

Rafaela Grecco Machado

**QUEIMADURAS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA
ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ÀS
MATRIZES DE CELULOSE BACTERIANA PARA O REPARO
CUTÂNEO**

Trabalho apresentado como requisito para a conclusão da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso (BIO 7016) do currículo do Curso de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Andréa G. Trentin

Coorientador: Dr. Talita da Silva Jeremias

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Rafaela Grecco
QUEIMADURAS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA
ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ÀS MATRIZES DE
CELULOSE BACTERIANA PARA O REPARO CUTÂNEO / Rafaela Grecco
Machado ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin ; co-
orientadora, Talita da Silva Jeremias. - Florianópolis, SC,
2014.
125 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Queimaduras. 3. Estudo
Epidemiológico. 4. Células-tronco Mesenquimais. 5. Celulose
Bacteriana. I. Gonçalves Trentin, Andréa. II. da Silva
Jeremias, Talita. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Rafaela Grecco Machado

**QUEIMADURAS: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DA
ASSOCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ÀS
MATRIZES DE CELULOSE BACTERIANA PARA O REPARO
CUTÂNEO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 14 de Fevereiro de 2014

Prof.^a Maria Risoleta F. Marques, Dr.^a
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof.^a Andréa G. Trentin, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Talita da Siva Jeremias
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. ^aEvelise Maria Nazari, Dr.^a
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Diana Heck, Ma.
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Farmacêutica Michele Rode
Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus amados pais e ao meu namorado que sempre me incentivaram a seguir meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina que me deu a oportunidade de realizar minha graduação com ótimos profissionais e amigos.

À minha orientadora Andréa, que me aceitou no laboratório e me ensinou que temos que ter a mente aberta para entendermos biologia celular. Muito obrigada pela oportunidade, pelas correções de trabalhos e pelas conversas sinceras, mesmo eu falando que vão durar 5 minutinhos e elas durando sempre mais

Aos professores do LACERT, Giordano Calloni e Ricardo Garcez pelos conselhos acadêmicos, conselhos não acadêmicos, conversas no café e todas as risadas.

Aos diversos profissionais da UFSC que contribuíram para minha pesquisa e formação, pessoal da limpeza, manutenção, biblioteca e coordenação. Especialmente para a Renata do LCME e meninas do LAMEB que tornaram muitos dos meus experimentos possíveis.

Ao CNPQ e à Pró-reitoria de Extensão da UFSC, pelo apoio financeiro durante a graduação.

Ao HIJG por permitir a realização de parte deste trabalho em suas dependências.

Aos funcionários do SAME, especialmente ao seu Jair que sempre foi muito prestativo nos trazendo todos os prontuários para análise.

Ao Dr. Mauricio Jose Lopes Pereima por apoiar a realização de nossa pesquisa nas dependências do HIJG.

À Derce por introduzir a Celulose bacteriana em nosso laboratório e estar sempre disposta a ajudar com as diversas dúvidas.

À minha coorientadora/ “chefa” Talita, pela imensurável ajuda e aprendizado durante todos esses anos de laboratório. Não poderia ter uma coorientadora mais linda e prestativa do que você, obrigada por todos os ensinamentos, puxões de orelha, correções, conversas sobre a vida e pela técnica do “uhum”. Você é um exemplo para mim!

À Michele por todo o auxílio durante as cirurgias nos camundongos e outros processos do laboratório e por ser uma “grande” amiga.

À Priscila por me levantar muitas vezes quando tive vontade de desistir, e por ter a fórmula da juventude, que espero conseguir em breve.

À Diana por todo auxílio com a celulose bacteriana, todas as horas de discussão sobre como fazer poros nessas membranas, e todas as risadas.

Ao Aloísio por contribuir com todo seu conhecimento, dando magníficas explicações e por responder prontamente e-mails com dúvidas e com artigos.

Ao Diego por sempre animar meus dias no lab com piadas infames, mímicas, cantadas épicas ou contando casos da vida.

À Silvia por todos os conselhos conjugais/nutricionais/financeiros, que me ajudaram a crescer pessoalmente.

À Alice que em tão pouco tempo se tornou uma pessoa tão querida pra mim, falando tudo o que eu sempre penso.

Ao Raul por me levar a primeira vez para o laboratório e me dizer que se eu não tentasse eu nunca saberia, e por me ajudar a passar um ano no Canadá.

À Pati por sua empolgação científica, pela análise das culturas, por ter um bom gosto musical e por mostrar que existem pessoas tão loucas quanto eu no lab.

À Fernanda por me mostrar a primeira imuno de um neurônio e me deixar maravilhada.

À “nova” turma do LACERT: Mábia, Jéssica, Matheus, Filipe, Gabriel, Lucas, que se mostraram muito prestativos e proporcionaram um ambiente muito amigável ao lab.

Aos professores: Marguerita Barraco por me mostrar quão fascinante é a biologia celular, e Paulo Hoffmann por me mostrar toda a paixão necessária para seguir esta profissão.

Àqueles amigos que não sabem quanto foram importantes nos momentos de desespero, apenas pelo fato de eles existirem e serem meus amigos. Grazielle, Rêneli, Renan, Ludimila, Gabriela e Ana Paula.

Ao meu namorado, que mesmo estando comigo por 7 anos e 7 meses, fez questão de estar ao meu lado em todos os momentos de stress durante este trabalho. Obrigada por me escutar, me aconselhar e acabar com minhas crises históricas e existenciais. Te amo meu amor!

Às minhas xuxus, Chê, Mille, May, Amanda, Gabi, Leili e Laís. As melhores amigas que eu poderia encontrar na minha graduação e espero manter pra toda a vida. Muito obrigada pelos conselhos, por rirem das minhas desgraças, por me levarem pro bar pra relaxar, por me chamarem pra comer comidas gordas, por todas as noites falando besteiras e por me aceitarem do jeito que sou.

Aos meus queridos pais, que sempre colocaram minha educação na frente de todas suas necessidades, e me ensinaram a nunca menosprezarem os outros para chegar aonde eu quero.

RESUMO

A pele é um tecido com alta complexidade e múltiplas funções, grandes traumas neste tecido, como queimaduras, podem ocasionar desequilíbrios osmóticos, cicatrizações hipertróficas, infecções e até mesmo a morte. As queimaduras são lesões cutâneas de alta complexidade que no Brasil afetam mais de 1 milhão de pessoas por ano. Elas possuem uma epidemiologia própria e podem na maioria das vezes ser evitadas. Problemas com a regeneração e cicatrização da pele, após a ocorrência de queimaduras, são frequentes, e podem provocar deformações e perda de função. Assim, novas estratégias para a regeneração da pele, visando à obtenção de uma pele íntegra, morfológica e funcionalmente, são necessárias. Uma das abordagens de estudos para a regeneração cutânea é a associação de células tronco (CTs) à biomateriais, para posterior enxertia. As CT Mesenquimais (CTMs) tem sido descritas como uma fonte atrativa para a engenharia de tecidos, elas podem agir em lesões se diferenciando nos tipos celulares afetados, ou através de efeitos parácrinos, além de serem naturalmente recrutadas pelo organismo para reparar tecidos danificados. Tendo em vista estes aspectos, o presente trabalho foi dividido em duas partes. Primeiramente, com o objetivo de analisar o perfil epidemiológico e obter um maior conhecimento sobre a problemática das queimaduras, foi realizado um estudo retrospectivo no Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), onde foram analisados 174 prontuários de crianças queimadas entre 2007-2009, quanto às seguintes variáveis: idade, sexo, agente causador, profundidade, extensão corporal, localização corpórea, ambiente de ocorrência das queimaduras e necessidade de enxerto. A partir deste estudo foi concluído que o perfil epidemiológico das crianças queimadas no HIJG neste período é de um menino, em idade pré-escolar, que se queima em casa, com líquidos aquecidos. 62.6% dos pacientes apresentaram queimaduras de 2º grau; 70% apresentaram até 20% da superfície corporal queimada (SCQ); a maioria dos pacientes apresentou epitelização da SCQ espontaneamente. Crianças menores de 6 anos de idade se queimaram mais com líquidos aquecidos, crianças a cima dessa idade com inflamáveis, especialmente álcool líquido. Esse agente foi o maior responsável por queimaduras compreendendo mais de 20% da SCQ, e por

queimaduras de 3º grau, sendo que dentre todas as queimaduras com álcool, 72% necessitaram de enxerto. A segunda parte deste trabalho teve como objetivo avaliar o potencial terapêutico da associação de CTMs derivadas da derme (dCTMs) em matrizes de celulose bacteriana (MCBs), visando uma futura aplicação no reparo de lesões cutâneas. Para isso, foram avaliadas a viabilidade, aderência e morfologia das dCTMs sobre MCBs, além da padronização de um método de aplicação das MCBs em feridas feitas em camundongos. As dCTMs foram isoladas de pele humana, proveniente de *lifting* facial, e as MCBs foram produzidas por bactérias *Gluconacetobacter hansenii* cultivadas em meio de cultivo apropriado e estático, após o plaqueamento foram realizadas análises *in vitro* em dias variados. O teste de viabilidade demonstrou que as dCTMs continuam viáveis após 7 dias de cultivo sobre as MCBs, estas células aderiram nas MCBs progressivamente, porém não migraram para o interior das mesmas, além disso, mantiveram morfologia fibroblastóide típica e características imunofenotípicas de CTMs após 4 dias de cultivo sobre as MCBs. Ao serem implantadas em camundongos, as MCBs foram recobertas com Tegaderm® para não perderem sua umidade característica e suturadas para aumentar seu tempo sobre as feridas. Não foram encontrados outros estudos utilizando dCTMs associadas à MCBs. De acordo com os resultados, concluímos que MCBs parecem ser um bom veículo para inoculação das dCTMs sobre lesões cutâneas, ao mesmo tempo em que são um curativo efetivo para as mesmas.

Palavras-chave: Queimaduras; Perfil epidemiológico; Regeneração de pele; Células tronco mesenquimais derivadas da derme; Celulose bacteriana.

ABSTRACT

The skin is a very complex tissue with multiple functions. Major trauma in this tissue, such as burns, can cause osmotic imbalances, hypertrophic scarring, infections and even death. Burns are skin injuries of high complexity that just in Brazil affect more than 1 million people per year. They have their own epidemiology and most of times can be avoided. Problems with skin regeneration and scarring after the occurrence of burns are common, and can cause deformity and loss of function. New strategies for the regeneration of the skin, in order to obtain a fully recovered tissue morphologically and functionally, are necessary. One of the approaches to skin regeneration studies is the association of stem cells (SCs) with biomaterials for subsequent grafting. Mesenchymal SCs (MSCs), have been described as an attractive source for tissue engineering, they can act on the lesions differentiating into the affected cell types, or through paracrine effects, besides being naturally recruited by the body to repair damaged tissues. Considering these aspects, the present study was divided into two parts. First, in order to analyze the epidemiological profile and get a better understanding of the problem of burns, one retrospective study was conducted at Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG), where 174 cases of burned children between 2007-2009 were analyzed according to the following variables: age, gender, causal agent, depth, body length, body location and the environment where burns occurred, and the need for grafting. From this study it was concluded that the epidemiological profile of children burned in HIJG at this period is a boy in preschool age, which is burned at home, with heated liquids. 62.6% of patients had 2nd degree burns, 70% had less than 20% of corporal burned surface area (BSA), most showed spontaneous epithelialization of the BSA. Children under 6 years burned more with heated liquids, while children above that age burned more with flammable liquids especially alcohol. The alcohol was the most responsible for burns comprising over 20% of the BSA, and 3rd degree burns, and among all burns with alcohol, 72% required skin graft. The second section of this work aimed to evaluate the therapeutic potential of a combination of MSCs derived from the dermis (dMSCs) with bacterial cellulose polymers (CBs), aiming

a future application in the repair of damaged skin. To this end, the viability, morphology and adhesion of these dMSCs with the CBs were evaluated, it was also standardized a method of application of the CBs into wounds in mice. The dMSCs were isolated from human skin, coming from facelift, and CBs were produced by bacteria *Gluconacetobacter hansenii* grown in a suitable medium and static cultivation. After plating the cells on the CBs, *in vitro* analyses were performed in various days. The viability test demonstrated that dMSCs remain viable after 7 days of cultivation on CBs, these cells progressively adhered on CBs, however did not migrate to the inside of them, furthermore the cells maintained typical fibroblastic morphology and immunophenotypic characteristics of MSCs after 4 days growing on the CBs. When implanted in mice, the CBs had to be covered with Tegaderm to avoid losing its characteristic humidity and sutured to increase its time on the wounds. No other studies using dMSCs associated with CBs were found during the time this study was performed. According to the results, we concluded that CBs seem to be a good vehicle for inoculation of dMSCs on skin injuries, at the same time that it is an effective curative for the lesions.

Keywords: Burns; Epidemiological profile; Skin regeneration; Mesenchymal stem cells derived from the dermis; Bacterial cellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.....	28
Figura 2 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana que constitui a CB.....	32
Figura 3 – Aplicações Biomédicas da CB	36
Figura 4 – Utilização de MCB em um paciente que sofreu queimaduras faciais de segundo grau.....	38
Figura 5 – Estratégias de divisão celular das CTs.....	40
Figura 6 – Nichos das CTs na pele.	42
Figura 7 - Viabilidade das dCTMs semeadas sobre o plástico e MCBs.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 - dCTMs sobre MCBs após 3 dias de cultivo	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Marcação das dCTMs sobre MCBs com DAPI ..	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 - Estrutura 3D das MCBs vista em MEV	81
Figura 11 - dCTMs plaqueadas sobre MCB vistas em MEV.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 12 - Perfil imunofenotípico das dCTMs após cultivo em MCBs.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 13 - Método de Implantação de MCBs como curativos em camundongos	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo
.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 2 - Distribuição de 174 pacientes vítimas de
queimaduras internados no HIJG no período de 2007 à 2009,
segundo a faixa etária e o sexo. ...**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 3 - Distribuição de 174 pacientes quanto ao ambiente de
ocorrência das queimaduras.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 4 - Distribuição dos pacientes queimados com relação à
localização corporal das lesões**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 5 - Distribuição dos pacientes de acordo com a SCQ
.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 6 – Número de ocorrências de queimaduras de
diferentes profundidades.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 7 - Distribuição dos pacientes em relação a necessidade
de enxerto.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 8 - Principais agentes causadores de queimaduras no
HIJG (2007-2009).....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 9 - Distribuição dos casos de enxerto em relação aos
agentes causadores.....**Erro! Indicador não definido.**
- Gráfico 10 - Viabilidade das dCTMs semeadas sobre MCBs
.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de algumas aplicações da Celulose Bacteriana	33
Tabela 2 - Classificação dos pacientes segundo a faixa etária...	54
Tabela 3 - Classificação segundo a região corporal afetada	54
Tabela 4 - Classificação dos pacientes de acordo com a SCQ...	55
Tabela 5 - Classificação dos agentes causadores em categorias	56
Tabela 6 - Pacientes internados no HIJG por faixa etária, segundo o agente causador das queimaduras	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7 - Relação entre SCQ e agentes causadores dos pacientes internados no HIJG	Erro! Indicador não definido.
Tabela 8 - Marcadores de superfície utilizados na citometria de fluxo	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CB	Celulose Bacteriana
CT	Célula-Tronco
CTM	Célula-Tronco Mesenquimal
dCTMs	Células tronco Mesenquimais derivadas da derme
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
HIJG	Hospital Infantil Joana de Gusmão
LACERT	Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual
MCB	Membrana de Celulose Bacteriana
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SEPEX	Semana de Ensino Pesquisa e Extensão
SBF	Soro Bovino Fetal
SBQ	Sociedade Brasileira de Queimaduras
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRF	Tribunal Regional Federal
UQUE	Unidade de Queimados
KCl	Cloreto de Potássio
MI	Membros Inferiores
MS	Membros Superiores
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
3D	Tridimensional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	ESTRUTURA DA PELE	27
1.2	LESÕES CUTÂNEAS CAUSADAS POR QUEIMADURAS	28
1.2.1	Estatísticas e Prevenção.....	29
1.2.2	Enxertos e Matrizes de Regeneração Dérmica	30
1.3	POLÍMEROS DE CELULOSE BACTERIANA	31
1.3.1	Conceitos e estrutura química.....	31
1.3.2	Aplicabilidade dos polímeros de CB.....	33
1.3.3	Utilização de MCB para o reparo cutâneo.....	37
1.4	CÉLULAS TRONCO	38
1.4.1	Características das CTMs	42
1.4.2	Utilização das CTMs no reparo de lesões cutâneas....	43
2	JUSTIFICATIVA	45
3	ESTRUTURA DO TRABALHO	47
	CAPÍTULO I	49
4	OBJETIVOS	51
4.1	OBJETIVO GERAL	51
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
5	MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.1	COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS	53
5.1.1	Agrupamento dos dados coletados para a análise	53
5.1.2	Análise dos dados dos prontuários	56
5.1.3	Divulgação de medidas de prevenção	57
6	RESULTADOS	59
6.2	AMBIENTE DE OCORRÊNCIA ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
6.3	REGIÃO E EXTENSÃO CORPORAL DAS LESÕES ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
6.4	PROFUNDIDADE DAS QUEIMADURAS E NECESSIDADE DE ENXERTO..... ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	

6.5	AGENTES CAUSADORES	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
6.5.1	Relação entre agentes causadores e idade.....	Erro! Indicador não definido.
6.5.2	Relação entre agentes causadores e SCQ	Erro! Indicador não definido.
6.5.3	Relação entre agentes causadores e necessidade de enxerto	Erro! Indicador não definido.
6.6	DIVULGAÇÃO DOS DADOS E MEDIDAS PREVENTIVAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
7	DISCUSSÃO.....	61
7.1	IDADE, SEXO E AMBIENTE DE OCORRÊNCIA.....	61
7.2	AGENTES CAUSADORES	62
7.2.1	Relação entre agentes causadores, idade e prevenção de queimaduras	62
7.2.2	Profundidade das lesões, superfície corporal queimada e sua relação com os agentes causadores	64
7.3	REGIÕES DO CORPO MAIS AFETADAS POR QUEIMADURAS	65
7.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ÁLCOOL LÍQUIDO E SUA PROIBIÇÃO	65
7.5	ESCOLHA DOS DADOS E PADRONIZAÇÃO DOS PRONTUÁRIOS	66
8	CONCLUSÃO	68
	CAPÍTULO II	70
9	OBJETIVOS.....	72
9.1	OBJETIVO GERAL	72
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	72
10	MATERIAIS E MÉTODOS.....	74
10.1	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PELE	74
10.2	CULTURA PRIMÁRIA E ISOLAMENTO DE CTs DERIVADAS DA PELE	74
10.3	PRODUÇÃO DA MATRIZ DE CELULOSE BACTERIANA.....	75

10.4	CULTURA DAS CÉLULAS DERIVADAS DA PELE EM MCB	76
10.5	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DERIVADAS DA PELE	76
10.5.1	Análise da viabilidade celular (MTS)	76
10.5.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	77
10.5.3	Análise dos marcadores de CTMs por citometria de fluxo.....	77
10.6	IMPLANTAÇÃO DAS MCBs EM CAMUNDONGOS	79
11	RESULTADOS	80
11.1	BIOCOMPATIBILIDADE E INTERAÇÃO DAS dCTMs COM MCBs <i>IN VITRO</i>	80
11.1.1	Viabilidade Celular	80
11.1.2	Morfologia, adesão e integração das dCTMs cultivadas nas MCBs	Erro! Indicador não definido.
11.2	PERFIL FENOTÍPICO DAS dCTMs ASSOCIADAS ÀS MCBs.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
11.3	ESTABELECIMENTO DO IMPLANTE DE MCBs EM CAMUNDONGOS	81
12	DISCUSSÃO	82
12.1	AS MCBs SÃO BIOCOMPATÍVEIS COM dCTMs	83
12.2	AS dCTMs ASSOCIADAS ÀS MCBs MANTÊM SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	85
12.3	UTILIZAÇÃO DAS MCBs COMO ARCABOUÇOS OU CURATIVOS CUTÂNEOS.....	86
13	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXOS	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRUTURA DA PELE

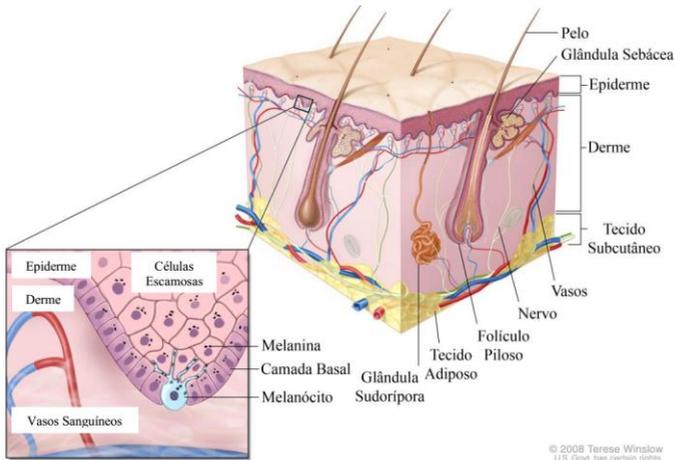
A pele, ou tecido cutâneo, é um dos maiores órgãos do corpo humano, atingindo cerca de 16% do peso corporal dos indivíduos. Este órgão multifuncional recobre toda a superfície do corpo, protegendo-o contra a perda de água, e contra agentes externos como micro-organismos, raios solares, ações mecânicas e químicas (ALONSO e FUCHS, 2003). Outras funções ainda atribuídas à pele são: receber informações do ambiente e repassá-las ao sistema nervoso; participar da termorregulação do corpo por meio dos vasos sanguíneos, tecido adiposo e glândulas sebáceas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Estruturalmente, a pele é composta de duas porções principais, a epiderme e a derme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa da pele e possui origem ectodérmica, sendo constituída por um fino epitélio estratificado pavimentoso e composta principalmente por queratinócitos. Além deste epitélio queratinizado, a epiderme é constituída por melanócitos (células pigmentares), células de Langerhans (envolvidas com o sistema imune) e de Merkel (mecanorreceptores) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Adjacente a epiderme, encontra-se uma camada de tecido conjuntivo de origem mesodérmica, denominada derme, a qual é ligada a epiderme por fibrilas de colágeno. A derme é uma camada de espessura variável, bastante resistente e rica em colágeno, glicosaminoglicanos e elastina, e é principalmente composta por fibroblastos, além de células imunes e células do endotélio vascular. Esse tecido é ricamente suprido por sangue, através de uma densa rede de capilares, chamada de plexo dérmico (RAMOS, 2004). Nesta mesma região ainda estão presentes vasos linfáticos, terminações nervosas e estruturas derivadas da epiderme, tais como folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas.

Subjacente a derme, há ainda uma camada de células adiposas, denominada tela subcutânea, correspondendo a um tecido conjuntivo frouxo, responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia, e proporciona isolamento térmico (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele



(Fonte: JEREMIAS, 2013. Adaptado de:
<<http://www.ccsb.org/Cancer/Summary/CDR0000258037/>>)

Tendo em vista as diferentes funções e a complexidade do tecido cutâneo, grandes traumas que desestabilizam sua integridade, como as queimaduras, podem ocasionar desequilíbrios osmóticos, cicatrizações hipertróficas, infecções e até mesmo a morte.

1.2 LESÕES CUTÂNEAS CAUSADAS POR QUEIMADURAS

As lesões cutâneas podem ocorrer por muitas razões, incluindo doenças genéticas, traumas agudos, feridas crônicas ou até mesmo intervenções cirúrgicas (SHEVCHENKO *et al.*, 2010). Essas lesões geram uma necessidade de reconstrução da pele no mais curto espaço de tempo possível para que não haja prejuízo de suas funções bem como para evitar a formação de sequelas à pele atingida.

Entre as lesões de pele, as queimaduras são consideradas como as mais traumáticas e complexas, uma vez que podem provocar grandes danos às diversas camadas da pele sem a possibilidade de regeneração (CZAJA *et al.*, 2006). Elas podem ser definidas como lesões teciduais com destruição total ou parcial da pele e seus anexos, cuja gravidade está relacionada à

profundidade e a extensão da superfície corporal queimada (SCQ). Essa lesão pode ser resultante da exposição a chamas, inflamáveis, líquidos aquecidos, corrosivos químicos e radiação ou por contato com objetos quentes e corrente elétrica (Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ), 2013).

As queimaduras são classificadas como sendo de 1º, 2º ou 3º grau, de acordo com sua profundidade. As chamadas queimaduras de 1º grau ocorrem de forma superficial, lesionando apenas a epiderme; as de 2º grau podem ser subdivididas em superficiais, atingindo a epiderme e as camadas superficiais da derme, ou profundas, atingindo a epiderme e camadas profundas da derme. As queimaduras de 3º grau, conhecidas como queimaduras de espessura total, lesionam a epiderme, a derme e os tecidos subcutâneos, como músculo, tendões e ossos (TOMITA, 2005).

1.2.1 Estatísticas e Prevenção

Segundo estimativas, em 2004 a incidência de queimaduras severas, que levaram os pacientes a procurarem atendimento médico foi de aproximadamente 11 milhões de pessoas. A quinta maior causa de danos não fatais na faixa etária de 0-15 anos é a ocorrência de queimaduras que compreendem menos de 20% da superfície corporal, afetando cerca de 153 em cada 100.000 crianças no mundo (PECK, 2011).

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ) estima que ocorram cerca de 1 milhão de acidentes com queimaduras a cada ano (ODELI, *et al.*, 2012). Destes, 200 mil são atendidos em serviços de emergência e 40 mil demandam hospitalização (TAVARES, *et al.*, 2011). No estado de Santa Catarina, o Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) é considerado um centro de referência no tratamento de crianças queimadas, onde ocorrem aproximadamente 100 internações por ano, incluindo aquelas referentes a cirurgias reparadoras de sequelas provenientes de queimaduras (Serviço de Arquivo Médico e Estatística- SAME, 2009-2013). Em recém nascidos e crianças de até cinco anos de idade, faixa etária de alto risco, a maioria das queimaduras ocorre por escaldamento acidental. Entre adolescentes e adultos jovens, a maioria ocorre por líquidos inflamáveis, e no Brasil, o álcool líquido representa um agente causal importante. Em adultos, a maior causa de queimaduras está relacionada com acidentes de trabalho, e ocorrem geralmente com fogo ou eletricidade (TOMITA, 2005).

Apesar de sua gravidade e de sua incidência em todas as faixas etárias, a maioria dos acidentes por queimaduras poderia ser evitada com trabalhos preventivos (ROSSI *et al.*, 1998; ANAMI *et al.*, 2010;

ESPINDULA *et al.*, 2013). No entanto, os meios utilizados pelo governo, bem como pelos profissionais da saúde e educação, ainda não tem se mostrado efetivos em difundir as medidas de segurança necessárias para evitar essa situação comprovado pelos altos índices relatados na literatura (ODELI, *et al.*, 2012; TAVARES, *et al.*, 2011).

Justamente pela queimadura apresentar uma epidemiologia própria, podemos caracterizar: os pacientes que se queimam, sua idade, o agente causador, o local de ocorrência, além de outras informações importantes. Com isso, é possível adotar medidas para prevenir essas lesões, que não devem, necessariamente, ser caracterizadas como um acidente, pois acidentes não podem ser totalmente evitáveis, diferentemente das queimaduras por negligência que podem e devem ser prevenidas (PIRES, 2003; PEREIRA 2008).

1.2.2 Enxertos e Matrizes de Regeneração Dérmica

Eventos de regeneração iniciam automaticamente em nosso organismo com o intuito de restaurar o tecido cutâneo lesado, porém nem sempre resulta em uma pele morfológica e fisiologicamente restabelecida (WICKETT e VISSCHER, 2006). Em ferimentos extensos, onde há perda total de tecido dérmico e epidérmico, o processo de cicatrização é normalmente comprometido. Com isso, a região afetada fica exposta a perdas hídricas e agentes externos, como bactérias, que podem aumentar as comorbidades e agravar o prognóstico do paciente (SCHURR *et al.*, 2009). Nesses casos o ideal seria o fechamento imediato da ferida, o qual pode ser realizado com substitutos de pele, curativos ou enxertos (SHEVCHENKO *et al.*, 2010).

Pacientes que apresentam lesões por queimaduras de espessura parcial profunda ou de espessura total, normalmente são submetidos a um procedimento de excisão tangencial dos tecidos afetados, deixando a região afetada sem cobertura cutânea. Nestes casos, há necessidade de uma cobertura que proporcione a restauração e reparação da pele afetada. Esta cobertura normalmente é realizada com um auto-enxerto, obtido de áreas não queimadas dos pacientes.

O auto-enxerto, porém, não é indicado em todas as situações. Quando se faz necessário um tecido de melhor aparência e qualidade, ou em grandes queimados que não possuem áreas doadoras suficientes, uma opção ao auto-enxertos é a utilização de Matrizes de Regeneração dérmica (MRDs), como Integra® e Pelnac™. Após a implantação dessas MRDs e posterior regeneração dérmica, ainda se faz necessária a utilização de um

enxerto epidérmico, porém de menor espessura, causando menos traumas aos pacientes. As indicações para uso da MRD incluem áreas queimadas que necessitam de pele de melhor qualidade para evitar perdas funcionais, como pescoço, grandes articulações, mãos e mamas (MAES *et al.*, 2012).

Os resultados que vem sendo obtidos com a utilização das MRDs tem se mostrado positivos, pois a pele reconstituída possui características mais próximas da normalidade e acompanha o crescimento da pele não afetada, além disso, as MRDs não desencadeiam respostas imunológicas, são estéreis e podem ser armazenadas por longos períodos. Apesar desses resultados favoráveis para os tratamentos das lesões, a aplicação das MRDs em todos os pacientes é inviável devido aos altos custos para sua obtenção (MAES *et al.*, 2012). É importante ressaltar que o tratamento de queimados com as MRDs já tem sido realizado pelo SUS, sendo o HIJG – (Florianópolis SC), o primeiro hospital brasileiro da rede pública a dispor da MRD Integra® para paciente do SUS, desde 2002 (O Estado de São Paulo, 2002).

Os efeitos positivos obtidos com as MRDs comerciais tem aberto caminho para novas pesquisas na área de regeneração de tecidos, incluindo a busca por novos materiais que possam acelerar ou melhorar o reparo cutâneo após a ocorrência de lesões de difícil tratamento, e sua associação com fatores e células que possam melhorar ainda mais os resultados para os pacientes afetados.

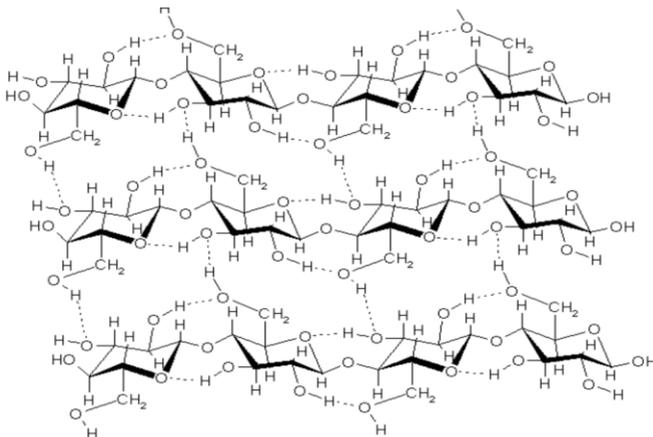
1.3 POLÍMEROS DE CELULOSE BACTERIANA

1.3.1 Conceitos e estrutura química

Estudos em engenharia de tecidos visam melhorar, manter ou restaurar a função de tecidos e órgãos danificados. Existem diferentes maneiras para reconstruir tecidos, porém sempre estão envolvidos materiais que formam arcabouços (*scaffolds*) para que a regeneração/formação do novo tecido ocorra de forma otimizada. Os arcabouços tem a função de mimetizar a matriz extracelular e guiar as células durante o processo de formação de um novo tecido (HELENIUS *et al.*, 2006). Polímeros naturais tem despertado um grande interesse para o seu uso em materiais biomédicos que possam auxiliar na regeneração de tecidos. Entre eles, o colágeno, elastina, alginato, quitosana e celulose tem sido extensivamente estudados em busca de aplicações na engenharia de tecidos (PETERSEN & GATENHOLM, 2011).

Entre os polímeros naturais, a celulose bacteriana (CB), tem sido alvo de diversos estudos (CHIAOPRAKOBKIJ *et al.* 2011; KANG *et al.* 2012; FU *et al.* 2013). A CB consiste em um polímero extracelular produzido por bactérias de diferentes gêneros, incluindo *Acetobacter* (renomeado como *Gluconacetobacter*), *Acanthamoeba*, *Achromobacter*, *Zoogloea*, sendo a espécie mais amplamente estudada a *Gluconacetobacter hansenii*, que consiste em uma bactéria gram negativa, estritamente aeróbica (PETERSEN & GATENHOLM, 2011). Assim como a celulose presente nas plantas, a CB é um polissacarídeo formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β -D-glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas, essas cadeias estão orientadas paralelamente e são unidas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana que constitui a CB.



(Fonte: RECOUVREUX, 2008. Adaptado de www.sameerrahatekar.org/Cellulose_Silk_IL.html, acessado em 25/09/2008).

As bactérias *Gluconacetobacter hansenii* possuem a capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono para a biossíntese de celulose. Quando cultivadas em meio de cultura adequado, de forma estática, essas bactérias produzem uma membrana de celulose bacteriana (MCB) na superfície do meio de cultivo que está em contato com oxigênio. O formato e o tamanho das membranas são originados de acordo com o recipiente no qual as mesmas estão sendo produzidas, já sua espessura varia com a quantidade de

meio de cultura e o tempo de produção. Após o tempo determinado a MCB é submetida a processos de lavagem e esterilização e pode ser processada para as aplicações desejadas (RECOUVREUX, 2008)

Além de ser um polímero natural, a CB se enquadra na classe dos hidrogéis. Estes consistem em polímeros com elevado teor de água (> 99 %) que vem sendo extensivamente estudados devido à sua natureza tridimensional, biocompatibilidade e versatilidade no processamento (ZHANG & KOHN 2012). A estrutura interligada por pontes de hidrogênio da CB permite a retenção de água em seu espaço intersticial, formando assim uma matriz constituída de 99% do volume total de água e apenas 1% de celulose pura (HELENIUS *et al.*, 2006; HUTCHENS *et al.*, 2006).

1.3.2 Aplicabilidade dos polímeros de CB

A CB possui propriedades físico-químicas adequadas a diferentes necessidades de produção e apresentam alta abundância e um baixo custo produtivo. Por essa razão, as MCBs são utilizadas em diversas áreas de conhecimento, como demonstrado na tabela adaptada de Lin e colaboradores, 2013 (Tabela 1). Algumas das variadas aplicações são na indústria alimentícia e de cosméticos, na fabricação de aparelhos eletroacústicos, aditivos para a fabricação de papel, criação de papel eletrônico, membranas para filtração e recuperação de óleo mineral, entre outras (RECOUVREUX, 2008, LIN *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Resumo de algumas aplicações da Celulose Bacteriana

Tipo	Descrição	Referências
Diafragma de auto-falante	Aplicada para processar filmes acústicos	Yamanaka and Watanabe (1994), Iguchi <i>et al.</i> (2000).
Papel composto	Aumenta a força de materiais para manufaturamento de papel	Stoica-Guzun <i>et al.</i> (2012), Grande <i>et al.</i> (2009), Winter <i>et al.</i> (2010), Cheng <i>et al.</i> (2011), Quero <i>et al.</i> (2010), Huang <i>et al.</i> (2010), Yamanaka and Watanabe (1994), Iguchi <i>et al.</i> (2000), Wu and Liu

		(2012), Mohammadi <i>et al.</i> (2009).
Material de Filtração	Utilizada para filtrar impurezas utilizando sua estrutura ultra-reticular	Takai (1994), Chen <i>et al.</i> (2009a, b)
Indústria Alimentícia	Fabricação de alimentos pouco calóricos, nata de coco, sorvetes e espessantes	Okiyama <i>et al.</i> (1992, 1993), Khan <i>et al.</i> (2007), Brown Jr., 1998.
Papel eletrônico	Boa condutividade elétrica quando incorporada com nanopartículas de ouro e carbono	Hu <i>et al.</i> (2011), Gutierrez <i>et al.</i> (2012), Choi <i>et al.</i> (2012), Ifuku <i>et al.</i> (2009), Sun <i>et al.</i> (2010), Kang <i>et al.</i> (2012), Shah and Brown (2005), Zhang <i>et al.</i> (2011), Nogi and Yano (2008), Legnani <i>et al.</i> (2008), Ummartyotin <i>et al.</i> (2012).
* Curativo	Aplicada como curativo devido à capacidade de retenção de água, biocompatibilidade e propriedades mecânicas	Barud <i>et al.</i> (2011), Ifuku <i>et al.</i> (2009), Winter (1962), Alvarez <i>et al.</i> (2004), Legeza <i>et al.</i> (2004), Czaja <i>et al.</i> (2006, 2007), Meftahi <i>et al.</i> (2010), Szczygielski <i>et al.</i> (2010), Maneerung <i>et al.</i> (2008), Portal <i>et al.</i> (2009), Hu <i>et al.</i> (2009), Solway <i>et al.</i> (2011), Wei <i>et al.</i> (2011), Muangman <i>et al.</i> (2011), Yang <i>et al.</i> (2012).
* Veículo para transporte de	Bom carreador de drogas devido à grande retenção de	Trovatti <i>et al.</i> (2012), Songsurang <i>et al.</i> (2011), Amin <i>et al.</i> (2012a, b),

drogas	água e estrutura porosa	Goelzer <i>et al.</i> (2009).
* Vasos sanguíneos artificiais	Através de alguns peptídeos de revestimento ou de tratamento químico, CB pode ser utilizada na formação de vasos sanguíneos artificiais, em engenharia de tecidos	Andrade <i>et al.</i> (2010), Fink <i>et al.</i> (2010, 2011), Zahedmanesh <i>et al.</i> (2011), Wippermann <i>et al.</i> (2009), Esguerra <i>et al.</i> (2010), Mohammadi <i>et al.</i> (2009), Finkenstadt and Millane (1998), Backdahl <i>et al.</i> (2006), Schumann <i>et al.</i> (2009), Backdahl <i>et al.</i> (2011), Malm <i>et al.</i> (2012).
* Regeneração óssea	Arcabouço promovendo proliferação e adesão celular através de sua estrutura porosa	Saska <i>et al.</i> (2011), Brackmann <i>et al.</i> (2012), Zaborowska <i>et al.</i> (2010), Fang <i>et al.</i> (2009); Shi <i>et al.</i> (2012); Saska <i>et al.</i> (2012); Cai e Kim (2010); Extremina <i>et al.</i> (2010); Zaborowska <i>et al.</i> (2010); Zimmermann <i>et al.</i> (2011).
* Perfuração do septo nasal	CB possui boa compatibilidade e pode ser implantada em organismos vivos alternada com tecidos moles como o septo nasal	Martinez Neto e Dolci (2010).
* Arcabouço para imobilização celular	CB pode, através de modificações químicas ou incorporações de elementos, proporcionar uma boa adesão celular	Andrade <i>et al.</i> (2010b), Andersson <i>et al.</i> (2010), Bodin <i>et al.</i> (2010), Pertile <i>et al.</i> (2012), Martinez <i>et al.</i> (2012), Wang <i>et al.</i> (2012), Sanchavanakit <i>et al.</i> (2006), Svensson <i>et al.</i> (2005), Watanabe <i>et al.</i>

		(1993), Backdahl <i>et al.</i> (2006), Kohno <i>et al.</i> (1998), Extremina <i>et al.</i> (2010), Rezaee <i>et al.</i> (2008); Ton and Le (2011b), Ton and Le (2011), Nguyen <i>et al.</i> (2009), Yao <i>et al.</i> (2011).
--	--	--

Tabela demonstrando algumas das aplicações de polímeros derivados de CB. As aplicações relacionadas à área biomédica estão destacadas com asterisco.

(Fonte: Adaptado de LIN *et al.* 2013)

Algumas das propriedades físico-químicas já bem descritas para as MCB são: cristalinidade, alta resistência à tração, alta capacidade de absorção de água, resistência à degradação, baixa solubilidade, boa permeabilidade e biocompatibilidade. Considerando essas propriedades, a CB se tornou um material de grande interesse também para a área biomédica, apresentando aplicações bastante variadas, entre elas podemos citar: o tratamento de queimaduras de segundo, terceiro grau e úlceras; a criação de micro vasos artificiais; e a produção de arcabouços para tecidos como cartilagens e pele (HELENIUS *et al.*, 2006). Essas e outras aplicações biomédicas da CB estão representadas na Figura 3

Figura 3 – Aplicações Biomédicas da CB



(Fonte: Adaptado de FU *et al.*, 2013)

1.3.3 Utilização de MCB para o reparo cutâneo

A utilização de MCB para o reparo cutâneo tem sido investigada por diversos trabalhos, e apresenta resultados promissores *in vivo* e *in vitro*. Primeiramente, a estrutura porosa das MCB permite que sejam transferidos antibióticos, ou outros produtos (como soluções aquosas de glicose, sacarose, etanol, NaCl, KCl, entre outros) para a ferida, ao mesmo tempo em que serve como uma barreira física para fatores externos que poderiam causar infecções. Além disso, as MCBs tem a capacidade de absorver o exudato das feridas durante sua utilização como um curativo, e são facilmente retiradas das superfícies das feridas, não causando novos traumas aos locais das lesões (FU *et al.* 2013).

Dentre as características da CB, a que se mostra mais importante para sua aplicação como um biomaterial é sua biocompatibilidade. Estudos tem relatado que o implante de CB subcutânea em ratos Wistar, não resulta em inflamação ou rejeição ao redor dos implantes. Além disso, foram registrados novos vasos sanguíneos em torno da CB e infiltração de fibroblastos na mesma, mostrando assim resultados promissores (HELENIUS *et al.*, 2005). Czaja e colaboradores (2006) mostraram que as MCB são totalmente biocompatíveis e eficientes para proteger regiões com queimaduras de excessiva perda de fluídos, além de acelerar o processo de cura nessas áreas, em modelo animal (CZAJA *et al.*, 2006).

Tem sido relatada a utilização das MCBs como curativo para lesões de pele em pacientes vítimas de queimaduras ou com feridas crônicas como úlceras (FU *et al.*, 2012). Em 2009, Portal e colaboradores demonstraram que para úlceras crônicas, o tempo requerido para o fechamento de 75% da lesão, diminuiu de 315 para 81 dias com o uso de curativo de MCB. Por outro lado, Czaja e colaboradores (2007), relataram o restabelecimento de feridas profundas na superfície facial em um paciente com queimaduras de segundo grau, com o uso MCB, sem necessidade de enxerto, ou ocorrência de cicatrizes hipertróficas (Figura 4) (CZAJA, 2007).

Czaja e colaboradores (2007) demonstram ainda, em outro teste clínico, o tratamento de pacientes de queimaduras de segundo grau, superficiais e profundas. Dentre os pacientes que receberam cobertura de MCB, nenhum apresentou hipersensibilidade aos curativos, que se aderiram bem às feridas, evitando a entrada de microorganismos. Houve ainda diminuição do tecido necrótico, do tempo de reepitelização e do inchaço, sem retração das feridas (CZAJA, 2007).

Figura 4 – Utilização de MCB em um paciente que sofreu queimaduras faciais de segundo grau



A - Paciente apresentando queimaduras de segundo grau causadas por exposição às chamas; B – Máscara de CB aplicada sobre as lesões; C – Reepitelização observada 17 dias após a queimadura; D – Face curada após mais 28 dias.

(Fonte: Adaptado de CZAJA *et al.*, 2007)

Por outro lado, a associação de células com biomateriais vem sendo estudada como uma tentativa de auxiliar no reparo das lesões (JEREMIAS, 2013). Trabalhos *in vitro* demonstraram que a estrutura tridimensional da CB, com grande capacidade de reter água, estimula a adesão e proliferação celular (FU *et al.* 2013). Avaliações *in vitro*, das células cultivadas sobre matrizes de CB demonstraram cerca de 95% de viabilidade, além de morfologias típicas (MENDES *et al.*, 2009 & FU *et al.*, 2011).

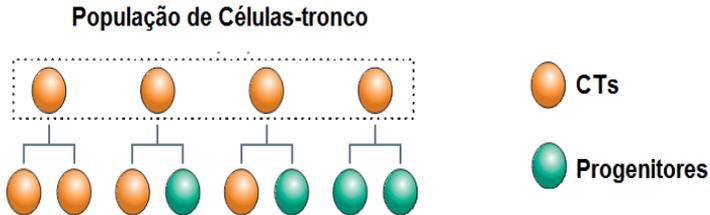
Trabalhos recentes tem associado células tronco (CT) à MCB para reparo de tecidos (BODIN *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.* 2012; OLYVEIRA *et al.*, 2013). Experimentos considerando a associação de tipos específicos de CTs à MCB para o tratamento de queimaduras serão apresentados no presente trabalho.

1.4 CÉLULAS TRONCO

As células tronco (CT) são caracterizadas pela capacidade de auto-renovação e pela habilidade de produzir células filhas que possam se diferenciar em tipos celulares especializados, conhecidas como progenitores. As CTs podem ser encontradas em tecidos embrionários, fetais ou adultos (SANDERS *et al.*, 2006), e dependendo de sua origem apresentam diferente potencial de diferenciação celular. As CTs totipotentes, presentes até o estágio da mórula, possuem capacidade de diferenciação em todos os tecidos e anexos embrionários. As CTs pluripotentes, encontradas na massa celular interna do blastocisto, apresentam potencialidade para diferenciação em tecidos provenientes dos 3 folhetos embrionários. Já as CTs multipotentes, encontradas em tecidos adultos, apresentam potencial de diferenciação mais restrito, contribuindo para a produção de apenas algumas linhagens celulares (ALISON & ISLAM 2009).

Os processos de auto-renovação e formação de progenitores podem ocorrer nas CTs por meio de divisões celulares simétricas, ou assimétricas, simultâneas ou não. Nas divisões simétricas, as CTs podem produzir duas células filhas que continuam a desempenhar um papel de CT (auto-renovação), ou dois progenitores comprometidos com uma mesma linhagem diferenciada. O processo de divisão assimétrica gera, a partir de uma CT, uma CT filha e um progenitor (Figura 5). O balanço entre esses dois modos de divisão pode ser controlado por sinais durante o desenvolvimento ou fatores ambientais, por exemplo, durante os períodos iniciais do desenvolvimento ou após lesões o número de CTs nos tecidos aumenta. (MORRISON & KIMBLE, 2006).

Figura 5 – Estratégias de divisão celular das CTs.



CTs são definidas por sua capacidade de auto-renovação e formação de progenitores, elas cumprem esta tarefa realizando diferentes estratégias de divisão celular. Esta figura ilustra uma combinação de divisões celulares simétricas e assimétricas, que mantém a população de CTs ao mesmo tempo em que gera progenitores.

(Fonte: Adaptado de MORRISON & KIMBLE, 2006)

Apesar de sua pluripotencialidade, os estudos e as aplicações clínicas com as CTs embrionárias têm se mostrado desafiadores em razão de controvérsias éticas em torno de sua utilização. Desse modo, estudos vêm se dedicando à identificação de CTs em tecidos adultos como modo de desenvolver estratégias para a regeneração e reparo tecidual, uma vez que mesmo possuindo uma menor potencialidade, estas células mantêm suas características de auto-renovação e alto potencial de proliferação. Outro fator importante ao se considerar CTs adultas para o reparo tecidual, consiste no fato de estas células serem obtidas diretamente do paciente a ser tratado, o que eliminaria as complicações relacionadas à rejeição (BAKSH *et al.*, 2004).

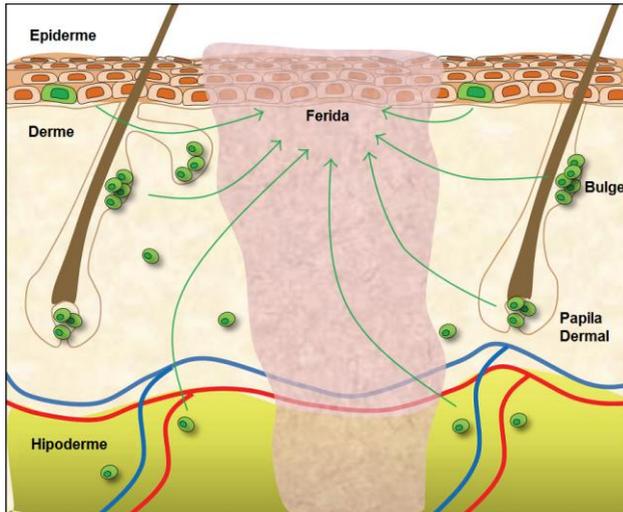
Atualmente tem sido hipotetizado que todos os tecidos adultos possuem compartimentos tronco, nos quais existem CTs residentes. Estas são responsáveis pela manutenção da homeostase dos tecidos ao longo da vida e tendem a auxiliar no reparo de lesões (JEREMIAS, 2013). A existência destas CTs nos tecidos adultos é suportada por microambientes especializados denominados nichos. Estes consistem em localizações anatômicas específicas que regulam como as CTs participam na regeneração, manutenção e reparo de seus respectivos tecidos. Os nichos controlam a reposição das CTs de modo que não haja grande depleção ou exagerada proliferação, que poderia levar a formação de tumores

(SCADEEN, 2006). Apesar de ser clara a influencia do nicho sobre as CTs contidas nestes, a localização anatômica dos nichos adultos não está claro para todos os tecidos (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008).

No que diz respeito ao nicho das CTs no tecido cutâneo, pode-se salientar que já foram localizados na epiderme, derme e tecido subcutâneo. O nicho de CT na epiderme encontra-se em três locais diferentes: bulge do folículo piloso, na glândula sebácea e na camada basal da epiderme. As células desta última região regulam a estratificação epitelial, foliculogênese e reparo de lesões. Os nichos da região dérmica ainda não são completamente compreendidos, porém estudos recentes sugerem sua localização na papila dérmica dos folículos pilosos, em regiões perivasculares e na matriz extracelular, como demonstrado na Figura 6 (JEREMIAS, 2013; WONG *et al.* 2012).

As CTs derivadas da derme possuem características fenotípicas e potencialidades distintas como: aderência ao plástico; capacidade de diferenciação *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos; marcadores de superfície mesodermis e atividade imunorregulatória. Estas são características também presentes em Células tronco mesenquimais (CTMs) (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012), por isso no presente trabalho, as CTs provenientes da derme são denominadas de células tronco mesenquimais derivadas da derme (dCTMs).

Figura 6 – Nichos das CTs na pele.



Populações de CTs (indicadas em verde) tem sido identificadas em vários nichos por toda a pele. CTs dermais podem existir na papila dérmica, na matriz extracelular ou em integração com vasos. (Fonte: Adaptado de WONG *et al.* 2012).

1.4.1 Características das CTMs

Em 1968, Friedenstein e colaboradores isolaram células da medula óssea, com a capacidade de formar colônias aderentes ao plástico, possuíam morfologia fibroblastóide e podiam formar ossos quando implantadas de maneira subcutânea. Estas células foram chamadas de Células tronco Mesenquimais (CTM) da medula óssea, baseado na hipótese de que vários tecidos de origem mesenquimal poderiam ser gerados através destas células (SCHIPANI & KRONENBERG, 2008).

Atualmente, tem sido descrito o isolamento de CTMs de outros órgãos e tecidos como: gordura, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico, placenta, polpa dentária, tendões e músculo esquelético, sendo que a presença destas células é sugerida em todos os tecidos e órgãos pós-natais (DA SILVA MEIRELLES, 2008). O conhecimento atual sobre as

CTMs é baseado principalmente em métodos de cultura, por isso, vários estudos tem se dedicado a identificar características fenotípicas destas células *in vivo*, bem como sua origem, participação na formação dos tecidos, habilidade de auto-renovação e localização anatômica (SCHIPANI & KRONENBERG, 2009).

Baseando-se no comportamento *in vitro* das CTMs, a *International Society for Cellular Therapy*, definiu critérios para a identificação de CTMs, como: proliferação; aderência ao plástico; expressão dos marcadores de membrana CD105, CD73 e CD90 e ausência da expressão de CD45, CD34 e CD14; e capacidade de diferenciação *in vitro* em células como osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006).

1.4.2 Utilização das CTMs no reparo de lesões cutâneas

As CTMs são de grande interesse para pesquisas e ensaios clínicos, apresentando um grande potencial de aplicabilidade em engenharia de tecidos. Primeiramente, as CTMs representam baixo risco imunogênico e tumorigênico, o que as confere a possibilidade de enxerto (ELISSEEFF *et al.*, 2005). Também já foi demonstrado que estas células são naturalmente recrutadas pelo organismo para reparar tecidos danificados, porém o mecanismo de ação ainda não é completamente definido.

As CTMs podem agir em lesões se diferenciando nos tipos celulares afetados, porém têm-se notado que elas não tem grande sobrevivência no local das lesões, mesmo apresentando resultados positivos no reparo das mesmas. De acordo com estas observações, recentemente tem se discutido que o efeito de reparo das CTMs ocorre devido ao seu efeito parácrino. Por meio de secreção de diversos fatores, essas células podem afetar a migração, proliferação e sobrevivência de outras células do local da lesão, desencadeando um melhor reparo (WONG *et al.* 2012).

Devido à sua ampla localização nos tecidos *in vivo*, há uma maior facilidade de obtenção das CTMs comparados a outros tipos celulares. A localização destas células em tecidos como a pele, permite que elas sejam isoladas a partir de uma simples biópsia, o que se mostra um processo muito menos traumático do que a retirada de medula óssea por exemplo. A utilização da pele como uma fonte de CTs também é facilitada por a pele ser um tecido muito abundante e estar em constante renovação, além de possuir células originadas da mesoderme e ectoderme e apresentar diferentes nichos conhecidos de CTs (ROSENBAUN *et al.*, 2008; VISHNUBALAJI *et al.* 2012).

As dCTMs se mostram promissoras para o reparo de lesões cutâneas. Em 2013, Jeremias demonstrou que estas células podem ser cultivadas sobre MRDs, mantendo sua viabilidade e características fenotípicas. Quando aplicadas em camundongos, as MRDs juntamente com as dCTMs aumentam o tecido de granulação, promovem o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, estimulam a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização. Deste modo tem sido demonstrado que estas dCTMs aceleram o reparo tecidual, provavelmente através da modulação da expressão de genes relacionados ao reparo tecidual na área da lesão (JEREMIAS, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista os grandes números de ocorrências de queimaduras e a gravidade destas lesões, é importante que se invista em campanhas de prevenção para diminuir estas ocorrências. No presente trabalho, sugerimos que o levantamento de dados de prontuários realizado no HIJG nos proporcionará um melhor entendimento da problemática das queimaduras, e a possibilidade de traçar um perfil epidemiológico local. Por meio do estudo de variáveis como: agente causador, idade, gravidade das lesões e superfície corporal queimada, podemos traçar campanhas de prevenção locais com maior eficácia, além de prover dados para o desenvolvimento de novos tratamentos para lesões cutâneas.

A obtenção de dados sobre os principais tipos de queimaduras, pode guiar novas pesquisas no desenvolvimento de biomateriais e integração dos mesmos com células e fatores que auxiliem na regeneração dessas lesões.

O uso de biomateriais associados à dCTMs tem se mostrado promissor para o tratamento de feridas cutâneas (CASTRO, 2013; JEREMIAS, 2013). Porém a associação de dCTMs com MCBs não foi encontrada na literatura durante a realização do presente trabalho. Além das características físico-químicas que tornam a CB um bom biomaterial para a aplicação em lesões cutâneas, estas membranas apresentam baixo custo de produção e podem ser moldadas em diferentes tamanhos, sendo estes diferenciais em relação à MRDs existentes no mercado. Tendo em vista essas perspectivas, no presente trabalho buscamos avaliar a associação de dCTMs com MCBs, para futura aplicação no tratamento de lesões cutâneas.

3 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho de conclusão de curso será apresentado em dois capítulos:

- I. **Capítulo 1:** Estudo epidemiológico de 2007 a 2009 realizado no Hospital Infantil Joana de Gusmão.
- II. **Capítulo 2:** Avaliação da associação das células tronco mesenquimais às matrizes de celulose bacteriana e seu uso no reparo de lesões de pele.

Cada capítulo possui objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusão específicos.

Capítulo I

Estudo epidemiológico de 2007 a 2009
realizado no Hospital Infantil Joana de
Gusmão

“Tenho a impressão de ter sido uma
criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma
pedrinha mais lisa ou uma concha mais
bonita que as outras, enquanto o imenso
oceano da verdade continua misterioso
diante de meus olhos”
(Isaac Newton)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil epidemiológico dos pacientes queimados internados na Unidade de Queimados (UQUE) do HJG, no período de 2007 a 2009, visando um maior conhecimento a respeito do trauma e a disseminação de informações de prevenção através de diferentes meios de divulgação.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Traçar o perfil epidemiológico das crianças internadas na UQUE no período de 2007 a 2009;
- Identificar e relacionar os principais agentes causadores de queimaduras, as circunstâncias em que ocorreram as lesões e a gravidade das mesmas;
- Apresentar dados coletados e medidas preventivas em eventos de divulgação científica, como Semana de Ensino Pesquisa e Extensão (SEPEX) e Semana da Biologia;
- Confeccionar folders para distribuir em escolas, hospitais, etc.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

O levantamento de dados referentes ao presente estudo foi realizado nas dependências do HIJG, localizado em Florianópolis – SC. A consulta aos prontuários ocorreu no Serviço de Arquivo Médico (SAME), onde foram coletados dados registrados dos pacientes internados na UQUE entre 2007 a 2009. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HIJG em sobre o parecer nº 035/2013.

Os dados coletados dos prontuários foram: idade sexo e cidade de origem do paciente, agente causador, profundidade, extensão corporal, localização corpórea e ambiente em que ocorreu a queimadura; profissão dos pais; tempo de internação; e se houve ou não necessidade de enxerto. Durante a pesquisa, os dados coletados dos prontuários foram registrados em um protocolo (Anexo - A), previamente elaborado pelos pesquisadores, e tabulados em forma de planilha eletrônica, por meio do programa Microsoft Excel (Microsoft CorporationTM).

Não foram considerados dados dos pacientes cujos prontuários apresentaram escrita ilegível ou pacientes internados na UQUE cuja causa de internação não fosse por queimaduras.

5.1.1 Agrupamento dos dados coletados para a análise

Os dados coletados nos prontuários foram agrupados para permitir uma melhor visualização das variáveis e diminuir problemas com falta de padronização no preenchimento dos prontuários. Os agrupamentos foram realizados conforme as classificações descritas a seguir.

Idade

O agrupamento das idades foi feita de acordo com a classificação de Marcondes (1991), e está representada na Tabela 2.

Região Corporal

Os dados referentes às regiões corporais lesionadas foram agrupados de acordo com a classificação descrita na tabela 3. Os pacientes que possuíam queimaduras em mais de uma região corporal ou que a

localização das lesões nos prontuários foi descrita como “toda a região corporal”, foram contabilizados em mais de uma categoria.

Tabela 2 - Classificação dos pacientes segundo a faixa etária

Faixa Etária	Idade
Recém Nascido	0 - 29 dias
Lactente	29 dias - 2 anos
Pré-escolar	2 - 6 anos
Escolar	6 - 10 anos
Pré-púberes	10 - 12 anos
Púberes	12 - 16 anos

Tabela 3 - Classificação segundo a região corporal afetada

Categoria	Dados agrupados
Cabeça e pescoço	Face, couro cabeludo, cabeça e pescoço
Membros superiores	Mãos, punhos, braço, antebraço e ombro
Tronco	Tórax e abdomen
Costas	-----
Membros Inferiores	Coxas, Tornozelos, pés, joelhos e pernas
Genitália	-----
Nádegas	-----

Superfície corporal queimada (SCQ)

A extensão corporal das lesões causadas por queimaduras é descrita em porcentagem nos prontuários, com a nomenclatura de Superfície Corporal Queimada (SCQ). Os pacientes foram classificados em pequenos, médios e grandes queimados de acordo com a área da SCQ, conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação dos pacientes de acordo com a SCQ

SCQ	
Pequenos Queimados	0-10% da SCQ
Médios Queimados	10 - 20% da SCQ
Grandes Queimados	> 20% da SCQ

Profundidade

As queimaduras foram classificadas quanto a profundidade em 1º, 2º ou 3º grau. Não foram consideradas as divisões de 2º grau superficial e profunda, pois esta informação não constava em muitos prontuários. Os pacientes internados que possuíam queimaduras de diferentes profundidades foram contabilizados em mais de uma classificação. Por exemplo, se o paciente apresentou queimaduras de 1º e 2º grau, ele foi contabilizado nas duas categorias.

Agentes Causadores

Os agentes causadores foram agrupados de acordo com sua similaridade em diferentes categorias, conforme descrito na tabela 5. No presente trabalho o álcool foi considerado como uma categoria independente, apesar de ser um líquido inflamável, a fim de possibilitar análises mais diretas relacionadas a este agente causador. Os agentes com apenas uma ocorrência e sem aparente relação com os demais grupos foram classificados como “Outros”.

Tabela 5 - Classificação dos agentes causadores em categorias

Agentes Causadores	
Categoria	Dados Agrupados
Líquidos aquecidos	Água, café, leite, óleo, banha e sopa
Álcool	_____
Fogo	Fósforo, isqueiro, chama, brasa, fogueira e fogo de palha
Inflamáveis	Gasolina, tiner, verniz e querosene
Contato	Espeto, forno, plástico e toalha quente
Químicos	Produtos químicos, soda cáustica
Eletricidade	_____
Outros	Explosão de aparelho celular, explosão de spray, polenta, rojão, explosão de panela de pressão e acidente de trânsito

5.1.2 Análise dos dados dos prontuários

As variáveis coletadas foram analisadas independentemente, através de frequência simples e percentual. As relações consideradas de maior importância para o conhecimento do perfil das crianças queimadas foram analisadas através de gráficos comparativos, montados com o programa GraphPad Prism®, facilitando a relação entre variáveis. Não foram analisadas as seguintes variáveis: profissão dos pais, cidade de origem e tempo de internação.

5.1.3 Divulgação de medidas de prevenção

Paralelamente à coleta de dados e análise dos mesmos, foi realizada divulgação de medidas preventivas contra queimaduras, como parte de um projeto de extensão desenvolvido no LACERT. Para isso foram confeccionados: folders utilizando o programa Illustrator[®], cartilha online, banner para a apresentação em escolas e SEPEX, e maquete representando um modelo da pele e suas camadas.

6 RESULTADOS

No presente estudo foram analisados 188 prontuários de crianças internadas no HIJG entre os anos de 2007 e 2009, sendo que 14 destes prontuários eram referentes a internações por outros motivos que não queimaduras, por isso estes últimos não foram considerados para a presente análise. Sendo assim, foram analisados 174 casos de queimaduras no período acima descrito.

Os resultados referentes a idade e sexo dos pacientes queimados demonstraram que houve uma maior prevalência do sexo masculino e uma maior incidência de queimaduras nas faixas etárias dos lactantes e pré-escolares.

A maioria das queimaduras ocorreu no ambiente domiciliar e se deu em mais de uma região corporal, sendo que os pequenos queimados e aqueles que não necessitaram de enxerto constituíram a maioria dos pacientes.

Os agentes causadores foram agrupados de acordo com a classificação estabelecida no item 5.1.1, sendo os líquidos aquecidos os mais expressivos. Ocorreu variação entre os principais agentes causadores considerando os responsáveis por diferentes SCQ, diferentes idades das crianças e necessidade ou não de enxerto.

A fim de divulgar os resultados e transmitir informações de prevenção, alguns dados do presente trabalho foram apresentados em estande da SEPEX no ano de 2010; na Escola Padre Anchieta (Florianópolis –SC) em 2010, como parte do Bio na Escola; na mostra de Práticas Pedagógicas do Curso de Ciências Biológicas em 2013; e como parte de um minicurso realizado pelo Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), na Semana da Biologia em 2013. Para as apresentações foram utilizados: maquete com a estrutura da pele e representação de queimaduras de diferentes profundidades; banner com informações básicas sobre conceitos, prevenção e primeiros socorros de queimaduras; distribuição de folders (ANEXO B).

As apresentações tiveram enfoques diferentes dependendo do público presente. Na Escola Padre Anchieta as apresentações foram voltadas para alunos do ensino fundamental, conceitos biológicos e estatísticos foram abordados de maneira bastante geral, foi dado mais enfoque na gravidade das lesões, medidas de prevenção e primeiros-socorros. Na mostra de Práticas pedagógicas, foi dado um enfoque na importância de levar este tema para as crianças, a maquete foi um material

considerado bastante ilustrativo para esta função e houve distribuição de folders.

Durante o minicurso realizado pelo LACERT em 2013, foram apresentados conceitos biológicos, porém o enfoque se deu nos dados estatísticos encontrados, e na necessidade das campanhas de prevenção. Já no estande da SEPEX o público foi bastante heterogêneo e o conteúdo da apresentação variou de acordo com o interesse das pessoas.

Os resultados desse presente trabalho foram apresentados para a banca no dia 14 de fevereiro de 2014 e estão disponíveis na versão impressa deste. A versão online não possui todos os resultados, pois estes estão em análise para publicação.

7 DISCUSSÃO

7.1 IDADE, SEXO E AMBIENTE DE OCORRÊNCIA

As queimaduras são traumas muito severos que desencadeiam respostas metabólicas intensas, levando à repercussões sistêmicas e sequelas físicas e emocionais. As crianças representam cerca de dois terços do total dos queimados da população em geral e possuem epidemiologia e respostas imune e inflamatória diferente dos adultos. O conhecimento dos aspectos epidemiológicos das queimaduras é importante de ser adquirido, uma vez que, na maioria das vezes estes acidentes poderiam ser evitados. Países em desenvolvimento, como o Brasil, necessitam de estudos epidemiológicos para que se possa traçar melhores medidas preventivas direcionadas a este tipo de trauma (PEREIMA, 2008).

No presente estudo, a análise de 174 crianças afetadas por queimaduras demonstrou que há uma maior incidência desse tipo de trauma no sexo masculino, estando de acordo com outros trabalhos na literatura (ANLATI *et al.* 2002; PIRES, 2003; PEREIMA, 2008; DASSIE & ALVES, 2010; LACERDA *et al.*, 2010; YODA, LEONARDI e FEIJÓ, 2013). Este fato pode ser explicado pela diferença de comportamento entre os sexos, tendo os meninos mais liberdade para brincar e uma maior disposição para brincadeiras que envolvem maiores riscos de ocorrência das queimaduras (MARTINS & ANDRADE, 2007).

Em relação à idade dos pacientes considerados, a faixa etária predominante para ambos os sexos foi a dos pré-escolares seguida pela faixa dos lactentes. De fato, estas faixas etárias são descritas por possuírem um grande número de crianças afetadas por queimaduras (MUKERJI *et al.*, 2001). Isso tende a ocorrer, pois, as crianças são ativas e curiosas, e não possuem destreza para manipular os objetos, sendo então mais vulneráveis e dependentes da atenção dos adultos (MARTINS & ANDRADE, 2007).

O ambiente de ocorrência mais frequente foi à própria casa das crianças. Estes números são semelhantes aos de outros trabalhos realizados no HIJG, em períodos distintos (JUNIOR, 2004; PIRES, 2003; DE MELO, 2004). Esses dados são importantes, pois ressaltam que o ambiente domiciliar é potencialmente inseguro, caso medidas preventivas não sejam adotadas, principalmente nos cômodos da cozinha e banheiro, onde muitos agentes causadores estão presentes.

7.2 AGENTES CAUSADORES

A análise dos agentes causadores demonstrou que os líquidos aquecidos foram responsáveis pela maioria das queimaduras. Este padrão coincide com a literatura (COSTA, 1999; MARTINS & ANDRADE, 2007), e provavelmente se dá pela facilidade que as crianças possuem de ter acesso a líquidos aquecidos em ambientes como cozinha e banheiro.

Os líquidos aquecidos foram seguidos pelos inflamáveis, sendo que o álcool líquido sozinho também possui grande representatividade. A importância de se analisar o álcool líquido como uma categoria independente consiste em demonstrar a importância da proibição de sua venda e comparar posteriormente se haverá uma redução no número das queimaduras, ou da gravidade das mesmas.

Os acidentes com fogo representaram 6.90% do total de casos. Outros agentes causadores, como contato, químicos e eletricidade não foram registrados muito frequentemente. As queimaduras por contato de maneira geral tendem a causar queimaduras de primeiro grau ou segundo grau superficiais, não levando as pessoas a procurarem atendimento médico. Já as queimaduras elétricas e químicas são normalmente encontradas em menores proporções em estudos epidemiológicos (PIRES, 2003; PEREIRA, 2008; DAISSE & ALVES 2010).

7.2.1 Relação entre agentes causadores, idade e prevenção de queimaduras

É importante salientar que os agentes causadores são intimamente relacionados com a idade dos pacientes. Dentre os lactentes, a maioria foi queimada com líquidos aquecidos. Segundo Mukerji *et al.* (2001), isso ocorre, pois, nesta idade, as crianças têm uma tendência a agarrar ou virar recipientes com líquidos quentes, e sua pouca mobilidade, torna-os mais vulneráveis em retirar-se de bebidas quentes derramadas ou de uma banheira de água quente. Entre os pré-escolares essas queimaduras por este mesmo agente atingiram a maioria dos pacientes, estas crianças tendem a permanecer a maior parte do tempo dentro de casa, muitas vezes na cozinha, onde podem puxar toalha de mesa ou até mesmo as panelas do fogão por curiosidade, se tornando alvos fáceis.

Queimaduras por contato só foram registradas em 4 prontuários, sendo dois deles entre os lactentes e dois entre os pré-escolares. Estas queimaduras ocorrem pelos mesmos motivos daquelas com líquidos aquecidos explicados a cima, e podem ser facilmente evitadas.

Queimaduras referentes a líquidos aquecidos e contato com objetos quentes, ocorrendo em casa, indicam certa imprudência por parte dos responsáveis pelas crianças afetadas. Nestes casos, pequenas modificações no ambiente e na atitude dos pais seriam suficientes para evitar as queimaduras infantis. Algumas dessas medidas seriam: manter a criança afastada de fornos, usar toalhas de mesa curtas, não carregar crianças no colo ao cozinhar e ao tomar líquidos aquecidos, não deixar cabos de panela voltados para fora do fogão, sentir a temperatura da água do banho e do leite da mamadeira antes da criança entrar em contato com esses líquidos. Medidas como estas são eficazes, de baixo custo e tendem a evitar sofrimento e sequelas que existem em crianças que sofrem queimaduras (MARTINS & ANDRADE, 2007).

Entre os escolares, pré-púberes e púberes os agentes causadores mais significativos foram os líquidos aquecidos e o álcool líquido, as proporções de cada agente foram bastante semelhantes. Esta diferença dos agentes causadores entre crianças menores maiores de 6 anos já tem sido relatada na literatura (JUNIOR, 2004; PIRES, 2003; PEREIRA, 2008).

Na medida em que as crianças crescem, elas começam a explorar mais o ambiente, tendo mais contato com fogueiras, fósforos e isqueiros, os quais são essenciais para a combustão dos agentes inflamáveis. O grande número de casos relativos a agentes inflamáveis, principalmente ao álcool líquido, demonstra a necessidade de retirar estes produtos do alcance das crianças, e até mesmo de não possuir produtos desta natureza em casa, se estes puderem ser substituídos por semelhantes. Estas ocorrências reafirmam a falta de vigilância e a necessidade de campanhas de conscientização dos responsáveis e da comunidade. Outras medidas, como a proibição da venda de álcool líquido e dispositivos de segurança em acendedores e fósforos também são importantes para a redução destes números.

Apesar das queimaduras elétricas representarem poucos dos casos registrados neste estudo, elas tendem a ser bastante severas. Sua prevenção é importante, já que esta é a principal causa de invalidez por amputação de segmentos corporais (MEZA-ORTIZ *et al.*, 2000). A prevenção deste tipo de queimadura, quando doméstica, pode ser realizada protegendo tomadas e retirando extensões e aparelhos elétricos do alcance das crianças. Existem também os casos de queimaduras que decorrem do contato com fios de alta tensão, normalmente ao soltar pipas, onde o importante seria orientar as crianças a realizarem esta atividade longe das redes elétricas (MARTINS & ANDRADE, 2007).

Segundo Panjeshahin e colaboradores (2001), é importante que os pais também sejam instruídos sobre os aspectos preventivos de educação às crianças, proporcionando entretenimento que as mantenham longe de riscos. Além disso, os professores, em seu papel de educadores, também poderiam ser treinados a fim de ensinarem as crianças a evitarem situações se risco relacionadas a queimaduras.

7.2.2 Profundidade das lesões, superfície corporal queimada e sua relação com os agentes causadores

Considerando a profundidade das lesões, muitos pacientes possuíam queimaduras de diferentes profundidades, porém houve maior prevalência de queimaduras de 2º grau, seguida por queimaduras de 3º grau. A maioria desses casos foram registrados em crianças de 0 a 10 anos. Isso se dá provavelmente devido ao grande número de escaldamentos nestas idades.

Os pacientes estudados apresentaram uma SCQ média de 10.9%, com um predomínio dos pequenos e médios queimados, que juntos totalizaram cerca de 70% dos casos de internação. Apenas 30 pacientes dos 174 apresentaram mais de 20% da superfície corporal queimada, esta distribuição pode ser relacionada ao grande número de escaldamentos registrados. Além disso, deve-se considerar que a análise destes dados é somente pediátrica, não considerando queimaduras ocupacionais que poderiam levar a maiores áreas corporais queimadas.

Apesar de queimaduras por escaldamento e álcool representarem a maioria dos casos registrados no presente trabalho, e serem registrados na literatura como agentes que podem atingir grandes extensões de SCQ (PEREIMA, 2003), a maioria dos casos registrados aqui foram de menos de 20% da SCQ. Porém, entre todos os agentes causadores, foram estes que causaram as maiores extensões de queimaduras nos pequenos, médios e grandes queimados.

Dentre os pequenos e os médios queimados, os maiores agentes causadores foram os líquidos aquecido, seguidos pelo álcool e fogo. Porém, dentre os grandes queimados a maioria dos casos, ocorreu devido ao álcool, seguido pelos líquidos aquecidos e os outros inflamáveis.

Na maioria dos pacientes a reepitelização ocorreu de forma espontânea, enquanto que 40.23% necessitaram de enxerto. Apesar de o número de enxertos realizados após queimaduras por líquidos aquecidos ser maior, isso pode ter ocorrido apenas devido ao número de registros de

escaldaduras ser maior, já que observamos que o álcool foi responsável pela maioria das queimaduras de 3º grau.

7.3 REGIÕES DO CORPO MAIS AFETADAS POR QUEIMADURAS

No presente trabalho foi possível observar que a maioria das crianças tinham múltiplas regiões do corpo afetada pelas queimaduras, isso se deve ao fato de os principais agentes causadores como líquidos aquecidos ou explosões com inflamáveis atingirem mais de uma região do corpo. As regiões mais afetadas foram os membros superiores, seguidos pelo tronco e cabeça e pescoço. A maior incidência de queimaduras nestas áreas corporais ocorre, pois, crianças tendem a se apoiar em superfícies e objetos para alcançar algo de seu interesse, e podem assim, derrubar líquidos aquecidos sobre a cabeça, membros superiores e tronco, além de tocar diretamente em objetos quentes queimando membros superiores (DE MELO, 2004).

Segundo Pereima (2003), queimaduras relativas à explosões por álcool também são conhecidas por afetarem mais diretamente o tronco e regiões superiores. Já que o álcool líquido foi um agente bastante representativo no presente estudo, isto justificaria a maior incidência de queimaduras nas regiões superiores do corpo.

Os membros inferiores também representaram grande parte das ocorrências . Podendo estar relacionadas com o fato de crianças um pouco maiores tenderem a andar perto de fogueiras, ou brincarem com fósforos e acendedores sentadas no chão, com o instrumento entre as pernas, facilitando esse tipo de queimadura. (MARTINS & ANDRADE, 2007)

7.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ÁLCOOL LÍQUIDO E SUA PROIBIÇÃO

A maior representatividade do álcool em grandes queimados, sua maior participação nas queimaduras de 3º grau, e sua relação com a necessidade de enxertos, deixa evidente a gravidade das lesões que podem ser causadas por este agente. Em 2002, uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proibiu a comercialização de álcool líquido em suas concentrações mais inflamáveis, devido principalmente ao grande número de acidentes e queimaduras que ocorrem primariamente

com crianças todos os anos, porém por meio de ação judicial das empresas produtoras de álcool, essa proibição foi derrubada (WERNECK, 2013).

Ainda no ano de 2002, o governo lançou informativos explicando a resolução que proibia o uso do álcool, além de demonstrar alguns importantes números relacionados às queimaduras. Segundo este informativo, aproximadamente 1 milhão de reais é gasto por mês pelo Ministério da Saúde com a internação de pessoas com queimaduras graves, e ocorrem cerca de 45 mil queimaduras com álcool por ano envolvendo crianças. Esses grandes números ocorrem em razão do fácil acesso que as crianças possuem a este produto dentro de suas casas, onde o álcool líquido é utilizado para acender churrasqueiras ou para limpeza doméstica (BRASIL, 2002).

Praticamente 11 anos depois, em fevereiro de 2013, o Tribunal Regional Federal (TRF), decidiu a favor da ANVISA e determinou novamente a suspensão das vendas do álcool líquido, com graduação maior que 54° GL. As empresas que desrespeitarem a proibição estão sujeitas a multas que variam de R\$ 2 mil a R\$ 1.5 milhão (WERNECK, 2013). Após a medida ter efeito as empresas ainda tinham 180 dias para se adequarem, por isso ainda não é possível analisarmos se os casos de queimaduras por esse agente causador sofreram diminuição desde a proibição de sua venda.

7.5 ESCOLHA DOS DADOS E PADRONIZAÇÃO DOS PRONTUÁRIOS

A coleta de dados através de análise dos prontuários nem sempre é uma tarefa fácil, muitas vezes foi observado que não havia padronização dos dados coletados. Essa falta de padronização foi encontrada entre diferentes prontuários e até mesmo dentro dos próprios prontuários, onde eram encontradas informações divergentes. Por causa destes fatores as análises foram bastante demoradas na tentativa de manter a fidelidade dos dados. Dentro dos prontuários ainda existem protocolos de coleta de dados impressos, onde deve-se marcar a SCQ, regiões do corpo afetada, agentes causadores, etc. Porém essas folhas na maioria das vezes não estavam preenchidas.

Dados presentes na literatura, como a relação das queimaduras como a renda familiar, não estavam presentes nos prontuários analisados, assim como não foi registrada a presença ou não de adultos no momento dos acidentes na maioria dos prontuários. Outra informação que na maioria das vezes não estava presente, era o que levou a ocorrência das queimaduras, explicitando se as mesmas foram acidentais ou intencionais,

por algum tipo de maus tratos, negligência ou tentativa de autoextermínio. Por este motivo a continuação do presente projeto visa à realização de entrevistas com os responsáveis pelas crianças queimadas que estão internadas no HIJG, além de coleta de dados de anos mais recentes para posterior comparação com os dados coletados.

Muitas vezes, a preocupação com o tratamento imediato das lesões provocadas por queimaduras acabam suprimindo questionamentos médicos sobre as circunstâncias nas quais as mesmas ocorreram. Além disso, a grande demanda de pacientes, a falta de protocolos de coleta de dados pré-estabelecidos e a falta de treinamento de novos profissionais auxiliam nesta lacuna na coleta de dados. Porém, é importante ressaltar, que não há como recuperar estas informações, as quais são essenciais pra se traçar um perfil epidemiológico confiável e realizar campanhas de prevenção para os públicos mais atingidos. A dificuldade de análise de dados de prontuários é relatada em outros trabalhos que seguem este mesmo padrão (MARTINS & ANDRADE, 2007).

8 CONCLUSÃO

- O perfil epidemiológico predominante das crianças com diagnóstico de queimadura internadas no HIJG neste estudo é de um menino (55.5%), em idade pré-escolar (29.9%), que se queima em casa (71.26%), com líquidos aquecidos (58.62%).
- A maioria dos pacientes (62.6%) apresentou queimaduras de 2º grau, até 20% da SCQ (70%), e múltiplas regiões afetadas, sendo os MS, troco e cabeça as mais frequentes.
- Crianças menores de 6 anos de idade tendem a se queimar mais com líquidos aquecidos, enquanto crianças a cima dessa idade tendem a se queimar com inflamáveis, especialmente álcool líquido.
- A maioria dos pacientes apresentou epitelização da SCQ espontaneamente. Excluindo-se os 11 prontuários que não possuíam esta informação, 43% das internações necessitaram de enxertos.
- O álcool líquido foi o agente que mais causou queimaduras compreendendo mais de 20% da SCQ (12 dos 30 casos), dentre todas as queimaduras com este agente, 72% levaram à necessidade de enxerto. Corroborando com esta informação, o álcool ainda foi o maior responsável (34.92%) por queimaduras de 3º grau.
- A prevenção através da melhor supervisão das crianças e modificação do ambiente doméstico, onde ocorre à maioria das queimaduras, parece ser o melhor caminho para a prevenção destas lesões.
- A prevenção deve ser direcionada para cada etapa do desenvolvimento, através de campanhas de prevenção visando instruir pais, professores e as próprias crianças.

Capítulo II

Avaliação da associação das células tronco mesenquimais às matrizes de celulose bacteriana e seu uso no reparo de lesões de pele.

"Quem é você?" perguntou a Lagarta.
"Eu... eu mal sei, Sir, neste exato momento...pelo menos sei quem eu era quando me levantei essa manhã, mas acho que já passei por várias mudanças desde então"

9 OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a integração e viabilidade de CTMs derivadas da derme humana em MCBs e avaliar seu potencial terapêutico *in vitro* para o tratamento de lesões de pele.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das dCTMs associadas à MCBs *in vitro*;
- Avaliar a adesão e morfologia das dCTMs associadas à MCBs *in vitro*;
- Investigar se ocorrem mudanças na expressão de marcadores de superfície típicos de CTMs após o cultivo das mesmas sobre MCBs *in vitro*;
- Estabelecer uma metodologia de aplicação das dCTMs associadas às MCBs em modelo de lesão de pele em camundongos.

10 MATERIAIS E MÉTODOS

10.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE PELE

Os fragmentos de pele humana foram obtidos da região do couro cabeludo de pacientes submetidos a cirurgias plásticas (*lifting* facial), através de colaboração com o Ilha Hospital e Maternidade. Os pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico aceitaram doar os fragmentos de pele, após a apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo C).

O presente protocolo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tendo recebido certificado de aprovação (certificado No 98) do Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina.

10.2 CULTURA PRIMÁRIA E ISOLAMENTO DE CTs DERIVADAS DA PELE

Os fragmentos de pele foram incubados com 12.5 U/mL de dispase (BD) durante 15 horas, à 4°C, e após este período, a epiderme e a hipoderme foram retiradas, assim como os folículos pilosos. O tecido dérmico foi cortado com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica em fragmentos menores, os quais foram mantidos em solução de tripsina/EDTA (BD) durante 45 minutos a 37°C. Após esse período os fragmentos foram colocados em meio de cultura DMEM com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), para inibir a ação enzimática.

A solução foi filtrada utilizando-se um *cell strainer* (poros de 70 µm) e centrifugada por 7 minutos a 1.200 RPM. As células obtidas foram ressuspensas e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SBF, estreptomicina e penicilina, em garrafas de cultura de 25 cm², a 37°C, 5% CO₂. Após aproximadamente 4 dias, o meio de cultivo foi trocado, selecionando assim apenas as células aderentes ao plástico.

Ao atingir confluência de aproximadamente 80%, as células aderentes ao plástico, foram retiradas das garrafas de cultura com a utilização de tripsina 0,05% durante 3 minutos a 37°C, após este período a ação enzimática foi inibida com DMEM suplementado com 10% de SBF e as células centrifugadas (1.200RPM) durante 7 minutos. As células foram então replaqueadas em novas garrafas de cultura e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SBF a 37°C, 5% CO₂. Esse processo foi

repetido diversas vezes, sendo que cada uma delas foi contabilizada como uma passagem celular. As células do presente trabalho foram utilizadas entre as passagens 5 e 8.

Para o presente trabalho foi utilizada uma linhagem de células provenientes de um paciente, em passagens distintas, as quais foram previamente caracterizadas como CTMs em nosso laboratório através de marcadores de superfície específicos e diferenciação celular (JEREMIAS, 2013).

10.3 PRODUÇÃO DA MATRIZ DE CELULOSE BACTERIANA

As matrizes de CB foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório de polímeros e compósitos do centro de engenharias da mobilidade (campus Joinville UFSC), seguindo os protocolos estabelecidos em Recouvreux (2008). Para a produção destas matrizes, foi utilizada a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)" (Fundação André Tosello), Campinas – SP.

O cultivo das bactérias foi realizado utilizando-se meio de cultivo composto por manitol (25 g·l⁻¹), extrato de levedura (5,0 g·l⁻¹) e bactopectona (3,0 g·l⁻¹). Após o meio de cultivo ser esterilizado por autoclavagem e resfriado, foram adicionados 5% (v/v) do inóculo de bactérias preparado previamente. Esta solução contendo bactérias e meio de cultura foi distribuída em placas de 96 e 24 poços, nos volumes respectivos de 100 e 300 µL. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por um período de três a sete dias. O tempo de permanência do cultivo foi proporcional a espessura do arcabouço hidrogel desejado, quanto maior o tempo, maior a espessura do arcabouço produzido.

Decorrido o tempo de cultivo a matriz de CB foi coletada e submetida ao tratamento de purificação. O tratamento de purificação consiste na imersão da membrana hidrogel em uma solução de NaOH a 0,1 M, a 90°C, por 24 horas, para remover as impurezas bacterianas e os eventuais resíduos contaminantes. Após esse tratamento a matriz foi lavada com água destilada durante 7 dias, com trocas a cada 24 horas. As matrizes foram então autoclavadas a 121°C por 20 minutos, e armazenadas em PBS1X na geladeira até o momento da utilização.

10.4 CULTURA DAS CÉLULAS DERIVADAS DA PELE EM MCB

Para a realização do cultivo das dCTMs sobre as MCB, estas foram mantidas imersas em meio de cultura DMEM + 10 % SBF por no mínimo 2 horas, para incorporação do meio de cultura nas mesmas. Após este período, as MCBs foram inseridas em poços de placas de cultura de 24 e 96 poços e as dCTMs e semeadas sobre estas matrizes de CB.

O plaqueamento em gota foi realizado com 35 μ L de dCTMs diluídas em meio de cultura, sobre MCBs produzidas em placas de 24 poços, as quais, após 1 hora, foram completadas com 300 μ L do mesmo meio. Esta técnica foi utilizada para a visualização das dCTMs com microscópio de contraste de fase. Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e viabilidade celular, o plaqueamento foi realizado em suspensão. Para isso, foram utilizados 100 μ L ou 300 μ L de meio de cultura em placas de 96 e 24 poços respectivamente. A quantidade de células plaqueadas variou com o tipo de análise desejada.

10.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DERIVADAS DA PELE

A análise da morfologia e adesão das dCTMs associadas às MCB foi realizada através de visualização em microscópio de contraste de fase óptico (OLYMPUS).

10.5.1 Análise da viabilidade celular (MTS)

Para avaliar a viabilidade celular sobre as matrizes de CB foi realizado o ensaio de MTS (Promega) [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfonil)-2H-tetrazolium)]. O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução deste composto em um produto cromogênico de cor púrpura, solúvel em meio de cultura (formazan). A biorredução do MTS é realizada por enzimas mitocondriais, quanto maior a atividade mitocondrial, maior a produção de cristais de formazan. A mudança de coloração do meio é diretamente proporcional a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Desta forma, a leitura da absorbância desta solução, mensurada por espectrofotometria, será proporcional à atividade mitocondrial e, por conseguinte, à proliferação celular.

Para avaliar a viabilidade das dCTMs cultivadas sobre as MCBs, foram plaqueadas cerca de 1×10^5 dCTMs em cada matriz, em placas de 96

poços. A absorvância foi medida em três pontos diferentes: dia 1, dia 4 e dia 7 após o plaqueamento. Em cada um desses dias as matrizes de CB com as células plaqueadas foram incubadas por 3 horas com MTS dissolvido em DMEM suplementado com 10% de SBF em estufa a 37°, 5% CO₂, e logo após foi realizada a leitura de absorvância (490 nm) em multileitora de placas (Tecan Infinite M200) no LAMEB I (UFSC).

Para evitar interferências de células que, por ventura, tenham aderido ao plástico, às matrizes de CB foram transferidas para novos poços antes da incubação com MTS.

10.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A fim de verificar a aderência e morfologia das CTMs aderidas às MCB, foi empregada a técnica de MEV. Para isso CTMs foram cultivadas sobre as matrizes de CB por 1, 4 e 7 dias com as mesmas condições descritas no item 10.5.1, e após esse período passaram por processo de fixação e desidratação. Primeiramente as amostras foram fixadas com glutaraldeído 2,5% por 24 horas, após esse período foi realizado o processo de desidratação em sequência de álcool em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), as amostras foram incubadas em cada série durante 20 minutos, a última etapa (álcool 100%) foi repetida três vezes por períodos de 30 minutos. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD 030), neste processo as partículas de álcool são substituídas por CO₂.

Ao final, as amostras foram metalizadas com uma cobertura de ouro de 30nm (metalizador Sputter Leica EM SCD 500) e então analisadas no microscópio eletrônico de varredura por captura de elétrons secundários em 15kV (Jeol JSM-6390LV). Os procedimentos de secagem em ponto crítico, a metalização e as análises no MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

10.5.3 Análise dos marcadores de CTMs por citometria de fluxo

A caracterização fenotípica dos antígenos de superfície CD 105, CD 90, e CD 73 da população de dCTMs associadas às MCB foi realizada através de citometria de fluxo. Para esta caracterização, foram utilizados os anticorpos conjugados à fluorocromos (BD Biosciences) descritos na Tabela 6.

Para os marcadores CD34 e CD45 foram utilizadas células mononucleares como controle positivo, uma vez que as dCTMs são caracteristicamente negativas para estes marcadores.

Tabela 6 - Marcadores de superfície utilizados na citometria de fluxo

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Isotipos
Anti-CD34	PE (Ficoeritrina)	IgG1 de camundongo
Anti-CD45	FITC (Isotiocinato de fluoresceína)	IgG1 de camundongo
Anti-CD73	PE	IgG1 de camundongo
Anti-CD90	FITC	IgG1 de camundongo
Anti-CD105	PerCP (Complexo proteico clorofila peredinina)	IgG1 de camundongo
Isotipo 1	PE	IgG1 de camundongo
Isotipo 2	FITC	IgG1 de camundongo
Isotipo 3	PerCP	IgG1 de camundongo

Para a realização do ensaio, as células cultivadas no plástico (placa de cultivo) e nas MCBs foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em PBS suplementado com 10% de SBF. Em seguida, aproximadamente 2.5×10^5 células foram incubadas com os anticorpos descritos na tabela 8 durante 1h a 4°C protegido de luz. Após o período de incubação das amostras, as células foram lavadas com PBS suplementado com 10% de SBF e centrifugadas a 1200 RPM durante 5 minutos. Ao final, os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 100µL de PBS suplementado com 10% de SBF e procedeu-se a análise no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD) no LAMEB I (UFSC). Os dados foram gerados pelo software FACSDiva 6.0 e analisados pelo Flowing Software 2.

10.6 IMPLANTAÇÃO DAS MCBs EM CAMUNDONGOS

Para definir um método de implantação das MCBs em camundongos foram utilizados animais disponibilizados pelo Biotério do LACERT, sendo que todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Animais (CEUA) da UFSC sob número de protocolo PP00810 (Anexo D). Foram utilizados camundongos de ambos os sexos, da linhagem C57BL/6, entre 4-8 meses e peso variando entre 20-30g.

Os animais foram acondicionados em caixas individuais de plástico com maravalha, em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas, ração sólida e água “ad libitum”. A utilização dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Todos os animais receberam anestesia geral com quetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) por via intramuscular. Posteriormente, foi realizada a tricotomia e assepsia da região dorsal dos animais, com solução de Iodopolvidona 10% e álcool 70°GL. Nesta região foi realizada uma lesão de pele de espessura total, deixando exposta a fáscia muscular. Foram testados 3 procedimentos de implantação descritos a seguir.

(1) Lesões de aproximadamente 1,5 cm X 1,5 cm, na região mediana do dorso do animal. Um molde com o tamanho específico foi utilizado para demarcar a área da lesão e a pele da região foi então cirurgicamente removida com auxílio de tesoura e pinça. Logo após, a lesão foi recoberta apenas com as MCBs produzidas em placas de 24 poços (aproximadamente 15,4 mm de diâmetro), as quais foram suturadas na área lesionada, utilizando fio de sutura 6.0 (Technofio).

(2) Lesões de aproximadamente 6,0 mm na região dorsal. Um punch cirúrgico de 6mm foi utilizado para excisão dos fragmentos da pele. Logo após, MCBs produzidas em placas de 96 poços (aproximadamente 6,0 mm de diâmetro), foram posicionadas nas lesões e cobertas com o filme adesivo Tegaderm™ (3M). Para evitar a retirada do filme adesivo foi suturado ao redor da lesão um anel de silicone de 8 mm de diâmetro.

(3) Lesões de aproximadamente 9,0 mm na região dorsal. Um punch cirúrgico de 9,0 mm foi utilizado para excisão dos fragmentos da pele. Logo após, a lesão foi recoberta com as MCBs produzidas em placas de 24 poços (aproximadamente 15,4 mm de diâmetro), e cobertas com o filme adesivo Tegaderm™ (3M). Para evitar a retirada do filme adesivo foi suturado ao redor da lesão um anel de silicone de 1,2 cm de diâmetro.

11 RESULTADOS

11.1 BIOCOMPATIBILIDADE E INTERAÇÃO DAS dCTMs COM MCBs *in vitro*

Com o intuito de buscar novas alternativas que possam acelerar e melhorar o reparo de lesões cutâneas foi avaliado no presente estudo a associação de dCTMs com MCBs *in vitro*. Para isso a análise da biocompatibilidade das células com as MCBs foi avaliada por meio de testes de viabilidade, integração, adesão e morfologia celular.

11.1.1 Viabilidade Celular

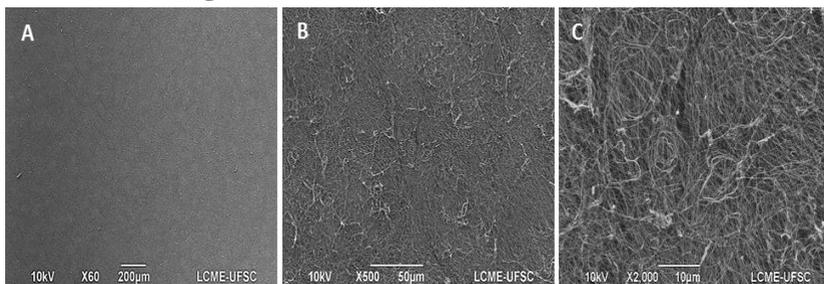
Para avaliar a viabilidade/proliferação celular das dCTMs, as dCTMs foram cultivadas sobre as MCBs, e submetidas ao ensaio de MTS em três dias diferentes (1, 4 e 7) após o plaqueamento. Os resultados obtidos mostraram que não foram constatadas diferenças ($P>0.05$) nos valores de MTS entre os dias analisados.

- Analise através de microscopia de varredura

Uma vez que o microscópio de luz não permite uma visualização ideal destas MCBs, por consistirem em um ambiente tridimensional (3D) e heterogêneo, foi realizada também a análise da adesão e morfologia através de MEV para que fosse possível entender melhor a interação das dCTMs com as MCBs. Para esta análise as células foram plaqueadas em suspensão para que as dCTMs ficassem mais espaçadas, permitindo uma melhor observação. Os intervalos de tempo foram os mesmos realizados nos testes de viabilidade celular (1, 4 e 7 dias).

A figura 10 mostra a estrutura 3D da face superior das MCBs em diferentes ampliações. Nesta superfície foram observados os microfilamentos que compõe as MCBs e sua organização entrelaçada. Além disso, foram visualizados os poros formados, sendo que estes apresentam dimensões muito pequenas e tamanhos desiguais (Figura 10).

Figura 7 - Estrutura 3D das MCBs vista em MEV



11.3 ESTABLECIMENTO DO IMPLANTE DE MCBs EM CAMUNDONGOS

A fim de avaliar o uso terapêutico da associação das dCTMs com as MCBs em teste pré-clínicos em modelo de lesão cutânea em camundongos, foram testados três procedimentos de implantação das matrizes nos locais lesionados descritos no item 9.6.

Os resultados desse presente trabalho foram apresentados para a banca no dia 14 de fevereiro de 2014 e estão disponíveis na versão impressa deste. A versão online não possui todos os resultados, pois estes estão em análise para publicação.

DISCUSSÃO

A CB representa um polímero natural com diversas aplicações potenciais (Tabela 1), muitas delas relacionadas às áreas biomédicas, como por exemplo, sua utilização em forma de curativos, visando à regeneração cutânea em casos de lesões crônicas ou queimaduras de espessura parcial. Ainda hoje, lesões por queimaduras são frequentes e muitas vezes necessitam ser tratadas com curativos, enxertos ou substitutos de pele. Por este motivo, muitos substitutos de pele tem sido desenvolvidos ao longo do tempo, porém ainda não são considerados ideais (FU *et al.*, 2012).

A utilização de MCB para o tratamento de queimaduras e tratamento de feridas crônicas se mostra promissor por essas matrizes possuírem a capacidade de absorver exudato das feridas enquanto às recobrem, além de serem facilmente removidas da superfície das mesmas, não causando lesões secundárias provenientes de sua utilização, como pode ocorrer com outros curativos como gaze (FU *et al.* 2013). As MCBs ainda são facilmente moldáveis e de baixo custo de produção, assim podem ser produzidas para a cobertura de grandes áreas corporais ou para locais delicados como rosto e articulações, onde mantém um ambiente úmido, possuem boa adesão e reduzem a dor (Czaja *et al.*, 2006 e 2007). Visando a utilização destas MCB para melhorar e acelerar a regeneração de lesões de pele de espessura total e parcial, o presente trabalho sugere a união das MCBs com dCTMs.

As CTMs de maneira geral são atrativas para estudos envolvendo regeneração de tecidos, uma vez que possuem potencial de diferenciação que pode ser utilizado para regenerar o tecido lesado; promovem reparação de tecidos pela secreção de fatores que promovem regeneração; estimulam a proliferação e diferenciação de progenitores celulares endógenos e diminuem respostas inflamatórias e respostas imunes (SCHNEIDER *et al.*, 2010).

As CTMs utilizadas neste trabalho consistem em dCTMs, esta escolha se deu, pois: a obtenção destas células pode ser realizada de pequenos fragmentos de pele, podendo ser facilmente expandidas *in vitro*; células retiradas do próprio tecido que se quer regenerar parecem ser mais adequadas para estudos de regeneração e um protocolo de isolamento e a caracterização destas células foi previamente realizado no LACERT. Para avaliar a possibilidade de utilização das dCTMs juntamente com as MCBs, foram realizados testes de viabilidade, integração e adesão destas células as matrizes, assim como uma análise do perfil imunofenotípico das mesmas, observando se as MCBs induziram mudanças neste perfil ou não.

12.1 AS MCBs SÃO BIOCOMPATÍVEIS COM dCTMs

A adesão das dCTMs foi analisada por microscopia de luz e MEV. As células se mostraram capazes de aderir a MCB, em tempos diferentes. Esse resultado vai de encontro ao artigo de Torres e colaboradores (2012), que relata que células não se aderem a superfícies de CB sem que estas superfícies sejam modificadas previamente, utilizando moléculas aderentes, por exemplo. A adesão de outros tipos celulares sobre MCBs tem sido relatada em diversos estudos como: fibroblastos e condrócitos (ZONG-LIANG *et al.*, 2009); CTs derivadas do tecido adiposo (FU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012); CTs pluripotentes induzidas (iPS) (OLIVEIRA *et al.*, 2012); CTMs equinas derivadas de medula óssea (FAVI *et al.*, 2013); CTMs caninas derivadas de medula óssea (MENDES *et al.*, 2009); CTMs derivadas da placenta humana (HECK, 2012); entre outras. Porém não foram encontrados relatos de trabalhos utilizando dCTMs sobre estas matrizes.

Após 24 horas de plaqueamento, foi possível observar extensões citoplasmáticas e conexões das dCTMs com as fibras das matrizes, além de uma morfologia bastante alongada, porém muitas células ainda não haviam se aderido. Uma melhor adesão foi observada após 3 dias de plaqueamento. Esse padrão de adesão foi observado por Jeremias (2013), em uma das MRDs avaliadas em seu trabalho, segundo a autora, as dCTMs associadas à MRD Pelnac[®] mostraram pouca aderência nas primeiras 24 horas.

Provavelmente essa demora inicial de adesão das dCTMs sobre as MCBs em comparação a superfície do plástico ocorra por diferenças na rigidez dos dois substratos, além de placas de cultura também serem tratadas para aumentar a adesão celular. Em trabalhos anteriores, utilizando fibroblastos, Lo e colaboradores (2000), demonstraram que em substratos mais rígidos, células geram uma maior força de tração e apresentam uma morfologia mais ampla e plana do que em substratos menos rígidos, mesmo que os dois substratos sejam igualmente adesivos.

O plaqueamento das dCTMs em gota resultou em aglomerados celulares, não possibilitando a visualização de muitas células individualmente, porém o plaqueamento em suspensão torna difícil a visualização destas células no microscópio de luz, devido ao seu espalhamento. O MEV nos permitiu observar que as dCTMs se aderem e se expandem progressivamente ao longo dos dias de cultura, tendo em 7 dias uma característica bastante semelhante aquela encontrada em culturas bidimensionais como o plástico.

A viabilidade das CTMs sobre s MCBs é de extrema importância para a continuidade de sua utilização como um material promissor em campos como a engenharia de tecidos, possibilitando futuros estudos *in vivo*. Os resultados de viabilidade deste trabalho indicaram que as dCTMs se mantiveram viáveis nas MCB após 7 dias de cultivo, os valores de viabilidade apresentaram tendência crescente, porém esta não foi estatisticamente significativa. Já foi demonstrado que outros tipos de CTMs como as CTMs da placenta humana proliferam quando em contato com as MCBs (HECK, 2012), a pequena elevação nos valores da viabilidade celular, observados no gráfico 8 e as imagens ao passar dos dias (Figura 8 A e B) indicam que as dCTMs também proliferam sobre estas MCBs.

O maior tempo necessário para as dCTMs aderirem as MCBs deve ter reflexos sobre a viabilidade das células plaqueadas. O mesmo número de dCTMs foi plaqueado nos poços de plástico e nas MCBs, porém ao analisarmos as imagens no microscópio de luz, esta quantidade parece ser menor nas MCBs. Esse número reduzido pode se dar pelo fato de nem todas as células conseguirem aderir nas MCBs rapidamente, o que pode causar morte celular em um primeiro momento. Outro motivo para a menor quantidade observada nas MCBs pode ocorrer pelo fato de algumas células deslizarem das matrizes, se aderindo ao plástico abaixo ou em volta da mesma.

Desse modo, para encontrarmos diferenças significativas nos testes de viabilidade, seria interessante o cultivo das dCTMs sobre as matrizes por um maior tempo, como tem sido realizado por Favi et al. (2013) e Oliveira et al. (2012), os quais cultivaram, respectivamente CTs de origem da medula óssea por 14 dias e do tecido adiposo por 21 dias sobre MCBs e encontraram um aumento da viabilidade e proliferação celular, estatisticamente significantes. Utilizando esses maiores tempos de cultivo é possível que o efeito inicial de morte celular se dilua ao longo do tempo e que os valores de viabilidade sejam mais representativos.

É possível que após atingir confluência sobre as MCBs, as células tendam a apresentar um comportamento diferenciado, como foi observado por Yeung e colaboradores (2005), células como fibroblastos, param de depender da rigidez da matriz na qual estão apoiados, após atingir certa confluência. Isso ocorre, pois, o contato entre as próprias células produz sinalizações que levam ao espalhamento e proliferação celular (YEUNG *et al.*, 2005).

Ainda que a adesão celular tenha sido satisfatória, as dCTMs interagiram apenas com as fibras mais superficiais das MCBs. Apesar de as células ficarem em focos ligeiramente diferentes quando observadas na

microscopia de luz e na microscopia de fluorescência, isso deve ocorrer, pois as MCBs não são totalmente homogêneas em sua superfície. O fato de as dCTMs não migrarem para o interior das matizes ocorre devido à dimensão dos poros deste hidrogel em comparação com o tamanho das células. É suposto que as células, durante seu crescimento e migração, possam deslocar as fibras de alguns polímeros, crescendo entre elas, porém isto não ocorreu com a celulose, provavelmente devido a sua microestrutura (HECK, 2012).

De maneira geral, os resultados *in vitro* suportam a viabilidade, proliferação e adesão das dCTMs associadas às MCB, demonstrando uma boa biocompatibilidade deste biomaterial.

Testes *in vivo* tem demonstrado a biocompatibilidade das MCB, isso pode ocorrer pela similaridade destas matrizes com componentes da matriz extracelular como o colágeno. Fibras de colágeno possuem diâmetro similar a fibras de celulose e são montados extracelularmente em cadeias de polímeros (TORRES, 2012). A biocompatibilidade desses polímeros *in vivo* ainda foi observada quando compostos de CB foram implantados para substituir artérias em porcos e de maneira subcutânea em ratos, em ambos os casos não houve sinais macroscópicos de inflamação em torno dos implantes (FU *et al.*, 2013).

Os resultados do presente trabalho corroboram com estudos citados a cima que utilizaram diferentes tipos celulares plaqueados sobre MCBs, e tem importância na validação de MCB como um biomaterial para o cultivo de dCTMs.

12.2 AS dCTMs ASSOCIADAS ÀS MCBs MANTÉM SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

A composição e as características mecânicas do ambiente extracelular tem grande impacto em cascatas de sinalização intracelular, as quais influenciam comportamentos celulares, como migração, sobrevivência e destino fenotípico (JEREMIAS, 2013). Por esse motivo, deve-se considerar se as MCBs influenciam as dCTMs a seguirem algum caminho de diferenciação ou participam da manutenção destas células como CTMs.

Os resultados obtidos com a imunofenotipagem das dCTMs por citometria de fluxo mostram que as dCTMs, após 4 dias de cultivo sobre as MCBs expressam marcadores típicos de dCTMs. Os valores de expressão são semelhantes aos valores encontrados na literatura referentes à marcação de dCTMs (JEREMIAS, 2013).

Uma vez que esses marcadores não são exclusivos de CTMs, seria interessante ainda estudar marcadores de pluripotencialidade para analisar se as dCTMs mantêm sua expressão após o cultivo sobre as MRDs, ou se estas estão levando as células para caminhos mais diferenciados. Também seria possível realizar experimentos de diferenciação das dCTMs sobre as matizes, para analisar essa potencialidade, como mostrado por Favi *et al.* (2013).

12.3 UTILIZAÇÃO DAS MCBs COMO ARCABOUÇOS OU CURATIVOS CUTÂNEOS

As MCBs são citadas em diversos artigos como um potencial arcabouço para ser utilizado em engenharia de tecidos, essa área de conhecimento busca melhorar, manter e restaurar a função de tecidos e órgãos lesados (HELENIUS *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2009; BODIN *et al.*, 2010). Algumas das características que mais chamam atenção neste biomaterial são: biocompatibilidade, resistência mecânica e pureza. Porém, algumas características consideradas essenciais para um arcabouço, como: controle do tamanho dos poros e reabsorção pelo organismo, não estão presentes neste biomaterial, por este motivo tratamos a CB como um biomaterial para auxiliar a regeneração cutânea e não como um arcabouço para engenharia de tecidos.

Atualmente, por diversos processos de produção diferenciados, é possível criar celulosas com poros de variados tamanhos e em diferentes densidades, por meio da utilização de porogênicos durante a síntese das MCBs (RAMBO *et al.*, 2008; ZABOROWSKA *et al.*, 2010), ou até mesmo com a modificação dos meios de cultivo (GRANDE *et al.*, 2009), além de aderir moléculas á sua superfície que facilitam a adesão e proliferação celular. Certamente a produção de poros auxiliaria na colonização das MCB por dCTMs, porém a estabilidade física e a baixa degradação deste material no corpo humano podem representar grandes desafios para esse biomaterial ser utilizado como um arcabouço em engenharia de tecidos (TORRES *et al.*, 2012).

Recentemente CTMs tem sido utilizadas em trabalhos de regeneração com o intuito de modular eventos que ocorrem durante o reparo de lesões cutâneas, como recrutamento, proliferação, diferenciação e morte celular. Porém métodos de aplicação destas células, como injeção na caudas de camundongos, ou aplicação direta sobre o local da lesão, apresentam uma baixa eficiência, já que apenas cerca de 4% das células ficam realmente no local da lesão. De modo a melhorar o transporte e

manutenção de CTMs em lesões de pele, é necessário que haja, além de uma fonte de células, uma matriz artificial, na qual as células possam continuar vivas e ser entregues nos locais das lesões (YEUM *et al.*, 2012).

Considerando as propriedades da celulose como um biomaterial, sua utilização em reparo de lesões de pele, e suas baixas taxas de degradação *in vivo*, sugere-se que as MCBs sejam utilizadas como veículos para o transporte de dCTMs para os locais de lesões cutâneas. Desse modo o reparo de tecidos que já é auxiliado pelo uso da CB poderia ser amplificado ou acelerado com a utilização das dCTMs.

Quanto à implantação das MCB em camundongos, uma metodologia de inserção e manutenção destas no local das lesões não é clara na literatura. Apesar de em 2012 Fu e colaboradores, compararem polímeros de CB com outros 5 curativos para queimaduras, e demonstrarem que a CB é eficiente pra o tratamento dessas feridas, não fica claro quantos dias estes curativos permaneceram nas lesões e nem como estas membranas foram fixadas. Nos testes de implantação do presente trabalho os curativos contendo estas MCBs, mesmo com 4 pontos cirúrgicos, permaneceram em média por 7 dias, sendo assim supõe-se que em estudos mais longos os curativos devam se desprender e o que é apresentado como resultado final seja apenas o efeito inicial dos curativos.

Tendo em vista que alguns trabalhos demonstram a participação das CTMs apenas no período inicial do reparo cutâneo, curativos com uma fixação de aproximadamente 10 dias seriam o ideal nestes casos (YEUM *et al.*, 2011). Uma alternativa a necessidade de fixar os curativos por longos períodos seria trocá-los a cada 2 dias como realizado por Lin e colaboradores (2013), porém, ao considerarmos a aplicação de aproximadamente 1×10^6 dCTMs juntamente com as MCBs, como sugerem Yeum e colaboradores (2011), o número de dCTMs para realizar trocas constantes de curativos seria bastante elevado e de difícil obtenção (em torno de 60×10^6 de dCTMs para 3 grupos de 5 animais, eutanasiados nos dias 3, 7 e 14 após a cirurgia).

Não se considerou necessária a utilização de mais de um animal nas duas primeiras condições de teste de implantação das MCBs, pois nas duas desvantagens de aplicação ficaram bastante evidentes. O primeiro método não foi considerado eficiente pelo fato de as MCBs perderem sua elevada umidade, a qual é considerada uma dos principais benefícios de usar este material para o reparo da pele; e no segundo pelo fato de que a celulose dentro da ferida não seria totalmente colonizada por células dos camundongos e provavelmente não seria reabsorvida, reforçando a necessidade de usar este biomaterial como um curativo e não como um

arcabouço. Devido aos melhores resultados apresentados pelo terceiro método, este já está sendo testado em experimentos iniciais no LACERT, juntamente com dCTMs.

Os resultados verificados no presente trabalho demonstram a biocompatibilidade, a capacidade de manutenção das características imunofenotípicas das dCTMs e a possibilidade de utilização das MCBs como veículos para a inoculação de dCTMs nos locais das lesões. Estes achados indicam um potencial de aplicação destas células em conjunto com as MCBs *in vivo*. Dessa forma, este estudo fornece resultados importantes para uma nova estratégia terapêutica no reparo de lesões cutâneas, consistindo na combinação de dCTMs com um polímero natural, e de baixo custo de produção.

13 CONCLUSÃO

- As dCTMs se mantiveram viáveis sobre as MCBs após sete dias de cultivo.
- As dCTMs apresentaram capacidade de aderência nas MCBs mesmo não se aderindo totalmente nas primeiras 24 horas.
- Testes de viabilidade após períodos mais longos de cultivo devem ser realizados, para se excluir o efeito inicial da demora da adesão celular, e para um melhor entendimento do comportamento das dCTMs sobre as MCBs.
- As MCBs não permitiram migração das dCTMs para o interior do hidrogel.
- A morfologia fibroblastóide típica de culturas bidimensionais pode ser observada após 7 dias de cultivo das dCTMs sobre as MCBs
- As dCTMs cultivadas nas MCBs mantem as características imunofenotípicas de CTMs, semelhante ao observado no cultivo bidimensional em monocamada.
- Para a implantação das MCBs nos camundongos é necessário que as mesmas sejam recobertas para não perderem sua umidade característica. É possível das pontos nas matrizes, porém métodos que exigem menor manipulação das mesmas mostraram melhores resultados.
- As MCBs apresentam potencial como veículo para inoculação das dCTMs sobre lesões cutâneas, ao mesmo tempo em que são um curativo efetivo para as mesmas.

REFERÊNCIAS

- ALISON, M. R.; ISLAM, S. Attributes of adult stem cells. **The Journal of pathology**, v. 217, n. 2, p. 144–160, 2009.
- ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100 Suppl, p.11830-5, 30 set 2003.
- ANAMI, E; *et al.* Campanha de prevenção: sonhando e movimentando ideias. In: Congresso Brasileiro de Queimaduras, VII, 2010, Porto de Galinhas. Anais. **Rev Bras de queimaduras**, v. 9, v. 4, p 155-215, 2010.
- ANLATICI, R. et al. A retrospective analysis of 1083 Turkish patients with serious burns. **Burns**, v. 28, n. 3, p. 231–237, maio 2002.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 8, n. 3, p. 301–316, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Álcool Líquido vai desaparecer dos supermercados em seis meses. **Informesaúde**. 2002. ano VI, n. 152. Disponível em <<http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/periodicos/informesaude/informe152.pdf>> Acessado em: 05 jan. 2013.
- BODIN, A. et al. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8889–901, dez. 2010.
- CASTRO, B.L. **Avaliação do uso de plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme associadas à matriz de regeneração dérmica**. 2013. 81f. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e do Desenvolvimento). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CHIAOPRAKOBKIJ, N. et al. Characterization and biocompatibility of bacterial cellulose/alginate composite sponges with human keratinocytes and gingival fibroblasts. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 3, p. 548–553, jun. 2011.

CZAJA, W. et al. Biomedical Applications of Microbial Cellulose in Burn Wound Recovery. In: BROWN, R. M.; SAXENA, I. M. (Eds.). **Cellulose: Molecular and Structural Biology Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007.

CZAJA, W. *et al.* Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-51, jan 2006.

CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, jan. 2007.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells** (Dayton, Ohio), v. 26, n. 9, p. 2287–2299, set. 2008.

DASSIE, L. T. D.; ALVES, E. O. M. N. Centro de tratamento de queimados: perfil epidemiológico de crianças internadas em um hospital escola. **Revista Brasileira de Queimaduras.**, v. 10, n. 1, p. 12–16, 2010.

DE MELO, R.O. **Análise de pacientes vítimas de queimaduras tratados em nível ambulatorial no Hospital Infantil Joana de Gusmão em 2004**. 2006. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DE OLIVEIRA, C. R. *et al.* Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. 11, 2012.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, jan 2006

ELISSEEFF, J. *et al.* Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. **Orthodontics & Craniofacial Research**, 8: 150–161, Abr 2005. doi: 10.1111/j.1601-6343.2005.00335.

ESPINDULA, A.P.; ROCHA, L.S.M.; ALVES, M.O. Perfil de pacientes queimados do Hospital de Clínicas: uma proposta de intervenção com escolares. **Rev BrasQueimaduras**, v. 12, n. 1, 2013.

FAVI, P. M. et al. Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. **Materials science & engineering C. Materials for biological applications**, v. 33, n. 4, p. 1935–44, 1 maio 2013.

FU, L. et al. Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials. In: FAZEL, R. (Ed.). **Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges, Pro.** [s.l.] InTech. p. 249–274. 2012.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–42, 15 fev. 2013.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; BAÑÓ, M. C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.

HECK, D. **Avaliação da associação células tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana.** 2012. 74f. Dissertação de Mestrado (Biologia Celular e do Desenvolvimento). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–8, fev. 2006.

HUTCHENS, S. A.; BENSON, R. S.; EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; RAWN, C. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel Biomaterials. v. 27, p. 4661-4670, 2006.

JUNIOR, J.M.R. **Análise epidemiológica de crianças queimadas internadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão – Florianópolis – SC.** 2004. 54F. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em Medicina). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JEREMIAS, T.S. **Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas.** 2013.122 f. Tese de Doutorado (Biologia Celular e do Desenvolvimento). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia básica**. 10ª edição, editora Guanabara Koogan, 2004.

KANG, B. S.; NA, Y. C.; JIN, Y. W. Comparison of the wound healing effect of cellulose and gelatin: an in vivo study. **Archives of plastic surgery**, v. 39, n. 4, p. 317–21, jul. 2012.

LACERDA, L. DO A. et al. Estudo epidemiológico da Unidade de Tratamento de Queimaduras da Universidade Federal de São Paulo. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 82–88, 2010.

LIN, S. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 2013.

LIN, W.-C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–11, 15 abr. 2013.

LO, C. et al. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 1, p. 144–152, 2000.

MAES, N. B. *et al.* Uso de matriz de regeneração dérmica em pacientes vítimas de queimaduras em hospital infantil de referência de Santa Catarina: nove anos de experiência. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 1, p. 6–14, 2012.

MARIANI U. Queimaduras. In: Marcondes E, (ed). *Pediatria Básica*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier; 1991. p.866-70.

MARTINS, C. DE G.; ANDRADE, S. DE. Queimaduras em crianças e adolescentes: análise da morbidade hospitalar e mortalidade. **Acta Paul Enferm**, v. 20, n. 4, p. 464–469, 2007.

MENDES, P. N. *et al.* In vivo and in vitro evaluation of an *Acetobacter xylinum* synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair, **Acta Veterinaria Scandinavica**, V.51, N. 12, 2009.

MEZA-ORTIZ, F.; ROJAS-SOLIS, M. B.; NORIEGA-ZAPATA, P. A. Quemaduras eléctricas en niños. Reporte de tres casos relacionados con papalotes. Revisión de la literatura. **Gac Méd Méx**, v. 136, n. 4, p. 373–378, 2000.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068–1074, 29 jun. 2006.

MUKERJI, G. *et al.* Epidemiology of paediatric burns in Indore, India. **Burns**, v. 27, n. 1, p. 33–8, fev. 2001.

ODELI, J.T., NOGUEIRA, D.S., RAMOS, T.C.O., *et al.* Análise do diagnóstico inicial e na alta hospitalar de crianças queimadas internadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão. **Rev Bras Queimaduras**.v.11, n. 2, p. 67-73, 2012.

OLYVEIRA, G. M. *et al.* Human Dental Pulp Stem Cell Behavior Using Natural Nanolith/Bacterial Cellulose Scaffolds for Regenerative Medicine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1370–1377, 2013.

PANJESHAHIN, M. R. *et al.* Epidemiology and mortality of burns in the South West of Iran. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 27, n. 3, p. 219–26, maio 2001.

PECK, M. D. Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 37, n. 7, p. 1087–100, nov. 2011.

PELE artificial podde chegar ao SUS em 2003. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 26 set. 2002, Caderno Cidades. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/arquivo/economia/2002/not20020926p38289.htm>>. Acessado em: 22 dez. 2013.

PEREIRA, M. J. L. . Particularidades de Queimaduras em Crianças. In: JÚNIOR, E.M.L. *et al.* (Org.). **Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2008, v. 1, p. 509-515.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–86, 2011.

PIRES, R.A.J. **Análise de 781 Crianças com Queimaduras Internadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão**. 2003. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PORTAL, O.; CLARK, W. A.; LEVINSON, D. J. Microbial cellulose wound dressing in the treatment of nonhealing lower extremity ulcers. **Wounds – A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 21, n. 1, p.1–3, 2009.

RAMBO, C. R. et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 549–554, 2008.

RAMOS, R. **Análise histológica da integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo: estudo experimental em ratos**. 2004. 56f. Dissertação de Mestrado (Ciências Médicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECOUVREUX, D. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**. 2008. 124f. Tese de Doutorado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSENBAUM, A. J.; GRANDE, D. A.; DINES, J. S. The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. **Organogenesis**, v. 4, n. 1, p. 23–7, jan. 2008.

ROSSI, L. A. et al. Queimaduras : características dos casos tratados em um hospital escola em Ribeirão Preto (SP), Brasil. **Rev Panam Salud Publica**, v. 4, n. 6, p. 401–404, 1998.

SANDERS, R. C. *et al.* Stem cell research. **Paediatric respiratory reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–40, jun. 2006.

SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1075–1079, 29 jun. 2006.

SCHIPANI, E.; KRONENBERG, H. M. Adult mesenchymal stem cells. In: CHIEN, K. R. (Ed.). **StemBook**. Boston: The Stem Cell Research Community, 2009. p. 1–12.

SCHNEIDER, R. K. et al. The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 31, p. 7948–7959, 2010.

SCHURR, M. J. *et al.* Phase I/II Clinical evaluation of stratagraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. **J. Trauma**, v.66, n.3, p.866-874, 2009.

Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME). **Índices Estatísticos**. 2009-2013. Disponível em: <<http://www.saude.sc.gov.br/hijg/indicesestatisticos.htm>>. Acessado em: 22 Dez. 2013.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 7, n. 43, p. 229-58, 6 fev 2010.

Sociedade Brasileira de Queimaduras (SBQ). Queimaduras, conceitos e causas. Disponível em: <<http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-conceito-e-causas/>>. Acessado em: 22 Dez. 2013.

TAVARES, C.S., HORA, E.C. Caracterização das vítimas de queimaduras em seguimento ambulatorial. **Rev Bras Queimaduras**, v.10, n. 4, p 119-123, 2011.

TOMITA, L.A. **Uso da Matriz de Regeneração Dérmica no Tratamento Cirúrgico de Queimaduras em Crianças**. 2005. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TORRES, F.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 864–878, 5 dez. 2012.

VISHNUBALAJI, R. *et al.* Skin-derived multipotent stromal cells--an archival for mesenchymal stem cells. **Cell and tissue research**, v. 350, n. 1, p. 1–12, out. 2012.

WERNECK, F. **Proibição da venda de álcool líquido estimula campanha contra acidentes**. Mar. 20013. Disponível em <<http://www.estadao.com.br/noticias/vidae,proibicao-da-venda-de-alcool-liquido-estimula-campanha-contra-acidentes,1005224,0.htm>>. Acesso em: 05 Jan. 2014.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **AJIC**, p.98-111, 2006.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International journal of biomaterials**, v. 2012, p. 1–8, jan. 2012.

YEUM, C. E. et al. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 7, n. 4, p. 279–91, abr. 2013.

YEUNG, T. et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 60, n. 1, p. 24–34, jan. 2005.

YODA, C. N.; LEONARDI, D. F.; FEIJÓ, R. Queimadura pediátrica: fatores associados a sequelas físicas em crianças queimadas atendidas no Hospital Infantil Joana de Gusmão. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 2, p. 112–117, 2013.

ZABOROWSKA, M. et al. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2540–7, jul. 2010.

ZHANG, N.; KOHN, D. H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. *Birth defects research. Part C*, v. 96, n. 1, p. 63-81, 2012.

ZONG-LIANG, W. et al. **Research on Characterization and Biocompatibility of Bacterial Cellulose Tissue Engineering Scaffold**. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference on*. **Anais...IEEE**, 2009. Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5163329>. Acesso em: 13 dez. 2013.

ANEXOS

ANEXO A – PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS DOS PRONTUÁRIOS

- A coleta dos dados deverá ser realizada no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG);
- Não anotar os nomes ou dados que possibilitem a identificação do paciente;
- Identificar os pacientes com numeração crescente, começando em 001 para os dados primeiro paciente;
- Os dados a serem coletados dos prontuários são:

Paciente nº:

Idade:

Sexo:

Cidade de Origem:

Profissão dos pais:

Agente causador:

Espessura da Lesão:

Extensão (porcentagem da superfície corporal queimada):

Local da lesão:

Ambiente de ocorrência:

Data de entrada e saída:

Necessidade ou não de enxerto:

- Os dados devem ser escritos no formato de uma tabela como exemplificada a seguir:

Paciente	Idade	Sexo	Cidade de Origem, etc
001	08	M	São Joaquim
002	05	F	Florianópolis
003	12	F	Palhoça

- Fazer observações na tabela quando não encontrar os dados solicitados ou quando a escrita não for compreensível.

ANEXO B – FOLDERS CONFECCIONADOS PARA DISTRIBUIÇÃO (EXTERNO)

Números

No Brasil, as queimaduras contribuem com **57%** do total de mortalidade na faixa de 0 a 19 anos. Sabe-se que cerca de **1.000.000** de casos de queimaduras ocorrem ao ano, **100.000** pacientes procurarão atendimento hospitalar e **2500** irão falecer direta ou indiretamente de suas lesões. Destes acidentes dois terços acontecem com crianças e adolescentes.

Telefones úteis:

Corpo de Bombeiros:
193

SAMU:
192

Hosp. Infantil Joana de Gusmão:
(048) 3251-9000

Hosp. Celso Ramos
(048)48 3251-7000



Projeto de Extensão: "Queimaduras: orientação e divulgação de medidas preventivas simples e eficazes."

Confeccionado por:

Rafaela Grecco Machado (rafigrecco@gmail.com)

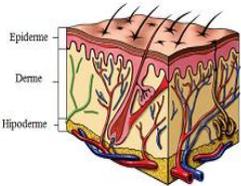
Matheus Reck (matheus-reck@hotmail.com)

Brincando Sem fogo

O que são Queimaduras?

Queimaduras são lesões nos tecidos que podem ser produzidas por diversos fatores como exposição a chamas, líquidos aquecidos, corrosivos químicos e radiação ou por contato com objetos quentes e corrente elétrica, e sua gravidade está relacionada à profundidade e à extensão da superfície corporal queimada.

FOLDERS CONFECCIONADOS PARA DISTRIBUIÇÃO (INTERNO)

Profundidade ou Grau da queimadura	Primeiros-socorros	Prevenção
<p>• Queimaduras de 1º grau: só atingem a camada mais externa da pele chamada de epiderme, causando vermelhidão e ardência.</p> <p>• Queimaduras de 2º grau: atingem toda a epiderme e parte da derme. Apresentam bolhas e desprendimento de camadas de pele.</p> <p>• Queimaduras de 3º grau: há uma destruição de todas as camadas da pele. Pode ser muito grave e até fatal.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Lave a área com água fria e limpa, não use gelo. • Cubra a queimadura com uma faixa esterilizada ou pano limpo. • Remova anéis, cintos, sapatos e roupas antes do corpo ficar inchado. • Caso a roupa grude na pele, não remova. • Monitore os sinais vitais. • Procure um médico assim que possível. <p>Nunca use em queimaduras creme dental, pó de café, clara de ovo, manteiga, óleo de cozinha, cocó de galinha, folhas de trigo. Isso tudo pode causar infecções e piorar a situação. Procure um médico!</p>	<p>A maior parte das queimaduras ocorre em casa, muitas vezes junto à família. Desse modo, cuidados básicos são necessários para reduzir a incidência de queimaduras, por exemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evite toalhas compridas na mesa, Crianças podem puxar, causando acidentes • Ao cozinhar, deixe as panelas com o cabo voltado para dentro do fogão. • Não fume nem segure líquidos quentes quando estiver com um bebê no colo. 
<p>Queimaduras Térmicas</p> <p>Provocadas por fontes de calor. Ex: fogo, líquidos ferventes, vapores, excesso de exposição ao sol.</p>  <p>http://www.proqueimados.com.br/</p>	<p>Queimaduras Elétricas</p> <p>Geradas por descargas elétricas. Ex: através de tomadas elétricas, fios de postes de luz ou transformadores de rua.</p>  <p>http://www.proqueimados.com.br/</p>	<p>Queimaduras Químicas</p> <p>Provocadas por substâncias químicas em contato direto com seu corpo. Ex: soda cáustica, ácido sulfúrico</p>

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: "Queimaduras: estudo epidemiológico e avaliação da associação de células tronco mesenquimais à matrizes de celulose bacteriana para o reparo cutâneo".

Pesquisador Responsável: Prof^o Dr^a Andréa Gonçalves Trentin. RG:4518154-3

Pesquisador participante: Rafaela Grecco Machado

Telefones para contato: (48) 37216905/ (48) 96728334

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário(a), do trabalho de pesquisa "Queimaduras: estudo epidemiológico e avaliação da associação de células tronco mesenquimais à matrizes de celulose bacteriana para o reparo cutâneo", de responsabilidade da pesquisadora Prof^o Dr^a Andréa Gonçalves Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr(a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele. Atualmente as células tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados fragmentos de pele retirados durante as cirurgias plásticas, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células tronco da pele para compreendermos melhor o comportamento destas células. Estudos como estes são necessários, uma vez que nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias, como por exemplo, no tratamento de pacientes com lesões de pele graves. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o(a) Sr(a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, entre em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o(a) Sr(a) assinie esse documento (verso).

Assinatura do pesquisador : _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____,
fui esclarecido (a) sobre a pesquisa "Queimaduras: estudo epidemiológico e avaliação da associação de células tronco mesenquimais à matrizes de celulose bacteriana para o reparo cutâneo" e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Florianópolis, ____ de _____ de 20 .

ANEXO D – APROVAÇÃO DA CEUA PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES EM ANIMAIS

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00810

Título

Protocolos experimentais utilizados pelo LACERT/UFSC que envolvem animais da espécie *Mus musculus*

Data de Entrada

21/06/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

29/11/2012

Considerações

Ofício nº 113/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil seiscientos e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência Biotério Setorial LACERT (BEG/CCB)

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 28/02/2017

Data 29/11/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE