. Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS, Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol.* 1997;158(5):2375-2381.
114. Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, Wasserburg HL, Barbul A. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res.* 1996;63(1):237-240.
115. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest.* 1998;101(5):967-971.
116. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol.* 1999;277(4 Pt 2):H1600-1608.
117. Prakash S, Tiwary Sk, Mishram M, Khanna AK. Venous Ulcer: Review Article. *Surgical Science.* 2013;4(2):144-150.
118. Patel NP, Labropoulos N, Pappas PJ. Current management of venous ulceration. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 Suppl):254S-260S.
119. Widener JM. Venous leg ulcers: Summary of new clinical practice guidelines published August 2014 in the Journal of Vascular Surgery. *J Vasc Nurs.* 2015;33(2):60-67.
120. Greer N, Foman NA, MacDonald R, et al. Advanced wound care therapies for nonhealing diabetic, venous, and arterial ulcers: a systematic review. *Ann Intern Med.* 2013;159(8):532-542.
121. Silva MJC. Insuficiência Venosa Crônica: Diagnóstico e Tratamento Clínico. In: Maffei FHA, Lastóia S, Yoshida WB, Rollo HA, eds. *Doenças Vasculares e Periféricas Vol 2.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002:1591-1617.
122. Borges LE, Caliri MHL. Terapia Topica de Ulcera Venosa. In: Borges LE, ed. *Feridas - Ulceras de Membros Inferiores.* Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan; 2011.

123. International consensus. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. 2012.
124. Bolton L. Are silver products safe and effective for chronic wound management? *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2006;33(5):469-477.
125. Elliott C. The effects of silver dressings on chronic and burns wound healing. *Br J Nurs.* 2010;19(15):S32-36.
126. de Lima R, Seabra AB, Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J Appl Toxicol.* 2012;32(11):867-879.
127. Dover JS, Phillips TJ, Arndt KA. Cutaneous effects and therapeutic uses of heat with emphasis on infrared radiation. *J Am Acad Dermatol.* 1989;20(2 Pt 1):278-286.
128. Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR. Infrared and skin: Friend or foe. *J Photochem Photobiol B.* 2016;155:78-85.
129. Schieke SM, Schroeder P, Krutmann J. Cutaneous effects of infrared radiation: from clinical observations to molecular response mechanisms. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003;19(5):228-234.
130. Spitler R, Ho H, Norpetlian F, et al. Combination of low level light therapy and nitrosyl-cobinamide accelerates wound healing. *J Biomed Opt.* 2015;20(5):051022.
131. Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):516-533.
132. Tsai SR, Hamblin MR. Biological effects and medical applications of infrared radiation. *J Photochem Photobiol B.* 2017;170:197-207.
133. Hamblin M. *The role of nitric oxide in low level light therapy.* Vol 68462008.
134. Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regen Med.* 2016;11(1):107-122.
135. Lin CC, Liu XM, Peyton K, et al. Far infrared therapy inhibits vascular endothelial inflammation via the induction of heme oxygenase-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(4):739-745.

136. Rau CS, Yang JC, Jeng SF, et al. Far-infrared radiation promotes angiogenesis in human microvascular endothelial cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Photochem Photobiol.* 2011;87(2):441-446.
137. Ise N, Katsuura T, Kikuchi Y, Miwa E. Effect of far-infrared radiation on forearm skin blood flow. *Ann Physiol Anthropol.* 1987;6(1):31-32.
138. Yoo BH, Park CM, Oh TJ, Han SH, Kang HH, Chang IS. Investigation of jewelry powders radiating far-infrared rays and the biological effects on human skin. *J Cosmet Sci.* 2002;53(3):175-184.
139. Chung J, Lee S. Development of nanofibrous membranes with far-infrared radiation and their antimicrobial properties. *Fibers Polym.* 2014;15(6):1153-1159.
140. Leung TK, Shang HF, Chen DC, et al. Effects of far infrared rays on hydrogen peroxide-scavenging capacity. *Biomed Eng Appl Basis Commun.* 2011;23(2):99-105.
141. Leung TK, Lin YS, Lee CM, et al. Direct and indirect effects of ceramic far infrared radiation on the hydrogen peroxide-scavenging capacity and on murine macrophages under oxidative stress. *J Med Biol Eng.* 2011;31(5):345-351.
142. Leung TK, Chen CH, Lai CH, et al. Bone and joint protection ability of ceramic material with biological effects. *Chin J Physiol.* 2012;55(1):47-54.
143. Leung TK, Lee CM, Tsai SY, Chen YC, Chao JS. A Pilot Study of Ceramic Powder Far-Infrared Ray Irradiation (cFIR) on Physiology: Observation of Cell Cultures and Amphibian Skeletal Muscle. *Chin J Physiol.* 2011;54(4):247-254.
144. Ikeda Y, Biro S, Kamogawa Y, et al. Repeated sauna therapy increases arterial endothelial nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cardiomyopathic hamsters. *Circ J.* 2005;69(6):722-729.
145. Akasaki Y, Miyata M, Eto H, et al. Repeated thermal therapy up-regulates endothelial nitric oxide synthase and augments angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circ J.* 2006;70(4):463-470.
146. F Martins D. *Neurobiological Mechanisms and Perspectives on Far-Infrared Emitting Ceramic Materials for Pain Relief.* Vol 042014.

147. Leung TK, Lee CM, Lin MY, et al. Far infrared ray irradiation induces intracellular generation of nitric oxide in breast cancer cells. *J Med Biol Eng.* 2009;29:15-18.
148. Leung TK, Liu YC, Chen CH, Fang HN, Chen KC, Lee CM. *In vitro* cell study of possible anti-inflammatory and pain relief mechanism of far-infrared ray emitting ceramic material. *J Med Biol Eng.* 2013;33:179-184.
149. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, et al. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci.* 2000;113 (Pt 13):2455-2462.
150. GraphPad Software I. Graph Pad Software. 2017; <https://www.graphpad.com/>. Accessed 30 november, 2017.
151. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods.* 1995;179(1):95-103.
152. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
153. Wang H, Van Blitterswijk CA, Bertrand-De Haas M, Schuurman AH, Lamme EN. Improved enzymatic isolation of fibroblasts for the creation of autologous skin substitutes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2004;40(8-9):268-277.
154. Takashima A. Establishment of fibroblast cultures. *Curr Protoc Cell Biol.* 2001;Chapter 2:Unit 2.1.
155. Bernard FX, Barrault C, Juchaux F, Laurensou C, Apert L. Stimulation of the proliferation of human dermal fibroblasts in vitro by a lipidocolloid dressing. *J Wound Care.* 2005;14(5):215-220.
156. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF-beta-Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(30):E4320-4327.
157. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res.* 2007;313(10):2050-2062.

158. Li H, Chang L, Du WW, et al. Anti-microRNA-378a enhances wound healing process by upregulating integrin beta-3 and vimentin. *Mol Ther*. 2014;22(10):1839-1850.
159. Chiu HW, Chen CH, Chen YJ, Hsu YH. Far-infrared suppresses skin photoaging in ultraviolet B-exposed fibroblasts and hairless mice. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174042.
160. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg*. 2004;57(3):215-221.
161. Finnson KW, McLean S, Di Guglielmo GM, Philip A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. Vol 2. United States 2013:195-214.
162. Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)*. 2003;39(10):787-800.
163. Kim MS, Kim YK, Cho KH, Chung JH. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mech Ageing Dev*. 2006;127(12):875-882.
164. Cuerda-Galindo E, Diaz-Gil G, Palomar-Gallego MA, Linares-GarciaValdecasas R. Increased fibroblast proliferation and activity after applying intense pulsed light 800-1200 nm. *Ann Anat*. 2015;198:66-72.
165. Dang Y, Ye X, Weng Y, Tong Z, Ren Q. Effects of the 532-nm and 1,064-nm Q-switched Nd:YAG lasers on collagen turnover of cultured human skin fibroblasts: a comparative study. *Lasers Med Sci*. 2010;25(5):719-726.
166. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol*. 1996;106(3):419-427.
167. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, et al. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol*. 2000;191(4):434-442.
168. Morris SM, Jr., Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 1):E829-839.

169. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):49-59.
170. Dulak J, Józkowicz A. Nitric oxide and angiogenic activity of endothelial cells: direct or VEGF-dependent effect? *Cardiovasc Res.* 2002;56(3):487-488; author reply 489-491.
171. Ankri R, Lubart R, Taitelbaum H. Estimation of the optimal wavelengths for laser-induced wound healing. *Lasers Surg Med.* 2010;42(8):760-764.
172. Lin YS, Leung TK, Liao CH, Huang TT, Huang HS, Pan HC. Properties and biological effects of high performance ceramic powder emitting far-infrared irradiation. *Instrum Today.* 2007;6:60-66.

APÊNDICE

Diante da lesão ao “tapete celular” observada após a retirada dos substratos, testamos diferentes formas para depositá-los (Figura 23) e retirá-los (Figuras 24 e 25).

Figura 23 - Fotos do tapete celular após remoção dos substratos depositados de diferentes formas, sendo (a) sem substrato, (b) substrato depositado em poço onde já havia meio **D₁₀**, (c) substrato seco depositado diretamente sobre as células, em poço seco e (d) substrato molhado em meio **D₁₀**, depositado diretamente sobre as células em poço seco. As células foram coradas com solução (formaldeído 3,7%, Rhodamina B 1%).(MO, aumento 100x)

Figura 24 - Fotos do tapete celular após remoção de substratos depositados de acordo com item (b) na figura 23, sendo (a) sem substrato, (b) remoção com pinça, (c) remoção vertendo a placa (MO – aumento 100x).

Figura 25 - Fotos do tapete celular após remoção de substratos depositados de acordo com item (b) na figura 23, sendo (a) sem substrato, (b) remoção com agulha. As células foram coradas com solução (formaldeído 3,7%, Rhodamina B 1%).(MO, aumento 100x)