ARMANDO ROSIQUE COSTA AGUIAR

**Alterações moleculares de fibroblastos presentes no leito da ferida
crônica de portadores de diabetes mellitus submetidos à terapia
por pressão subatmosférica**

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

Versão corrigida

A versão original se encontra disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa
quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2021

ARMANDO ROSIQUE COSTA AGUIAR

**Alterações moleculares de fibroblastos presentes no leito da ferida
crônica de portadores de diabetes mellitus submetidos à terapia
por pressão subatmosférica**

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

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Aguiar, Armando Rosique Costa

Alterações moleculares de fibroblastos presentes
no leito da ferida crônica de portadores de diabetes
mellitus submetidos à terapia por pressão
subatmosférica / Armando Rosique Costa Aguiar. --
São Paulo, 2021.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Clínica Cirúrgica.
Orientador: Cesar Isaac.

Descritores: 1.Metaloproteases 2.Fibroblastos
3.Úlcera cutânea 4.Vácuo 5.Diabetes mellitus
6.Bandagens

USP/FM/DBD-194/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais,
Armando Costa Aguiar e Ineide Rosique Aguiar, que
com fé e determinação demonstram que não há
limites para nossos sonhos,
meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr Cesar Isaac (BOSS), pelo companheirismo e pela orientação e ajuda; pela confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

À Dra Marisa Passarelli 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 do Dr. Rolf Gemperli por possibilitar a realização deste trabalho.

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

À Eliane Falconi Monico Gazetto, pela competência e pelo carinho dedicado aos alunos.

Aos meus irmãos: Herberti e Amanda pelo incentivo e motivação quase que diária.

À minha amada esposa Natasha Rosique, que diariamente tem construído e completado nosso lar junto dos nossos rebentos Antonella e Henrique

Aos meus tios e primos, pela torcida e incentivo

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.

Ao nosso Deus, que dá forças ao cansado, faz grande o quebrantado e usa as coisas vans para confundir as sábias!

RESUMO

Aguiar ARC. *Alterações moleculares de fibroblastos presentes no leito da ferida crônica de portadores de diabetes mellitus submetidos à terapia por pressão subatmosférica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

No leito de úlceras cutâneas de membros inferiores em indivíduos diabéticos ocorre ausência de ordenação das fases do reparo cutâneo, com manifestações celulares e moleculares anormais em todos os estágios da cicatrização levando à cronicidade e não resolução dessas feridas. Há vários fatores que contribuem para justificar tal cronicidade. Os mais significativos são acúmulo dérmico de produtos de glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGEs) e demais proteínas que interagem com ele como: receptores de AGEs (RAGE), inibidores de metaloproteinases (TIMPs) e metaloproteinases (MMPs). Nesse estudo nos propusemos a analisar o microambiente do leito das lesões antes e após a utilização da Terapia por Pressão Negativa ou Subatmosférica (TPN). Os pacientes foram submetidos a biopsias no leito da ferida, pré TPN e após 7 dias quando foi avaliada resposta do leito da ferida e realizada enxertia cutânea nas lesões. Nessas amostras foram analisadas por Western-blot, as concentrações das referidas proteínas. Pudemos observar redução nas concentrações de AGEs (25,49%), de seu receptor RAGE (43,04%) e de MMPs (15,88%), associado ao aumento de TIMPs (24,77%), mesmo onde os marcadores bioquímicos demonstraram DM descompensada em todos pacientes. Esses resultados corroboram com a melhora clínica das úlceras após o uso de TPN. A redução da concentração de AGEs sugere o recomeço da atividade cicatricial, além de reduzir a interação com seu receptor RAGE o que gera menor agravo inflamatório local. A redução de MMPs sugere que o TPN possui uma capacidade de eliminar os resíduos da oxidação celular, promovendo um ambiente com maior teor de regenerabilidade, e conseqüentemente aumenta a expressão de seu regular TIMP. Dessa maneira o TPN, mostra-se uma alternativa consistente para o tratamento de úlceras diabéticas e promissor elemento para redução do período de internação desses pacientes.

DESCRIPTORIOS: Metaloproteinases; Fibroblastos; Úlcera cutânea; Vácuo; Diabetes mellitus; Bandagens.

ABSTRACT

Aguiar ARC. Molecular changes in diabetic chronic wound fibroblasts submitted to subatmospheric pressure therapy [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

Wound management in diabetic patient is an extreme clinical and social concern. The delayed and impaired healing may be justified by several events on the microenvironment. The most significant are the dermal accumulation of Advanced Glycation End Products (AGEs) and other proteins that interact with them, such as: AGEs receptors (RAGEs), metalloproteases (MMPs) and metalloproteases inhibitors (TIMPs). Researches on impaired healing process are proceeding hastily evident by new therapeutic approaches. In this study we aimed to analyze the effects of Sub atmospheric Pressure Therapy (TPN), on the most important healing mediators. Thus summoned patients were submitted to biopsies of the wound bed tissue before and after the use of TPN for 7 days. Proteins were extracted from the tissue samples using a proper method and analyzed by Western Blot. As results, there was a reduction in the concentrations of AGEs (25,49%), its RAGE (43,04%) receptor and MMPs (15,88%), associated with increased expression of TIMPs (24,77%). Our biochemical findings are consistent to the clinical improvement of the healing process. The reduction on AGEs concentration suggests the resumption of healing activities. In addition the decreased interaction with RAGEs suggests less local inflammatory damage. So, TPN seems to be a consistent alternative for treatment of diabetic ulcers even in clinically decompensated patients

DESCRIPTORS: Metalloproteases; Fibroblasts; Skin ulcer; Vacuum; Diabetes; Negative pressure therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Úlcera cutânea em paciente com DM.....	14
Figura 02 -	Dados clínicos da ferida avaliados no momento inicial do plano terapêutico.....	28
Figura 03 -	Critérios descritivos para avaliação clínica local.....	29
Figura 04 -	Plano terapêutico executado.....	31
Figura 05 -	Lesão com tamanho de 7cm x 8cm, leito pobre em tecido de granulação, abundancia de esfacelo e fibrinas e bordas espessas.....	34
Figura 06 -	Lesão pré terapia por TPN.....	36
Figura 07 -	TPN aplicada em ferida após desbridamento cirúrgico.....	37
Figura 08 -	Ferida com tecido de granulação exuberante após retirada de TPN.....	38
Figura 09 -	Enxertia cutânea autóloga em ferida.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 -	Evolução da concentração de CML pré e pós terapêutica.....	41
Gráfico 02 -	Box com a média da variação das concentrações de CML pré e pós terapêutica.....	41
Gráfico 03 -	Evolução da concentração de RAGE pré e pós terapêutica.....	42
Gráfico 04 -	Box com a média da variação das concentrações de RAGE pré e pós terapêutica.....	42
Gráfico 05 -	Evolução da concentração de TIMP1 pré e pós terapêutica	43
Gráfico 06 -	Box com a média da variação das concentrações de TIMP1 pré e pós terapêutica.....	43
Gráfico 07 -	Evolução da concentração de MMP2 pré e pós terapêutica.....	44
Gráfico 08 -	Histograma com a média da variação das concentrações de MMP2 pré e pós terapêutica.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Resultados da avaliação clínica pré e pós TPN1.....	35
Tabela 02 -	Níveis séricos de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e frutossamina apontando médias de: Glicemia de Jejum 118,5 mg/dL, HbA1c 7,41% e Frutossamina 317,37 mcmol/L.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- AGEs: Produtos Finais de Glicação Avançada
- CML: Carboximetil-lisina
- RAGE: Receptores de AGEs
- MMPs: Metaloproteinases
- TIMPS: Inibidores de Metaloproteinases
- TPN: Terapia por Pressão Negativa ou Subatmosférica
- DM: Diabetes Mellitus
- HbA1c: Hemoglobina glicada
- EUA: Estados Unidos da América
- bFGF: Fator básico de crescimento dos fibroblastos
- ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
- NF-κB: Factor Nuclear Kappa B

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	12
1.1.	Tratamento de úlceras cutâneas em indivíduos diabéticos.....	21
2.	Objetivos.....	25
3.	Método.....	26
4.	Resultados.....	34
4.1.	Exemplificação fotográfica do padrão de ferida diabética crônica que abordamos no estudo.....	34
4.2.	Resultado da avaliação clínica (média com DP).....	35
4.3.	Plano terapêutico.....	35
4.4.	Exames bioquímicos.....	40
4.5.	Expressão proteica de CML, RAGE, MMP2 e TIMP1 através do método Western Blot.....	40
5.	Discussão.....	45
6.	Conclusão.....	50
7.	Referências	51

1. Introdução

Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada por um grupo de desordens metabólicas heterogêneas que tem como resultante hiperglicemia por déficit na secreção e/ou ação da insulina¹.

Existem diferentes formas de classificá-la: por idade, tempo de existência, associação a outras entidades fisiológicas ou não, entretanto a classificação mais usual divide o diabetes em 4 tipos: Tipo 1, resultante de destruição de células β -pancreáticas produtoras de insulina; Tipo 2, o qual resulta da resistência periférica a este hormônio; Tipo gestacional e Tipo secundária¹. A prevalência do diabetes vem crescendo em proporções epidêmicas². Atualmente a doença afeta 34,2 milhões de norte-americanos ou 10,5% da população. Cerca de 1,5 milhão de pessoas no EUA são diagnosticados com DM à cada ano. No mundo, evidencia-se 170 milhões de pessoas, sendo esperados 430 milhões para 2030³.

Apenas a glicose plasmática e a hemoglobina glicada (HbA1c) são universalmente aceitas como medidas confiáveis de controle do diabetes. Entretanto, em algumas patologias como insuficiência renal a HbA1c não é confiável⁴.

A frutossamina, que é uma medida de glicação não enzimática de proteínas circulantes, incluindo albumina, globulinas e lipoproteínas torna-se uma alternativa à medição do HbA1c. Como a albumina é a mais abundante das proteínas séricas, a frutossamina é predominantemente utilizada como medida da porcentagem de albumina que é glicada⁵⁻⁶.

O Diabetes Mellitus, quando não tratado, gera complicações, principalmente relacionadas à sua cronicidade. As complicações tardias mais frequentes decorrem

da microangiopatia, levando às doenças cardiovasculares, nefropatia, retinopatia, neuropatia e úlceras nos membros inferiores⁷.

Úlceras cutâneas são uma das morbidades mais prevalentes nesses doentes e que muitas vezes provocam dor, edema e dificuldade de deambulação gerando piora na qualidade de vida de pacientes e seus familiares, pois essa é uma doença na qual o indivíduo depende muito de auxílio. A presença de ulcerações cutâneas é a principal causa de internações hospitalares de pessoas com diabetes no mundo⁸ e ocorrem em até 10,7% dos diabéticos⁹ e precedam 84% de todas as amputações da perna relacionadas ao diabetes¹⁰.

Úlceras cutâneas (Figura 01) são definidas como lesões que envolvem perda de epitélio e que podem se estender à derme e camadas mais profundas, algumas vezes envolvendo ossos e músculos². Usualmente apresentam bordas elevadas e grossas e leito com pouca quantidade de tecido de granulação, podendo apresentar necrose seca e infecção associada.

Figura 01 - Úlcera cutânea em paciente com DM.

A neuropatia diabética sensorial, outra morbidade frequentemente presente na fase crônica do DM, causa insensibilidade à pressão e calor, o que aumenta a probabilidade de desenvolvimento de úlceras e do crescimento em extensão daquelas já existentes^{3, 11}. Já o déficit motor do sistema nervoso periférico acaba criando estresse físico indevido no pé insensível, levando a deformidades

anatômicas (exemplos: pé arqueado, dedos em garra), que contribuem para formação de úlceras¹¹.

O diabético apresenta uma ferida característica associada à perda de sensibilidade principalmente na região plantar denominada de 'pé diabético'.

Em casos crônicos com neuropatia avançada ocorre desabamento plantar e perda motora do pé esse quadro é chamado de 'pé de Charcot'.

Quanto aos aspectos fisiopatológicos da formação dessas úlceras em indivíduos diabéticos, há ausência de ordenação das fases do reparo cutâneo, com manifestações anormais celulares e moleculares em todos os estágios da cicatrização⁷.

Tais feridas frequentemente demoram a se resolver devido às alterações moleculares e celulares que interferem no processo de cicatrização¹². Dentre essas alterações as principais são: elevada concentração de metaloproteinases (MMPs), aumento da reação de estresse oxidativo, formação excessiva de produtos de glicação avançada (*Advanced Glycation End Products* - AGEs), neoangiogênese, sínteses e deposição de colágeno deficientes, concentrações inadequadas de fatores de crescimento e reguladores de expressão gênica¹³⁻¹⁴.

O inibidor tissular das metaloproteínas-1 (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* - TIMP-1) é conhecido por seus efeitos na proliferação celular e anti-apoptótico. Porém com aumento exacerbado de metaloproteinases no leito da ferida há inativação da expressão dos TIMPs¹⁵⁻¹⁶.

O acúmulo dérmico de AGEs tem sido cada vez mais relacionado como causa subjacente no retardo do processo de cicatrização de feridas diabéticas¹³.

A glicação de proteínas caracteriza-se pela reação covalente não enzimática entre a glicose ou outros monossacarídeos redutores com a porção amino-terminal de proteínas, resíduos de lisina e arginina, fosfolípidos e ácidos nucleicos¹⁷.

A reação inicial é lenta e dependente de interação entre carbonilas de açúcares e grupos amino de aminoácidos livres ou seus resíduos em aminofosfolípidos, levando à formação de uma Base de Schiff. O produto Amadori, quimicamente mais estável, pode ser formado subsequentemente. Rearranjos inter e intramoleculares da Base de Schiff e do Produto Amadori e a auto-oxidação de glicose, aminoácidos, corpos cetônicos e ácidos graxos poli-insaturados, podem levar à formação de oxaldeídos, como metilglioxal, glioxal, glicolaldeído e 3-deoxiglicosona. Esses geram rapidamente os AGEs por serem cerca de 300 vezes mais reativos do que a glicose. Embora prevalente no organismo diabético, a reação de glicação também ocorre na doença renal crônica devido às falhas na depuração de intermediários da reação e na doença inflamatória, onde prevalece a formação de oxaldeídos. Sendo assim, a formação de AGE independe exclusivamente da hiperglicemia. Além disso, fontes exógenas de AGE provenientes da dieta e tabaco também contribuem para o total de AGE tecidual e circulante^{12, 18}.

Oxaldeídos podem ser destoxificados pelo sistema glioxalase I e II e aldose redutase, embora pouco seja conhecido sobre a variação individual do grau de expressão destes sistemas enzimáticos e as complicações diabéticas.

Há mais de 30 de tipos descritos de AGEs, entre eles os principais são carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, pirralina, argipirimidina, dímeros de glioxal e metilglioxal e pentosidina¹⁹. Alguns desses são responsáveis por mediar o entrecruzamento de proteínas o que gera prejuízo à matriz tecidual e favorece a retenção de moléculas inflamatórias.

A glicação favorece ligações cruzadas entre moléculas de colágeno, prejudicando a interação entre células e matriz e, conseqüentemente, a migração celular. Glicação de proteínas matriciais induz apoptose celular, contribuindo para a hipocelularidade verificada nas feridas diabéticas. De modo peculiar, fibroblastos expostos à AGEs não apresentam mudanças na taxa de secreção de colágeno I, mas reduzem a síntese de ácido hialurônico^{12, 20}.

Glicotoxinas extracelulares contribuem também para alterar a bioatividade de fatores de crescimento, prejudicando suas estruturas e a de seus receptores¹⁴. Glicotoxinas formadas no citoplasma celular, também, causam deficiências celulares. Um fenômeno em favor dessa afirmação é a modificação do bFGF (fator básico de crescimento dos fibroblastos) nas células endoteliais, com queda na proliferação de fibroblastos e queratinócitos^{12, 21}.

AGEs são reconhecidos por uma gama de receptores celulares, dos quais destaca-se o receptor para AGE (RAGE). A interação AGE/RAGE promove a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativação do NF- κ B o qual promove a transcrição de genes inflamatórios que agravam a lesão na área cicatricial. Além disso, há o estímulo à produção de moléculas de adesão e do próprio RAGE amplificando a sinalização. O RAGE é expresso em diversos tipos celulares e a ativação o eixo AGE/RAGE associa-se ao desenvolvimento e progressão de complicações do DM em diferentes tecidos. Em modelos experimentais, a utilização de RAGE solúvel (o qual apresenta apenas o domínio extracelular do receptor, capaz de se ligar aos AGEs, mas incapaz de transduzir sinal) ou o silenciamento gênico do RAGE previne complicações metabólicas decorrentes de sua ativação pelos AGEs²².

Em macrófagos o RAGE é mediador de efeitos deletérios promovidos pelos AGEs sobre o metabolismo lipídico e inflamação. Macrófagos tratados com albumina-AGE tornam-se mais sensíveis ao estímulo inflamatório por calgranulinas e lipopolissacarídeos. Isto se traduz pela maior secreção de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF- α , quimiocinas (MCP-1) e moléculas de adesão (VCAM-1) que prejudicam o metabolismo de macrófagos não estimulados. Em outras palavras, os AGEs aumentam a reação inflamatória em macrófagos o que, por regulação parácrina, deve modular a resposta anormal de macrófagos derivados de monócitos recém recrutados a um determinado tecido¹².

O acúmulo de AGEs no interstício, sua interação com RAGEs e a formação intracelular de glicotoxinas são as principais alterações no processo de cicatrização de feridas do diabetes melito. As glicotoxinas criam ligações cruzadas aberrantes entre moléculas de colágeno, prejudicando a interação das células com a matriz extracelular e, conseqüente, interferindo na migração celular em geral²².

Estudos clínicos têm demonstrado que o acúmulo de AGEs na matriz extracelular (MEC) está fortemente correlacionado à severidade de feridas diabéticas^{23, 24}.

O estresse do retículo endoplasmático também é desencadeado pelos AGEs, provavelmente em consequência ao estresse oxidativo via ativação dos sistemas NADPH oxidase (NOX4) e mitocondrial, inflamatório e ao acúmulo de colesterol e óxidos de colesterol. Em última instância, esse estresse do retículo endoplasmático vincula-se a vias apoptóticas¹².

A albumina isolada do soro de portadores de diabetes tipo 1 e 2 com controle glicêmico inadequado também afeta adversamente o acúmulo de lípidos em macrófagos, o que é atenuado pela inativação do RAGE. Nestas albuminas, o

conteúdo de carboximetil-lisina (CML) é bastante superior àquele observado em albumina isolada do soro de indivíduos não diabéticos. A compensação glicêmica, refletida pela redução dos valores de HbA1c e albumina glicada reduz o conteúdo de AGE nas albuminas, prevenindo o insulto em macrófagos.

O receptor 1 de produtos de glicação avançada RAGE-1 é apontado como antagonista da via de sinalização do RAGE, favorecendo a expressão de defesas antioxidantes. Sendo assim, o balanço celular entre RAGE e RAGE-1 parece predizer o grau de complicação diabética.

Lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ou baixa (LDL) modificadas por glicação são mais captadas por macrófagos o que favorece o acúmulo intracelular de lípidos e o estresse inflamatório. Por outro, HDL glicada perde seu potencial antiaterogênico, por redução de suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, vasodilatadora e de remoção de lípidos celulares. Isto agrava o dano oxidativo celular no diabetes melito e as complicações crônicas decorrentes dele¹³.

Do ponto de vista vascular, AGEs ainda exercem efeitos que potencializam a resposta vasoconstritora por sequestrarem óxido nítrico e estimularem a produção de endotelina²⁵.

Ocorre também queda na secreção de neuropeptídeos (substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), o que acarreta prejuízo na produção de fatores de crescimento, quimiotaxia e proliferação celulares¹³. A presença de produtos de glicação na mielina dos nervos periféricos a deixa suscetível à fagocitose por macrófagos, contribuindo para desmielinização segmentar. Além disso, evidências sugerem que os AGEs prejudicam regeneração nervosa¹² contribuindo para o comprometimento de componentes motor, sensorial e autônomo do sistema nervoso periférico¹⁸.

O componente autônomo da neuropatia diabética induz à queda da resistência pré-capilar favorecendo o fluxo capilar, aumentando a pressão hidrostática luminal e forças de cisalhamento. A resposta inflamatória gerada, por sua vez, causa espessamento na membrana basal do vaso. Esse resultado final compromete a cicatrização por restringir transporte de nutrientes, induzir queda na capacidade elástica do vaso, com consequentes vasodilatação limitada e isquemia funcional, diminuir hiperemia máxima e prejudicar autorregulação do capilar^{13, 26}.

Alguns marcadores presentes na matriz extracelular demonstram correlação com essa deficiência de cicatrização. Entre eles os AGEs, os quais têm ganhado importância nos estudos científicos como fator essencial no retardo das etapas de reparação tecidual, lentificando ou mesmo impedindo o fechamento adequado das lesões²¹.

A reação de estresse oxidativo celular e tecidual é apontada como elo para as complicações do diabetes. Tais complicações resultam do aumento da metabolização da glicose ao longo da via glicolítica o que aumenta a geração de ROS²⁷, em particular, ânion superóxido, pela mitocôndria. A enzima poli ADP ribose polimerase (PARP) tem sua expressão aumentada nesta condição, impedindo alterações na estrutura do DNA. Em contrapartida, promove a modificação da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) o que impede sua atividade ao longo da via glicolítica. O acúmulo do substrato gliceraldeído 3 fosfato, favorece o desvio de via metabólica com formação de metilglioxal. Esse oxoaldeído promove modificação rápida e irreversível de macromoléculas por glicação avançada, alterando sua estrutura primária e, consequentemente, sua função biológica. Outras vias bioquímicas deletérias promovidas pela hiperglicemia vinculam-se à ativação da via das hexoquinases, via do sorbitol e ativação de proteína cinase C²¹.

O processo de cicatrização dessas úlceras crônicas de membros inferiores em indivíduos diabéticos costuma estacionar na fase inflamatória, com consequente formação prejudicada do tecido de granulação. Acredita-se que quanto mais tempo uma ferida permanece na fase inflamatória, maior a quantidade de defeitos microcelulares acumulados, diminuindo ainda mais a probabilidade de cura espontânea¹³.

1.1 . Tratamento de úlceras cutâneas em indivíduos diabéticos

O tratamento dessas feridas deve ter abordagem multiprofissional: acompanhamento clínico e controle da glicemia; tratamento e prevenção de doenças associadas (vascular e renais principalmente); orientações sobre hidratação cutânea, prevenção de lesões nos membros; cuidados com uso de sapatos e uso de meias elásticas de compressão mínima de 18mmhg para controle de edema local. Em todo esse processo a conscientização dos pacientes e familiares sobre a doença é fundamental.

No tratamento clínico, além da limpeza e cuidados locais, pode ser utilizado agentes desbridantes químicos como papaina e alginato de cálcio, além de hidratantes tópicos com oclusão da ferida. Esse tratamento pode ser resolutivo, quando se tratar de úlceras pequenas e agudas, ou auxiliar na redução da extensão e preparação da lesão para resolução cirúrgica por enxertia cutânea.

No tratamento cirúrgico, a ferida deve ser limpa e o material necrótico desbridado. Se houver sinais de infecção, o tratamento deve incluir antibióticos, de acordo com a cultura e antibiograma da ferida. Nos casos de osteomielite, a terapia antimicrobiana demanda um tempo maior e requer, frequentemente, ressecções cirúrgicas mais amplas.

O leito da ferida deve ser limpo para estimular os mecanismos de cicatrização, e facilitar a ação dos métodos tópicos de tratamento e dos procedimentos cirúrgicos. A função dos curativos está relacionada à absorção do exsudato da ferida e à manutenção de ambiente úmido, que facilita os mecanismos de cicatrização²⁸.

Nesse contexto, destaca-se a Terapia por Pressão Negativa (TPN), nome consagrado para a Terapia Por Pressão Subatmosférica, uma vez que pressão negativa não existe. Nessa terapia utiliza-se esponjas em contato com o leito da ferida, isoladas do meio externos por adesivos plásticos, sobre a qual é aplicada sucção com pressão menor que a pressão atmosférica por período determinado de tempo (até encharcar a esponja ou 5 à 7 dias a depender da avaliação do médico executor da terapia²⁹.

Diversos autores demonstraram que a eficácia da TPN está relacionada à: manutenção do ambiente úmido na ferida, drenagem de exsudato, redução de edema tissular, contração das bordas da ferida, estímulo mecanicamente do leito da ferida, aumento do fluxo sanguíneo nas bordas da ferida e estímulo de angiogênese com formação de tecido de granulação³⁰. Além disso, a TPN pode oferecer proteção contra infecções por microorganismos, pois a ferida é vedada pelo dispositivo. Os efeitos biológicos da TPN no leito da ferida dependem do nível pressórico subatmosférica aplicado³¹⁻³⁴.

Há duas formas de se aplicar a pressão na TPN: forma contínua e intermitente, e um subtipo da intermitente que é a pressão variável, que apresenta oscilações de pressões menos bruscas que a intermitente. A forma intermitente se mostrou mais eficaz na formação de tecido de granulação e contração de feridas, porém um fator que dificulta seu emprego e praticamente inviabiliza seu uso clínico

pela intensa dor ao paciente. Nesse sentido é preferível a utilização da Terapia de Pressão Negativa Contínua (TPNC)³⁵.

A pressão estabelecida no equipamento pode ser variável, porém evidenciou-se que o fluxo sanguíneo apresenta maior nível pressórico quando a pressão da TPN se mantém em 125 mmHg³⁶⁻³⁷.

Há teorias que tentam explicar a melhora do leito da lesão no uso desse método:

- Teoria do Stress Mecânico: quando o dispositivo traciona bordas e leito da lesão, as células também são tracionadas e tendem a se dividir e proliferar³⁸;
- Teoria da redução de edema: a força de sucção gerada pela pressão subatmosférica diminui o líquido intersticial, restaurando o fluxo sanguíneo e linfático local com o recrutamento maior de oxigênio e nutrientes para as células³⁹⁻⁴²,
- Teoria da Modulação da Ação Proteolítica: A eliminação por sucção do excesso de enzimas proteolíticas e proteinases, que normalmente se apresentam elevadas em feridas crônicas, favorecem o processo de cicatrização⁴³.

A TPN já é consagrada no tratamento de feridas de outras etiologias como: úlceras venosas crônicas, queimaduras, traumas agudos com grandes perdas de tecido cutâneo ou exposição de estruturas nobres como ossos, tendões e nervos, entre outras⁴⁴⁻⁴⁵.

Grande parte da literatura indexada disponível destaca melhora clínica de feridas após o uso de TPN⁴⁶. Há evidencia de cicatrização mais rápida com menor tempo de tratamento domiciliar, redução do índice de amputações secundárias, e não evidenciou aumento de complicações como infecções, celulite ou osteomielite^{29, 47}.

Após o preparo do leito, as feridas diabéticas podem evoluir para cicatrização espontânea. Contudo, feridas complexas demandam complementação do tratamento cirúrgico quer pelo uso de enxertos de pele, de retalhos locais ou de retalhos microcirúrgicos.

Até o momento, não existe na literatura um número expressivo de estudos avaliando os efeitos de TPN no microambiente da ferida, em especial sobre a regulação de AGEs em feridas diabéticas. Dessa maneira, nos propomos, nesse trabalho, a avaliar tais alterações nesses microambientes após essa terapia.

2. Objetivos

Avaliar:

- Avaliação sorológica de indicadores bioquímicos de estado glicêmico dos pacientes (glicemia de jejum, hemoglobina glicada e frutossamina)
- Alterações clínicas no leito da ferida promovidas pela TPN
- No leito da ferida:
 - A concentração de produtos de glicação avançada (CML)
 - A expressão de receptores de AGEs: (RAGE)
 - A expressão de inibidores de metaloproteinases: (TIMP1)
 - Concentração de Metaloproteinases (MMP2)

3. Método

Plano de pesquisa

Esse foi um estudo prospectivo, randomizado e controlado sobre alterações cito-moleculares no leito de feridas de indivíduos diabéticos pré e pós-utilização de terapia de pressão subatmosférica (TPN).

O projeto de pesquisa foi executado somente após aprovação pelo CONEP - CEP do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo número: 54487715.0.0000.0068.

Não houve conflito de interesses no desenvolvimento desse estudo.

Casuística

Foram convidados a participar 11 pacientes diabéticos portadores de úlceras em MMII, em acompanhamento no ambulatório de feridas crônicas do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Para o cálculo amostral foi utilizada a fórmula Baseado em Santos, GEO, descrita a seguir ⁴⁸:

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1-p) + e^2 \cdot (N-1)}$$

Onde: n = amostra calculada;

N = população (foi considerada a população de portadores de úlceras diabéticas atendidas no ambulatório de feridas crônicas da Cirurgia Plástica HCFMUSP);

Z = variável normal padronizada associada ao nível de confiança (variável de 95%);

P = verdadeira probabilidade do evento (será considerado o acometimento de 1% da população com úlcera diabética);

e = erro amostral (considerado de 5%).

Todos os pacientes foram orientados sobre o tipo de estudo e suas participações. Após esclarecimento de dúvidas os convocados recebem e assinam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – ANEXO 01) do procedimento, onde constavam riscos e benefícios assim como as etapas do processo e duração de cada parte. Foi assegurado a cada um o sigilo sobre seus dados e a possibilidade de retirar-se do estudo em qualquer momento.

Crítérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos: indivíduos de ambos os gêneros, faixa etária de 46 a 68 anos (média de 58.4 anos), portadores de diabetes mellitus tipo 2 que apresentavam feridas crônicas em membros inferiores com ou sem tratamentos prévios, havia mais de seis meses e sem sinais clínicos de cicatrização. As feridas tinham como características: área superior à 50 cm², bordas sem sinais de epitelização, presença de tecido de granulação em quantidade moderada (50% a 70% da superfície da ferida) a pouca (20% a 30% de superfície), presença de esfacelo, ausência de necrose sólida.

Foram excluídos: pacientes que apresentaram descontinuidade no segmento do estudo, em qualquer das etapas; condições clínicas críticas que impediriam realização de procedimento em centro cirúrgico; doenças autoimunes ou imunossupressoras; contraindicação expressa ao uso de anestésicos ou sedativos; não suportaram uso de TPN pelo tempo prescrito por qualquer circunstância; pacientes incluídos em outro protocolo de pesquisa também não podem participar deste estudo.

Não foram incluídos pacientes não diabéticos ou portadores de comorbidades que interferissem na evolução das feridas como anemias ou doenças inflamatórias de outras etiologias.

Após a anamnese foi realizada coleta de sangue para realização de exames bioquímicos (glicemia de jejum hemoglobina glicada e frutossamina).

Plano terapêutico

No início do estudo (D0), foi preenchida ficha de anamnese (**ANEXO 02**) contendo dados gerais de identificação, histórico da doença, antecedentes pessoais e avaliação clínica da ferida, dando-se ênfase aos critérios apresentados na **FIGURA 02:**

Exame Físico: _____	

Aspecto Do Leito	
Tamanho	
Exsudato	
Granulação	
Esfacelo	_____ % Área Estimado
Necrose	_____ % Área Estimado
Edema: : ☐ sim ☐ não	
Hiperpigmentação: : ☐ sim ☐ não	
Lipodermatoesclerose: : ☐ sim ☐ não	
Varizes: : ☐ sim ☐ não	
Telangiectasia: : ☐ sim ☐ não	
Sangramento: : ☐ sim ☐ não	
Outros: _____	

Figura 02 - Dados clínicos da ferida avaliados no momento inicial do plano terapêutico.

Para padronizar a avaliação foram definidos critérios para resposta de cada item, como demonstrado na **FIGURA 03**:

Tamanho	Meça o maior comprimento e a maior largura usando uma régua graduada em centímetros.	
Exsudato	Pequena quantidade	1 troca / dia – curativo seco
	Moderada quantidade	1 troca / dia – curativo úmido
	Grande quantidade	+1 troca / dia – curativo úmido
Granulação (tecido cor-de-rosa ou vermelho-vivo com um aspecto brilhante, úmida e granulosa)	Pobre	coloração pálida/ esbranquiçada < 50% da área
	Moderada	coloração rósea ≥ 50% da área
	Exuberante	coloração avermelhada > 30% da área
Esfacelo (tecido amarelo ou branco que adere ao leito da ferida em fios ou camadas espessas ou com muco.)	Pequena quantidade	< 30% da área
	Moderada quantidade	Entre 30 e 60% da área
	Grande quantidade	> 60% da área
Necrose: (tecido negro, castanho ou castanho-claro que adere firmemente ao leito da ferida ou aos bordos e que pode estar mais firme ou mole do que a pele circundante)	Pequena quantidade	< 30% da área
	Moderada quantidade	Entre 30 e 60% da área
	Grande quantidade	> 60% da área
Dor (notas)	Escala que varia de 0 (zero) a 10 (dez), onde o 0 significa ausência de dor e o 10 (dor insuportável)	
Conforto com o Tratamento	Escala que varia de -1 (menos um) a 3 (três), onde o -1 significa desconforto 0 indiferente, 1 pouco confortável, 2 moderadamente confortável e 3 bastante confortável	

Figura 03 - Critérios descritivos para avaliação clínica local.

Cada paciente foi então conduzido ao centro cirúrgico onde recebeu sedação com fentanyl e propofol sob monitorização de médico anestesiológico, associado à infusão local de Xylocaina 10%. A área ulcerada foi removida até que se encontrou

tecido vital. Nesse momento foram realizadas biopsias com “punch” descartável de 4mm da borda e do centro da lesão seguido de hemostasia rigorosa.

Os pacientes receberam TPN, da marca VAC. O curativo se iniciou-se com a colocação de uma esponja de poliuretano no exato formato da ferida. A seguir filme plástico aderente foi colocado sobre a espuma, uma porção de 1cm de diâmetro de plástico foi removido e colocada uma ventosa aderente sobre o orifício do filme e que fora conectada a um tubo a qual se liga ao equipamento de aspiração onde realiza a pressão negativa. A pressão programada no sistema foi de 125 mmHg no modo contínuo.

No segundo momento de avaliação D1, no 8º dia, cada paciente foi levado novamente para centro cirúrgico onde, sob as mesmas condições anteriores, retirado o dispositivo de TPN e após limpeza com soro fisiológico 0,9% foi realizada nova avaliação clínica do leito da ferida, seguindo os mesmos critérios anteriores. Na sequência foram realizadas novas biópsias seguindo mesmo padrão da primeira.

Em seguida, foi realizada autoenxertia de pele parcial de espessura fina (0.01 polegadas), retirada com dermatomo elétrico de área íntegra, via de regra na coxa contralateral, denominada área doadora e fixada ao leito com fio inabsorvível monofilamentar de nylon 5-0. A área doadora foi escolhida de acordo com a disponibilidade de cada paciente.

Curativo oclusivo foi realizado no pós-operatório (curativo de Brown – curativo compressivo feito com gazes e fixado pelas bordas com nylon 4-0). Permanecendo o paciente internado por mais 5 dias, quando se avaliou a pega do enxerto, recebendo alta após se integração for maior que 70% do enxerto.

Após a coleta, os fragmentos foram fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,2M e pH 7,2) por 24 horas, à temperatura ambiente. Em

seguida foram desidratados em concentração crescente de etanol, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em blocos de parafina, a 65°C.

Foram avaliados padrões bioquímicos pela dosagem de glicemia, HbA1c e frutossamina, em D0 (zero). Segue figura descrevendo as etapas e ações em cada momento do estudo. **(Figura 04)**

<u>Plano</u> <u>Terapêutico</u>	Pacientes
D0	<ul style="list-style-type: none"> • Entrevista e preenchimento da ficha de anamnese ANEXO 02 • Coleta de sangue para realização de exames bioquímicos • Avaliação clínica do leito da ferida • Coleta de biópsias do leito da lesão, em sala operatória • Desbridamento da ferida e instalação do dispositivo TPN
D1	<ul style="list-style-type: none"> • Retirada do dispositivo de TPN • Reavaliação Clínica do leito da ferida • Coleta de biopsias do leito pós TPN • Resolução cirúrgica de ferida – Enxertia

Figura 04 – Plano terapêutica executado pelo autor.

Ensaio Laboratoriais

Para análise imuno-histológica foram obtidos cortes de 4 micrômetros de espessura em um micrótomo (Leica, RM 2245), coletados em lâminas histológicas. A partir de então, foram quantificados e qualificados os AGEs nas diferentes etapas do processo, permitindo comparações e estudos da evolução do tratamento.

As concentrações de produtos de glicação avançada (CML), expressão de receptores de AGEs (RAGE), além das TIMPS e metaloproteinases (MMP2) foram avaliadas por Western Blot.

As amostras das feridas foram maceradas em nitrogênio líquido a uma velocidade de 1500 rpm por 1 minuto no homogeneizador Mikro dismembrator (Sartorius, ALEMANHA). A seguir, as amostras foram ressuspensas em tampão Tris HCL 10 mM, EDTA 1 mM, sacarose 250 mM e inibidores de protease.

A concentração proteica foi quantificada pelo método de BCA (bicinchoninic acid – Pierce-Thermo Scientific™). Concentrações iguais (40 µg/mL) de cada amostra preparada em Laemmly e β-mercaptoetanol foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, seguindo-se transferência para membrana de nitrocelulose.

O carregamento das bandas foi avaliado por Ponceau e o gel corado com Comassie blue.

Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas, por 24 h, com anticorpos anti-CML (diluição 1:1000 1:1000; abcam, EUA), anti-RAGE (diluição 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), anti-TIMP (diluição 1:1000, (Abcam, Cambridge, MA, EUA)) e anti-MMP (diluição 1:1000, (Abcam, Cambridge, MA, EUA)).

A seguir, houve a incubação com anticorpo secundário anti-rabbit IgG (diluição 1:5000, horseradish peroxidase linked whole antibody - NA93A, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) ou com o anticorpo secundário anti-mouse IgG (diluição 1:2000, NA93A, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido), de acordo com a especificidade referente ao anticorpo primário, e reação de quimioluminescência com ECL (Enhanced Chemiluminescence Reaction; Pierce-Thermo Fisher, EUA).

As bandas foram obtidas e suas intensidades foram avaliadas por densitometria em fotodocumentador (aparelho ImageQuant 300 (GE Healthcare) e software Image Quant TL, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, SW). A densidade

óptica de cada banda foi normalizada pela densidade óptica da expressão de beta-actina (diluição 1:1000, (Fitzgerald Industries International Inc, Concord, MA, EUA), respectiva a cada amostra.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram tabulados em planilha do Microsoft. Excel 2013 e os resultados dos ensaios clínicos e laboratoriais submetidos a testes não paramétricos no programa de computação SPSS.

4. Resultados

4.1. Exemplificação fotográfica de ferida diabética crônica que abordamos no estudo

Figura 05 - Lesão com tamanho de 7cm x 8cm, leito pobre em tecido de granulação, abundancia de esfacelo e fibrinas e bordas espessas.

4.2. Resultado da avaliação clínica (média com DP)

Não foi observada variação estatisticamente significativa na área da lesão. Entretanto, a melhora da qualidade do tecido de granulação foi significativa (**Tabela 01**).

Tabela 01 - Resultados da avaliação clínica pré e pós TPN1.

	Pré TPN	Pós TPN
Tamanho (cm ²)	56,75 ± 3,25	55, 38±4,27
Exsudato	Intenso	Não passível de quantificação pelo método
Granulação	Pobre	Exuberante
Esfacelo (% área estimado)	70	15
Necrose (% área estimado)	6	0

4.3. Plano terapêutico

Exemplificação, por documentação fotográfica (câmera canon semiprofissional sempre ha 40cm de distancia aproximadamente) do plano terapêutico adotado. Coletamos amostras, por exemplo, de um paciente Masculino, portador de DM, com úlcera em membro inferior ha 15 anos, em D0 (**FIGURA 02**), colocado o dispositivo de pressão subatmosférica (**FIGURA 03**) e coleta de novas amostras de D1 (**FIGURA 04**) e enxertia cutânea (**FIGURA 05**) em todos eles.

Figura 06 - lesão pré terapia por TPN.

Figura 07 - TPN aplicada em ferida após desbridamento cirúrgico.

Figura 08 - Ferida com tecido de granulação exuberante após retirada de TPN, após 7 dias.

Figura 09 - Enxertia cutânea autóloga em ferida.

4.4. Exames bioquímicos

Tabela 02 - níveis séricos de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e frutossamina

Paciente	Ref normal	01	02	03	04	05	06	07	08	Média	DP
Glicemia de jejum (mg/dL)	60-99 mg/dl	145	123	110	132	111	117	106	104	118.5	14.15
Hb glicada (%)	Até 6,0%	9,6	6,4	6,2	8,1	7,0	7,6	6,7	7,7	7,41	1,10
Frutossamina (mcmol/L)	205 – 285 mcmol/L	404	296	269	381	331	310	232	316	317.37	55.90

Apontando médias de: Glicemia de Jejum 118.5 mg/dL, HbAc1 7,41% e Frutossamina 317,37 mcmol/L.

4.5. Expressão proteica de CML, RAGE, MMP2 e TIMP1 através do método Western Blot

Do n =11 inicial, três pacientes não apresentaram proteínas suficientes em ao menos uma das etapas e extração, sendo descartados do estudo, totalizando 8 pacientes ao final.

Foi padronizado uma unidade arbitraria para referenciar os resultados, assim a ordem de grandeza é proporcional às amostras dos próprios pacientes.

4.5.1 CML

A diminuição na expressão de CML após a aplicação TPN foi de 25,49% (Gráficos 01 e 02):

Gráfico 01 - Evolução da concentração de CML pré e pós terapêutica.

Gráfico 02 - Histograma com a média da variação das concentrações de CML pré e pós terapêutica.

4.5.2 RAGE

Quanto à expressão de RAGE, a aplicação de TPN promoveu uma redução de 43,04% (Gráficos 03 e 04):

Gráfico 03 - Evolução da concentração de RAGE pré e pós terapêutica.

Gráfico 04 - Histograma com a média da variação das concentrações de RAGE pré e pós terapêutica.

4.5.3 TIMP

Na avaliação das TIPMs, o aumento da expressão após TPN foi de 24,77%

(Gráficos 05 e 06):

Gráfico 05 - Evolução da concentração de TIMP1 pré e pós terapêutica.

Gráfico 06 - Box com a média da variação das concentrações de TIMP1 pré e pós terapêutica.

4.5.4 MMP2

Para as metaloproteinases (MMP2), a redução de expressão promovida pela TPN foi de 15.88% (Gráficos 07 e 08):

Gráfico 07 - Evolução da concentração de MMP2 pré e pós terapêutica.

Gráfico 08 - Histograma com a média da variação das concentrações de MMP2 pré e pós terapêutica.

Todas amostras foram corrigidas pela beta actina e a análise estatística desses experimentos mostrou resultados com $p < 0,002$.

5. Discussão

O Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crônica que gera hiperglicemia por deficiência de secreção e/ou produção de insulina. Apresenta alta prevalência na população com estimativa de 430 milhões de pessoas no mundo até 2030 e até 600 milhões até 2045^{3, 49}.

A grande preocupação pelo aumento epidêmico mundial do diabetes deve-se às complicações inerentes à doença, tais como feridas em membros inferiores que representam para a sociedade, um dos principais ônus em hospitalização, com tratamentos longos e ineficazes, além de amputações e elevada taxa de mortalidade destes doentes^{8, 50}.

Clinicamente tais feridas têm características de bordas irregulares, maceradas, sem sinais de epitelização, com tecido de granulação em pouca quantidade e presença de esfacelo, podendo ou não haver necrose⁵¹.

O tratamento dessas feridas inclui métodos clínicos e cirúrgicos, entre os clínicos, o curativo é o mais frequentemente utilizado. Um vasto arsenal terapêutico, composto por curativos inertes ou coberturas, aqueles contendo princípios ativos, e aqueles que interagem com o leito da ferida como é o caso da terapia por pressão subatmosférica que é capaz de auxiliar no reparo do tegumento em várias situações⁵².

O tratamento exclusivamente clínico comumente é longo e apresenta baixos índices de fechamento espontâneos, além de elevada taxa de recidiva. Nesse sentido, uma tática promissora é a utilização de dispositivos geradores de pressão subatmosférica (TPN). Inicialmente há um desbridamento da lesão seguido da colocação de uma espuma estéril e impermeabilizada com curativo oclusivo conectado a uma bomba de sucção⁵³⁻⁵⁵.

Assim sendo, nesse estudo pretendemos avaliar as modificações clínicas, assim como as alterações bioquímicas encontradas no leito das feridas submetidas à terapia por pressão subatmosférica quanto à: Aspectos clínicos das lesões; níveis plasmáticos de glicose em jejum, HbA1c e frutossamina, (parâmetros universalmente aceitos como medidas de avaliação de controle do diabetes); concentração de produtos de glicação avançada (CML); expressão de receptores de AGEs: RAGE; expressão de inibidores de metaloproteinases: TIMP e Concentração de Metaloproteinases (MMP2) pois tais alterações moleculares interferem no processo de cicatrização¹².

Para tanto, foram selecionados, randomicamente 11 pacientes em acompanhamento no Ambulatório De Feridas Crônicas da Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. De ambos os gêneros, faixa etária de 46 a 68 anos, portadores de diabetes mellitus tipo 2 que apresentavam feridas crônicas em membros inferiores com ou sem tratamentos prévios, há mais de seis meses e sem sinais clínicos de cicatrização. Com área superior à 50 cm², bordas sem sinais de epitelização, presença de tecido de granulação em quantidade moderada (50% a 70% da superfície da ferida) a pouca (20% a 30% de superfície), presença de esfacelo, ausência de necrose sólida. Essa amostra populacional é representativa dos pacientes atendidos no referido serviço⁵⁶.

O plano terapêutico adotado nesse estudo foi baseado na rotina operatória estabelecida em nosso serviço e concorda com Lima et al.⁵⁷.

Os exames laboratoriais dos pacientes estudados apresentaram alterações confirmando não só o diagnóstico de DM, mas também a maior incidência de feridas de MMII em indivíduos diabéticos descompensados³⁻⁶. Os níveis bioquímicos apresentaram médias de: Glicemia de Jejum 118.5 mg/dL, HbAc1 7,41% e

Frutosamina 317.37 $\mu\text{mol/L}$. Mesmo com esses indícios de descompensação glicêmica a lesão apresentou resposta importante ao tratamento, com aumento do tecido de granulação e uma pega do enxerto de maneira satisfatória. Pode inferir assim que, o microambiente da lesão responde ao curativo de pressão subatmosférica mesmo quando os níveis séricos de glicemia estão elevados⁵⁸.

Clinicamente pudemos verificar a melhora do tecido de granulação, com crescimento de pobre no pré a exuberante no pós-tratamento, associada à redução importante do esfacelo (pré = 70% e pós = 15%) e remoção completa da necrose. O tempo curto do uso do curativo TPN (7 dias) não permitiu verificar uma redução do tamanho das úlceras (pré = $56,75 \pm 3,25$ e pós = $55,38 \pm 4,27$). Tais resultados confirmam o que a literatura médica indexada descreve⁵⁸.

Avaliando o microambiente dessas feridas, podemos confirmar a presença dos marcadores de anticorpos (anti-AGEs, anti-RAGE, anti-MMP2 e anti-TIMP1) e que os mesmos apresentam alterações do comportamento antes e após a terapêutica, corroborando com o que clinicamente evidenciamos nesse tratamento de pressão subatmosférica local.

Como evidenciado na literatura, o leito de feridas não tratadas contem elevadas concentrações de AGEs e de metaloproteinases. Isso corrobora com a evidencia que esses componentes dificultam e prolongam a etapa inflamatória da cicatrização, impedindo o fechamento das lesões^{13, 15}.

Conforme Karam et al., o nosso trabalho evidenciou que os marcadores TIMP1 e MMP2 tendem a serem antagonistas no leito das feridas tratadas com TPN, havendo um crescimento de expressão de um enquanto o outro marcador é suprimido. Os valores de TIMP1 subiram substancialmente enquanto que os de MMP2 caíram⁵⁹.

A elevação da expressão TIMP1 após o tratamento sugere que eles são suprimidos quando há excesso da interação AGE/RAGE e sua oxidação tecidual, com hiperexcitação de macrófagos, ocasionando um aumento de glicotoxinas, metaloproteinases e enzimas das cadeias pró apoptóticas¹⁵.

Houve a queda importante da concentração local de metaloproteinases (MMP2). Esse resultado pode sugerir que mesmo no estado de hiperglicemia dos pacientes tratados, com apenas o tratamento tópico foi o suficiente para ter essa queda significativa no leito das feridas, como encontrado no trabalho de Galstien et al.⁶⁰. Porém não descarta que o estudo precise ser continuado e ampliado em mais pacientes para verificar se tais alterações possam ser mais expressivas.

Nossos resultados confirmaram também a relação de proporcionalidade entre CML e RAGE⁶⁰. Pode-se notar uma queda substancial da expressão de CML e RAGE após o tratamento referido, demonstrando que um dos mecanismos de ação do curativo realmente é diminuir a concentração local de tais proteínas e suas interações. Além disso, como há redução na ativação das cadeias apoptóticas e ativações de macrófagos o processo inflamatório local decresceu¹⁶.

Depreende-se desses resultados, também, que essas proteínas em excesso podem sim serem fatores de atraso ou impedimento do fechamento das feridas, visto que com suas quedas houve melhora clínica e facilitação do fechamento da ferida¹³.

Outro ponto importante salientar, que nos retornos clínicos e pós cirúrgicos dos pacientes do estudo, verificou-se que o enxerto cutâneo para tratamento da úlcera foi totalmente integrado ao leito, o que corrobora com as perspectivas clínicas já vistas e que são bem diferentes das tentativas de enxertias sem esse tipo de curativo (TPN)⁴⁷.

Os resultados obtidos nesse estudo nos permitem afirmar que a TPN é terapêutica efetiva no tratamento de Feridas de membros inferiores de indivíduos diabéticos. Sua utilização melhora o leito das feridas e permite brevidade na resolução cirúrgica. Quanto ao microambiente desse leito notamos que a TPN promoveu queda substancial da expressão de CML e RAGE após sua utilização. O que corrobora os achados clínicos. Sugerimos ampliação do estudo para melhor elucidação de todos os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo.

6. Conclusão

Todos os indivíduos diabéticos portadores de úlceras cutâneas apresentavam mau controle glicêmico. Apesar desse fator, a TPN foi efetiva em melhorar os aspectos clínicos dessas feridas à custa de modificação do microambiente com decréscimo das concentrações de CML; AGEs/RAGEs e MMP2. A referida terapia também promoveu aumento das concentrações de TIMPs. Tal alteração no leito permitiu a resolução cirúrgicas dessas feridas.

7. Referências

- 1 - American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes – 2018. Diabetes Care. 2018;41(Suppl.1):S13-S27.
- 2 - Rarthur HM, Boulton AJM. The diabetic foot. Clinics in Dermatology. 2007;25:109-20.
- 3 - Paeon H. Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. Pathologie Biologie. 2010;58:226-31.
- 4 - Bergman M, Abdul-Ghani M, DeFronzo RA, Manco M, Sesti G, Fiorentino TV, et al. Review of methods for detecting glycemic disorders. Diabetes Res Clin Pract. 2020;165:108233.
- 5 - Verena Gounden, Michael Ngu, Catherine Anastasopoulou, Ishwarlal Jialal. Fructosamine. StatPearls Publishing. [Internet]. 2021 [cited 2020 Oct 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470185/>
- 6 - Pedrosa W, Sander Diniz MFH, Barreto SM, Vidigal PG. Establishing a blood fructosamine reference range for the Brazilian population based on data from ELSA - Brasil. Pract Lab Med. 2018;13:e00111.

7 - Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic neuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:6474-9.

8 - Reiber GE, Vileikyte L, Boyko EJ, Aguila M, Smith DG, Lavery LA, et al. Causal pathways for incident lower-extremity ulcers in patients with diabetes from two settings. *Diabetes Care*. 1999;22:157-62.

9 - Hunt DL. Diabetes: foot ulcers and amputations. *BMJ Clin Evid*. 2011;2011:0602.

10 - Reiber GE, Boyko EJ, Smith DG. Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. 1995 [cited 2017 May 17]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/242521375_Lower_Extremity_Foot_Ulcers_and_Amputations_in_Diabetes

11 - Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, Zochodne DW, Wright DE, Bennett DL, et al. Diabetic neuropathy. 2019;5:42.

12 - Sibbald RG, Woo KY. The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2008;24(Suppl 1):S25-S30.

- 13 - Liao H, Zakhaleva J, Chen W. Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials*. 2009;30(9):1689-96.
- 14 - Goh SY, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93:1143-52.
- 15 - Lao G, Ren M, Wang X, Zhang J, Huang Y, Dan Liu, et al. *Exp Dermatol*. 2019;28(5):528-35.
- 16 - Arpino V, Brock M, Gill S. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Bio*. 2015;44-46:247-54.
- 17 - Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29.
- 18 - Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA. Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17:461-472.
- 19 - Prasad C, Davis KE, Imrhan V, Juma S, Vijayagopal P. Advanced Glycation End Products and Risks for Chronic Diseases: Intervening Through Lifestyle Modification. *Am J Lifestyle Med*. 2019;13(4): 384–404.

20 - Ashmed N. Advanced glycation endproducts – role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2005;67:3-21.

21 - Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-46.

22 - Chaudhuri J, Bains Y, Guha S, Kahn A, Hall D, Bose N. The role of advanced glycation end products in aging and metabolic diseases: bridging association and causality
Cell Metab. 2018;28(3):337-52.

23 - Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmetts CA, Dauchot P, Kohn RR. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med*. 1986;314(7):403–8.

24 - Niu Y, Xie T, Ge K, Lin Y, Lu S. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products. *Am J Dermatopathol*. 2008;30(4):344–51.

25 - Guyton GP, Saltzman CL. The diabetic foot. Basic mechanisms of disease. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 2001;83:1084-96.

26 - Jeffcoate WJ, Price P, Harding KG. Wound healing and treatments for people with diabetic foot ulcers. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2004;20(Suppl 1):S78-S89.

27 - Ott C, Jacobs K, Haucke E, Santos AN, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol*. 2014;2:411-29.

28 - Zaĭtseva EL, Doronina LP, Molchkov RV, Voronkova IA, Mitish VA, Tokmakova Alu. Features of angenesis against the background of negative pressure wound therapy in patients with neuropathic and neuroischemic forms of diabetic foot ulcers. *Vestn Khir Im I I Grek*. 2014;173(5):64-72.

29 - Dale AP, Saeed K. Novel negative pressure wound therapy with instillation and the management of diabetic foot infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(2):151-7.

30 - Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: animal studies and basic foundation. *Ann Plast Surg*. 1997;38(6):553–62.

31 - Quatman CE, Villarreal ME, Cochran A. Incisional Negative Pressure Wound Therapy Following Surgical Repair of Lower Extremity Fractures . *Jama*. 2020;323(6):513-4.

32 - Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg*. 1997;38(6):563–76; discussion 577.

- 33 - Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. Micro- and macromechanical effects on the wound bed by negative pressure wound therapy using gauze and foam. *Ann Plast Surg.* 2010;64(6):789–93.
- 34 - Malmsjö M, Ingemansson R, Martin R, Huddleston E. Negative-pressure wound therapy using gauze or open-cell polyurethane foam: similar early effects on pressure transduction and tissue contraction in an experimental porcine wound model. *Wound Repair Regen.* 2009;17(2):200-5.
- 35 - Malmsjö M, Gustafsson L, Lindstedt S, Gesslein B, Ingemansson R. The Effects of Variable, Intermittent, and Continuous Negative Pressure Wound Therapy, Using Foam or Gauze, on Wound Contraction, Granulation Tissue Formation, and Ingrowth Into the Wound Filler. *Eplasty.* 2012;12:e5.
- 36 - Chen SZ, Li J, Li XY, Xu LS. Effects of vacuum-assisted closure on wound microcirculation: an experimental study. *Asian J Surg.* 2005;28(3):211–7.
- 37 - Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. Wound edge microvascular blood flow during negative-pressure wound therapy: examining the effects of pressures from -10 to -175 mm Hg. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(2):502-9.
- 38 - Saxena V, Hwang CW, Huang S, Eichbaum Q, Ingber D, Orgill DP. Vacuum-assisted closure: microdeformations of wounds and cell proliferation. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114(5):1086-96; discussion 1097-8.

- 39 - Lambert VK. Vacuum Assisted Closure: a review of development and current applications. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29:219-26.
- 40 - Lu X, Chen S, Li X, Li W. The experimental study of the effects of vacuum-assisted closure on edema and vessel permeability of the wound. *Chin J Clin Rehabil.* 2003;7:1244–5.
- 41- Borgquist O, Ingemansson R, Malmström M. Wound edge microvascular blood flow during negative-pressure wound therapy: examining the effects of pressures from -10 to -175 mm Hg. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(2):502-9.
- 42 - Greene AK, Puder M, Roy R, Arsenault D, Kwei S, Moses MA, et al. Microdeformational wound therapy: effects on angiogenesis and matrix metalloproteinases in chronic wounds of 3 debilitated patients. *Ann Plast Surg.* 2006;56(4):418–22.
- 43 - Malmström M, Ingemansson R, Martin R, Huddleston E. Wound edge microvascular blood flow: effects of negative pressure wound therapy using gauze or polyurethane foam. *Ann Plast Surg.* 2009;63(6):676-81.
- 44 - Banwell PE. Topical negative pressure therapy in wound care. *J Wound Care.* 1999;8(2):79–84.

45 - Morykwas MJ, Simpson J, Pungner K, Argenta A, Kremers L, Argenta J. Vacuum-assisted closure: state of basic research and physiologic foundation. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7) suppl:121S–6S.

46 - Banwell PE, Téot L. Topical Banwell negative pressure (TNP): the evolution of a novel wound therapy. *J Wound Care*. 2003;12(1):22-8.

47 - Blume PA, Walters J, Payne W, Ayala J, Lantis J. Comparison of negative pressure wound therapy using vacuum-assisted closure with advanced moist woundtherapy in the treatment of diabetic foot ulcers: a multicenter randomized controlled trial. *Diabetes Care*. 2008;31(4):631-6.

48 - Prática Clínica. [Acesso em 02 de Fev 2021]. Disponível em: <https://praticaclinica.com.br/anexos/ccolaborativa-calculo-amostal/ccolaborativa-calculo-amostal.php>

49 - International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas, 7th ed. [Acesso em 25 Jan de 2021]. Disponível em: <http://www.IDF.org/diabetesatlas>.

50 - Reiber GE, Lipsky BA, Gibbons GW. The burden of diabetic foot ulcers. *Am J Surg*. 1998;176(2A Suppl):5S-10S.

51 - Dennis F Bandyk . The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment, *Semin Vasc Surg*. 2018;31(2-4):43-8.

52 - Hinchliffe RJ, Valk GD, Apelqvist J, Armstrong DG, Bakker K, Game FL, et al. A systematic review of the effectiveness of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24 Suppl 1:S119-44.

53 - O'Meara S, Cullum N, Majid M, Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: (3) antimicrobial agents for chronic wounds; (4) diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess.* 2000;4(21):1-237.

54 - Everett E, Mathioudakis N. Update on management of diabetic foot ulcers. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1411(1):153-65.

55 - Liu S, He CZ, Cai YT, Xing QP, Guo YZ, Chen ZL, et al. Evaluation of negative-pressure wound therapy for patients with diabetic foot ulcers: systematic review and meta-analysis. *Ther Clin Risk Manag.* 2017;13:533-44.

56 - Coltro PS, Ferreira MC, Bastista BPSN, Nakamoto HÁ, Milcheski DA, Tuma Jr, P. Role of plastic surgery on the treatment complex wounds. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2011;38(6):381-6.

57 - Lima RVKS; Coltro PS, Farina Jr JA. Negative pressure therapy for the treatment of complex wounds . *Rev. Col. Bras. Cir.* 2017;44:81-93.

58 - Liu Z, Dumville JC, Hinchliffe RJ, Cullum N, Game F, Stubbs N, et al. Negative pressure wound therapy for treating foot wounds in people with diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;10(10):CD010318.

59 - Karam RA, Rezk NA, Abdel Rahman TM, Al Saeed M. Effect of negative pressure wound therapy on molecular markers in diabetic foot ulcers. *Gene*. 2018;667:56-61.

60 - Galstyan GR, Tokmakova AY, Zaitseva EL, Doronina LP, Voronkova IA, Molchikov RV. Comparative evaluation of the intensity of reparative processes in the lower extremity soft tissues of diabetic patients receiving local negative pressure wound treatment and standard wound care. *Ter Arkh*. 2016;88(10):19-24.

61 - Huijberts MS, Schaper NC, Schalkwijk CG. Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24(Suppl 1):S19-24.

8. Anexos

Anexo 1.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular o (a) paciente declara, para todos os fins legais, especialmente do disposto no artigo 39, VI, da Lei 8.078/90 que dá plena autorização ao (à) médico(a) assistente, Dr.(a) _____, inscrito(a) no CRM-_____ para proceder as investigações necessárias ao diagnóstico do seu estado de saúde, bem como executar o tratamento cirúrgico designado “_____”, e todos os procedimentos que o incluem, inclusive anestесias ou outras condutas médicas que tal tratamento médico possa requerer, podendo o referido profissional valer-se do auxílio de outros profissionais de saúde. Declara, outrossim, que o referido (a) médico (a), atendendo ao disposto nos arts. 22º e 34º do Código de Ética Médica e no art. 9º da Lei 8.078/90 (abaixo transcritos) e após a apresentação de métodos alternativos, sugeriu o tratamento médico-cirúrgico anteriormente citado, prestando informações detalhadas sobre o diagnóstico e sobre os procedimentos a serem adotados no tratamento sugerido e ora autorizado, especialmente as que se seguem:

DEFINIÇÃO:

COMPLICAÇÕES:

CBHPM – _____ CID – _____

Infecção relacionada à assistência á saúde A legislação nacional vigente obriga os hospitais a manterem uma comissão e um programa de prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde. De acordo com a Agência nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) e com o National Healthcare Safety Network (NHSN), as taxas aceitáveis de infecção para cada potencial de contaminação cirúrgica são: •

Cirurgias limpas: até 4% • Cirurgias potencialmente contaminadas: até 10% • Cirurgias contaminadas: até 17%

DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Mesmo tomando-se todas as medidas possíveis para a prevenção de infecções, tanto por parte do cirurgião e equipe, quanto por parte do hospital, esse risco existe e deve sempre ser considerado. Declara ainda, ter lido as informações contidas no presente instrumento, as quais a entendeu perfeitamente e aceitou, compromissando-se respeitar integralmente as instruções fornecidas pelo(a) médico(a), estando ciente de que sua não observância poderá acarretar riscos e efeitos colaterais a si (ou ao paciente). Declara, igualmente, estar ciente de que o tratamento adotado não assegura a garantia de cura, e que a evolução da doença e do tratamento podem obrigar o (a) médico (a) a modificar as condutas inicialmente propostas, sendo que, neste caso, fica o(a) mesmo(a) autorizado(a), desde já, a tomar providências necessárias para tentar a solução dos problemas surgidos, segundo seu julgamento. Finalmente, declara ter sido informado a respeito de métodos terapêuticos alternativos e estar atendido em suas dúvidas e questões, através de linguagem clara e acessível. Assim, tendo lido, entendido e aceito as explicações sobre os mais comuns RISCOS E COMPLICAÇÕES deste procedimento, expressa seu pleno consentimento para sua realização.

JUNDIAÍ _____ de _____ de 2019.

Ass. Paciente e/ou Responsável Ass.

Medico Assistente: _____
Nome: _____ CRM: _____
_____ UF: _____

Código de Ética Médica – Art. 22º. É vedado ao médico deixar de obter consentimento do paciente ou de seu representante legal após esclarecê-lo sobre o procedimento a ser realizado, salvo em caso de risco iminente de morte. Art. 34º. É vedado ao médico deixar de informar ao paciente o diagnóstico, o prognóstico, os riscos e os objetivos do tratamento, salvo quando a comunicação direta possa lhe provocar dano, devendo, nesse caso, fazer a comunicação a seu representante legal. Lei 8.078 de 11/09/1990 – Código Brasileiro de Defesa do Consumidor: Art. 9º - O fornecedor de produtos ou serviços potencialmente perigosos à saúde ou segurança deverá informar, de maneira ostensiva e adequada, a respeito da sua nocividade ou periculosidade, sem prejuízo da adoção de outras medidas cabíveis em cada caso concreto. Art. 39º - É vedado ao fornecedor de produtos ou serviços dentre outras práticas abusivas: VI – executar serviços sem a prévia elaboração de orçamento e autorização expressa do consumidor, ressalvadas as decorrentes de práticas anteriores entre as partes.

Anexo 2.

PRONTUÁRIO PARA PESQUISA DE EVOLUÇÃO DE ÚLCERAS

Alterações moleculares de fibroblastos presentes no leito da ferida crônica de portadores de diabetes mellitus submetidos à terapia por pressão subatmosférica.

Data: ____ / ____ / ____.

Identificação	
Nome:	
Idade:	
Gênero:	
Data nascimento: / /	
Escolaridade	
Profissão	Atuação
Renda Pessoal	Renda Familiar
Número de pessoas que trabalham na família	

Queixa e Duração:

História Pregressa da Moléstia Atual (HPMA):

Dor: ☐ sim ☐ não Nota: _____

Tratamentos anteriores:

Antecedentes:

- 1. HAS: ☐
- 2. Tabagismo: ☐
- 3. Diabetes: ☐
- 4. Anemias: ☐

3. Familiares:

4. Outros:

Diagnóstico CLÍNICO

Diagnóstico LABORATORIAL

Exame Físico:

1. aspecto do leito

tamanho	
exsudato	
granulação	
esfacelo	_____ % área estimado
necrose	_____ % área estimado

2. Edema: : ☐sim ☐não

3. Hiperpigmentação: : ☐sim ☐não

4. Lipodermatoesclerose: : ☐sim ☐não

5. Varizes: : ☐sim ☐não

6. Veias reticulares: : ☐sim ☐não

7. Telangiectasia: : ☐sim ☐não

8. Sangramento: ☐

9. Outros:

Conduta:

Ensaio Clínico

Tamanho	Meça o maior comprimento e a maior largura usando uma régua graduada em centímetros.	
Exsudato	Pequena quantidade	1 troca / dia – curativo seco
	Moderada quantidade	1 troca / dia – curativo úmido
	Grande quantidade	+1 troca / dia – curativo úmido
Granulação (tecido cor-de-rosa ou vermelho-vivo com um aspecto brilhante, úmida e granulosa)	Pobre	coloração pálida/esbranquiçada < 50% da área
	Moderada	coloração rósea ≥ 50% da área
	Exuberante	coloração avermelhada > 30% da área
Esfacelo (tecido amarelo ou branco que adere ao leito da ferida em fios ou camadas espessas ou com muco.)	Pequena quantidade	< 30% da área
	Moderada quantidade	Entre 30 e 60% da área
	Grande quantidade	> 60% da área
Necrose: (tecido negro, castanho ou castanho-claro que adere firmemente ao leito da ferida ou aos bordos e que pode estar mais firme ou mole do que a pele circundante)	Pequena quantidade	< 30% da área
	Moderada quantidade	Entre 30 e 60% da área
	Grande quantidade	> 60% da área
Dor (notas)	Escala que varia de 0 (zero) a 10 (dez), onde o 0 significa ausência de dor e o 10 (dor insuportável)	
Conforto com o Tratamento	Escala que varia de -1 (menos um) a 3 (três), onde o -1 significa desconforto 0 indiferente, 1 pouco confortável, 2 moderadamente confortável e 3 bastante confortável	