Artigo Original

Autores:
Paula Tavares Colpas[1]
Paulo Cesar Martins Alves[1]
Carolina Caliári Oliveira[1]
Ana Luiza Resende Pires[2]
Angela Maria Moraes[2]
Maria Beatriz Puzzi[1]

[1] Laboratório de cultura de células da pele (Ciped), Disciplina de dermatologia, Departamento de medicina interna, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas - Campinas (SP), Brasil.

[2] Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - Campinas (SP), Brasil.

Correspondência:
Paula Tavares Colpas
Rua Dr João Lopes Vieira, 108.
Torre 1 Apt 132 - Vila Bela
Dom Pedro
13087 734 - Campinas - SP, Brasil
E-mail: paulacolpas@gmail.com

Data de recebimento: 08/01/2018
Data de aprovação: 28/02/2018

Trabalho realizado na Universidade Estadual de Campinas , Campinas - SP, Brasil.

Suporte financeiro: Fapesp, CNPq e Capes.
Conflito de interesse: Nenhum.

CC BY

Terapia celular combinada com membranas de biopolímeros melhora a cicatrização de úlceras em paciente com dermatomiosite juvenil

Combining cell therapy with biopolymer films improves wound healing in a juvenile dermatomyositis patient

DOI: http://www.dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.20181011129

RESUMO

Introdução: Dermatomiosite juvenil (DMJ) é doença sistêmica que afeta a musculatura proximal e a pele de crianças. A doença ulcerada é um desafio terapêutico.
Objetivo: Avaliar a melhora da doença ulcerada na DMJ, pelo uso de terapia celular.
Métodos: Realização de cocultura de fibroblastos e queratinócitos autólogos e aplicação dessas células nas úlceras juntamente com cola de fibrina e colocação de membrana de quitosana-alginato ou quitosana-xantana sobre as lesões.
Resultados: Menos de 12 horas após a terapia, o paciente referiu completa eliminação da dor e, dentro de dois dias, estava presente tecido de cicatrização. Algumas das úlceras estavam quase completamente cicatrizadas no final da primeira semana, e algumas das calcinoses desapareceram. Essa técnica não cura a doença, mas melhora a qualidade de vida, sendo possível criopreservar as células saudáveis do paciente para tratar novas lesões. Sendo as células de origem autóloga, elimina-se o risco de rejeição. Além disso, esse procedimento não necessita de debridamento das lesões nem hospitalização.
Conclusões: A aplicação de culturas autólogas de fibroblastos e queratinócitos em úlceras já é considerada tratamento efetivo em pacientes com queimaduras e outras feridas cutâneas e, agora mostrou-se também eficaz no tratamento de feridas na DMJ.
Palavras-chave: Calcinose; Cicatrização; Dermatomiosite; Fibroblastos; Polissacarídeos; Queratinócitos; Terapia baseada em transplante de células e tecidos

ABSTRACT

Introduction: *Juvenile dermatomyositis (JDM) is a systemic disease that affects children's proximal musculature and skin. The ulcerated stage of the disease is a therapeutic challenge.*
Objective: *To evaluate the improvement of ulcerated stage of JDM caused by the use of cell therapy.*
Methods: *Co-culture of autologous fibroblasts and keratinocytes, application of these cells in ulcers in conjunction with fibrin glue, and placement of chitosan-alginate or chitosan-xanthan membrane on the lesions.*
Results: *Less than 12 hours after therapy, the patient reported complete cessation of pain and, within 2 days, healing tissue emerged. Some of the ulcers were almost completely healed by the end of the 1st week, and some of the calcinoses disappeared. This technique does not cure the disease, however it improves the patient's quality of life, and it is possible to cryopreserve healthy cells to treat new lesions. Given the fact that the cells are of autologous origin, the risk of rejection is eliminated. Furthermore, this procedure does not require debridement of the lesions or hospitalization.*
Conclusions: *The application of autologous cultures of fibroblasts and keratinocytes in ulcers is already considered an effective treatment in patients with burns and other skin wounds, and has now also been proven effective in the treatment of wounds in JDM.*
Keywords: *Calcinosis; Cell-and tissue-based therapy; Dermatomyositis; Fibroblasts; Keratinocytes; Polysaccharides; Wound healing*

INTRODUÇÃO

A dermatomiosite juvenil (DMJ) é doença sistêmica rara e grave que afeta principalmente a musculatura proximal e a pele de crianças, com prevalência de três por um milhão na população. Sua etiologia não é completamente entendida, mas é sugerido que é causada por reação autoimune em indivíduos geneticamente suscetíveis a gatilhos ambientais.[1,2] As manifestações cutâneas da DMJ podem ser graves e difíceis de tratar, com grande morbidade a longo prazo.[2,3]

A calcinose, caracterizada primariamente pela formação de depósitos de cálcio na pele, geralmente afeta de 10 a 70% dos pacientes pediátricos com DMJ, sendo, normalmente, diagnosticada nos primeiros três anos da doença. Juntamente com a própria dermatomiosite, a calcinose pode impactar negativamente a qualidade de vida do paciente, resultando em fraqueza, incapacidade funcional, atrofia muscular, úlceras cutâneas e, consequentemente, dor local e infecções secundárias.[4] As calcificações distróficas ocorrem nos locais dos tecidos lesados, onde os níveis séricos de cálcio e fósforo estão normais. Embora possam surgir em qualquer local do corpo, normalmente as áreas mais afetadas são cotovelos, joelhos, tronco, mãos, pés, glúteos e cabeça. A calcinose geralmente é indolor, porém pode estar associada com sensibilidade à palpação e dor à compressão, podendo mostrar paniculite e ulcerações no exame anatomopatológico. Na superfície da pele, ocorre deposição do cálcio, podendo torná-la sítio para infecção.[5]

Na dermatomiosite juvenil, a gravidade da doença pode estar relacionada a calcinose cutânea, demora no início do tratamento e, potencialmente, a polimorfismos genéticos do TNF-a-308. Apesar da falta de informações sobre a patogênese da calcinose no DMJ, um possível mecanismo é a liberação de cálcio das mitocôndrias das células musculares afetadas pela miopatia. Macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e a falha nas proteínas reguladoras do cálcio também foram implicadas, assim como a isquemia vascular que também desempenha um papel na calcinose. A deposição de cálcio pode ocorrer no subcutâneo ou nos grupos musculares e depois ulcerar, drenando um material semelhante a giz. A doença ulcerada é grave e pode ser mortal, refletindo importante vasculopatia da pele, com hipóxia tecidual e necrose.[1,3,6]

Como a calcinose na DMJ tende a aumentar com a progressão da doença, intervenção terapêutica precoce e agressiva tem sido sugerida como possível maneira de reduzir as sequelas cutâneas e musculares. Diversas medicações foram utilizadas, como corticosteroides, metotrexate, bifosfonatos, probenicida, warfarina, hidróxido de alumínio, colchicina, diltiazem, infliximab, imunoglobulina, hidroxicloroquina, ciclofosfamida e talidomida, mas sem consenso sobre a melhor terapia.[1-5] O sucesso do uso dessas medicações geralmente está limitado ao controle da doença, sem se estender à sua cura. Além disso, os efeitos colaterais associados ao seu uso prolongado podem também agravar a condição de saúde do paciente.

Como não há um padrão ouro de tratamento nem um algoritmo terapêutico aceito para o manejo da DMJ, e considerando que a reparação da pele danificada se dá pela proliferação e crescimento das células da derme (essencialmente fibroblastos) e/ou das células da epiderme (queratinócitos e melanócitos), a terapia celular pode ser alternativa relevante ao tratamento da DMJ associada à calcinose. Resultados promissores foram reportados com o uso de terapia celular para tratamento de úlceras crônicas de diversas etiologias;[7-17] consequentemente, um resultado positivo também poderia ser esperado para essa doença-alvo.

Biopolímeros, da classe dos polissacarídeos e proteínas, têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de curativos interativos e bioativos, não só sendo úteis como proteção para a ferida, mas também tendo importante papel na promoção da cicatrização. Formação de tecido de granulação e reepitelização, acompanhadas de angiogênese e deposição regular de fibras de colágeno, limitando a formação de cicatrizes e retração tecidual, foram observadas, por exemplo, com o uso da quitosana.[18,19] A associação de diversos polímeros também é relevante, visto que permite o desenvolvimento de curativos com suas propriedades melhoradas, como maior absorção de fluidos. Estudos relevantes *in vivo* foram recentemente descritos com o uso de membranas confeccionadas pela associação de quitosana com xantana[20] e alginato[21] para o tratamento de úlceras cutâneas em ratos Wistar, combinando ou não células mesenquimais, mostrando um potencial que pudesse ser utilizado como curativo nas lesões da DMJ.

O objetivo deste estudo foi demonstrar uma terapia alternativa para o tratamento de úlceras crônicas em paciente com DMJ e calcinose, não responsivas às terapêuticas convencionais, utilizando cultura de células autólogas e subsequentemente cobertas com membranas de polissacarídeos biocompatíveis.

MÉTODOS

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp – CEP: 444.726).

Descrição do caso e coleta do material

Paciente do sexo masculino com 18 anos de idade e diagnóstico de DMJ desde os cinco anos, em tratamento convencional com metotrexate e corticosteroides, portador de calcinose universal e úlceras cutâneas crônicas, algumas com exposição óssea, foi submetido a biópsia de pele de área não ulcerada no braço direito, após assinatura de Consentimento Livre e Esclarecido. Fragmentos de aproximadamente 2cm^2 foram coletados e colocados em solução com soro fisiológico 0,9%, antibiótico e antifúngico (Anti-Anti 15240, lote 577999, GIBCO/Invitrogen) até ser transferidos para frascos de cultura. Durante toda a pesquisa, o paciente manteve o tratamento sistêmico do qual fazia uso.

Cultura celular dos fragmentos cutâneos

Os fragmentos de pele foram colocados em frascos para cultura contendo meio para queratinócitos (KSFM-GIBCO/Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - LGC Biotechnology) e L-glutamina 0,2mg/ml, penicilina 100UI/mL e estreptomicina 0,1mg/ml (GIBCO/Invitrogen), até o processamento. Depois, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo tripsina 2,5% e solução de EDTA

0,1% (GIBCO/Invitrogen) e incubados a 37^{0}C e 5% CO_2 durante três horas, quando a derme foi separada da epiderme. A tripsina foi neutralizada com meio KSFM suplementado com 10% FBS. O sobrenadante (contendo as células da derme e da epiderme) foi filtrado (40mm Falcon/Corning) e centrifugado por 10 minutos a 400G.

O *pellet* de células foi ressuspenso em meio de cultura e transferido para frascos de cultura contendo concentração de 1x10^5 células/ml em 2ml de meio de cultura específico para cada tipo celular e depois incubado a 37^{0}C e 5% CO_2. Os queratinócitos foram cultivados em meio KSFM (KSFM-GIBCO/Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - LGC Biotechnology) e L-glutamina 0,2mg/ml, penicilina 100UI/ml e estreptomicina 0,1mg/ml (GIBCO/Invitrogen). Os fibroblastos foram cultivados em meio 199 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS - LGC Biotechnology) e L-glutamina 0,2mg/ml, penicilina 100UI/mL e estreptomicina 0,1mg/ml (GIBCO/Invitrogen). Os meios de cultura foram trocados três vezes por semana. Quando as células atingiram a confluência, as culturas foram tripsinizadas com tripsina com solução de EDTA por 10 minutos a 37^{0}C e 5% CO_2. Assim como anteriormente, a tripsina foi neutralizada com soro fetal bovino 10%. Esse procedimento foi realizado até a obtenção de uma quantidade mínima de cada tipo celular, aproximadamente 5x10^6 de queratinócitos e 10x10^6 de fibroblastos. O processo todo levou entre 21 e 30 dias. As células foram criopreservadas em soro fetal bovino e solução de DMSO a -80^{0}C.

Todo o processo envolvendo a manipulação das células foi realizado em sala limpa (classe 10.000 ISO 7 - ISO 14644-1).

Preparação das membranas

O preparo das membranas seguiu técnica já implantada no Departamento de Engenharia de Materiais e de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

As membranas foram obtidas de acordo com adaptações dos métodos estabelecidos por Rodrigues et al.,[22] Bueno e Moraes[23] e adaptado por Pires e Moraes,[24] no caso de dispositivos de quitosana-alginato (Q-A), e com base nos procedimentos desenvolvidos por Veiga e Moraes[25] e Bellini et al.[26] para as membranas de quitosana-xantana (Q-X).

Foram utilizados quitosana com grau de desacetilação de 96% (Sigma-Aldrich, lote de número 109K0043V), alginato de sódio de média viscosidade obtido de Macrocystis pyrifera (Sigma-Aldrich, lote de número 058K0126), goma xantana (Sigma- Aldrich, lote de número 108K0038), ácido acético glacial, cloreto de cálcio diidratado e hidróxido de sódio (Merck); além disso, a água utilizada foi destilada e deionizada em um sistema Milli-Q (Millipore).

As membranas de quitosana e alginato foram preparadas pela adição de alíquotas de 180ml de solução de quitosana a 1% (m/v) dissolvida em ácido acético a 2% (v/v) em 360ml de solução aquosa de alginato a 0,5% (m/v) na vazão de 200ml/h no reator de aço inoxidável mantido a 25°C, sob agitação de 500rpm. Após a mistura das soluções, a intensidade de agitação do material foi aumentada para 1000rpm durante 10 minutos adicionais. Em seguida, 26ml de solução aquosa de NaOH a 2M foram adicionados para aumentar o pH para 7, mantendo-se a agitação durante mais 10 minutos. Em seguida, 7,2ml de solução aquosa de CaCl2 a 2% (m/v) foram adicionados para reticular as carboxilas do alginato que não se complexaram à quitosana. A mistura obtida foi desaerada durante 120 minutos, transferida (em alíquotas de massas iguais) para quatro placas de Petri de poliestireno (diâmetro de 15cm) e seca em estufa a 60°C durante seis horas. Após a secagem, as membranas foram imersas em 150ml de solução aquosa de CaCl2 a 2% (m/v) durante 30 minutos, para a reticulação das carboxilas livres remanescentes do alginato, e então lavadas duas vezes durante 30 minutos com 200ml de água deionizada. A etapa final de secagem foi realizada à temperatura ambiente durante 24 horas.

No caso das membranas de quitosana e goma xantana, 200ml de solução aquosa de goma xantana a 1,5% (m/v) foram adicionados a 200ml de solução de quitosana a 1,5% (m/v) dissolvidos em ácido acético a 1,5% (v/v) na vazão de 30ml/h, a 25°C e sob agitação (1000rpm). Em seguida, desaerou-se a suspensão e transferiu-se a mistura para uma placa de poliestireno de 15cm de diâmetro e fez-se a secagem do material a 37°C durante período variável de 24 a 48 horas. A membrana foi lavada duas vezes durante 30 minutos com 200ml de água deionizada, uma vez com 250ml de tampão Hepes (Sigma-Aldrich) a 10mM para neutralizar o pH e finalmente, com 500ml de água deionizada. Uma etapa final de secagem foi realizada à temperatura ambiente durante 24 horas, prendendo-se as bordas para evitar o encolhimento da membrana.

As membranas foram esterilizadas com Oxyfume 30 (30% de óxido de etileno e 70% CO_2) a 40°C durante oito horas, sob umidade relativa de 30 a 80% pela Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda – Acecil (Campinas, SP).

Microscopia eletrônica de transmissão foi feita para verificar o comportamento das células na membrana (Figura 1).

Tratamento do paciente

As células foram descongeladas e cultivadas durante pelo menos 72 horas antes da aplicação. No dia da aplicação, as células foram tripsinizadas, lavadas e contadas conforme protocolos anteriormente descritos por Rehder et al.,[13], Souto et al.,[27,15] Bosnardo[16] e Dinato et al.[17] Foi preparada uma cultura de fibroblastos no total de 1x107 células. Para a aplicação, aspergiram-se as células com a cola de fibrina (Beriplast P – CSL-Behring) sobre o leito da úlcera sob condições assépticas, em regime ambulatorial (Figura 2).

Após a aspersão das células, sobre a úlcera foram colocadas as membranas de polissacarídeos previamente intumescidas em solução fisiológica (Figura 3), a fim de proteger a área contra agentes que pudessem retirar o enxerto, visando auxiliar o processo de cicatrização.

O paciente foi acompanhado durante 20 meses, a cada sete dias no primeiro mês e, posteriormente a cada 15 ou 30 dias. Novas aplicações foram realizadas de acordo com a resposta do paciente, totalizando sete. A documentação fotográfica foi feita com câmera Nikon D5100, utilizando-se uma régua para

determinar a área total da úlcera, delimitando-se suas bordas. As imagens foram processadas com a utilização do *software* Image J2, e as diferenças dos valores das áreas foram determinadas para cada úlcera usando o *software* GraphPad Prism5.

Também se utilizou um questionário de qualidade de vida (SF-36) antes do início do tratamento e ao final.

RESULTADOS

O paciente apresentava múltiplas úlceras cutâneas, variando de 0,5cm^2 a 8cm^2, distribuídas por todo o corpo, mas, principalmente nos membros inferiores (Figura 2). As lesões selecionadas para o tratamento foram as maiores e mais profundas, que causavam maior desconforto. O processo de cicatrização foi documentado fotograficamente nas semanas zero, três, 21, 28, 42, 64 (Figura 3) e 79 (Figura 4).

Menos de 12 horas após a aplicação das células e membranas, o paciente referiu completa melhora da dor e, dentro de dois dias, início do processo de cicatrização. Logo após, observou-se um filme brilhante na superfície das úlceras. Alguns dias depois, um intenso exsudato, atribuído a fibrina, tecido de granulação e presença de crosta foi visto em algumas lesões, com seu posterior fechamento centrípeto. Após uma semana de tratamento, algumas feridas estavam quase totalmente fechadas.

A taxa de cicatrização alcançada foi acima de 95%, com melhora contínua, mesmo após cinco meses da última aplicação (Gráfico 1). O paciente não apresentou mais dores nas áreas tratadas, com importante melhora na qualidade de vida (Gráfico 2).

É interessante notar que a calcinose desapareceu mesmo em áreas não tratadas diretamente.

DISCUSSÃO

A DMJ é desordem autoimune rara, que afeta principalmente os músculos e a pele. O principal tratamento é a administração de altas doses de corticosteroides combinados com outras drogas imunossupressoras. Aproximadamente 30% dos pacientes não conseguem controlar a doença, apesar de múltiplas intervenções,[1-5] resultado visto em nosso paciente. A aplicação de células-tronco foi descrita como último recurso no tratamento de paciente com doenças autoimunes refratárias ao tratamento, porém com persistência da doença cutânea, incluindo a calcinose e as contraturas.[28]

O tratamento da doença ulcerada e refratária é bastante complexo, sendo as doenças autoimunes bastante desafiadoras. A engenharia de tecidos com foco nos queratinócitos e fibroblastos autólogos tem sido usada no tratamento de úlceras cutâneas desde a década de 1980. Inicialmente a técnica foi testada em pacientes com queimadura, mostrando bons resultados. Depois, a melhora na cicatrização foi observada em úlceras vasculares e diabéticas.[16,17]

Nos últimos anos, a engenharia de tecidos avançou significativamente com esse propósito, e uma das tendências na dermatologia é o uso de biomateriais compostos de biopolímeros

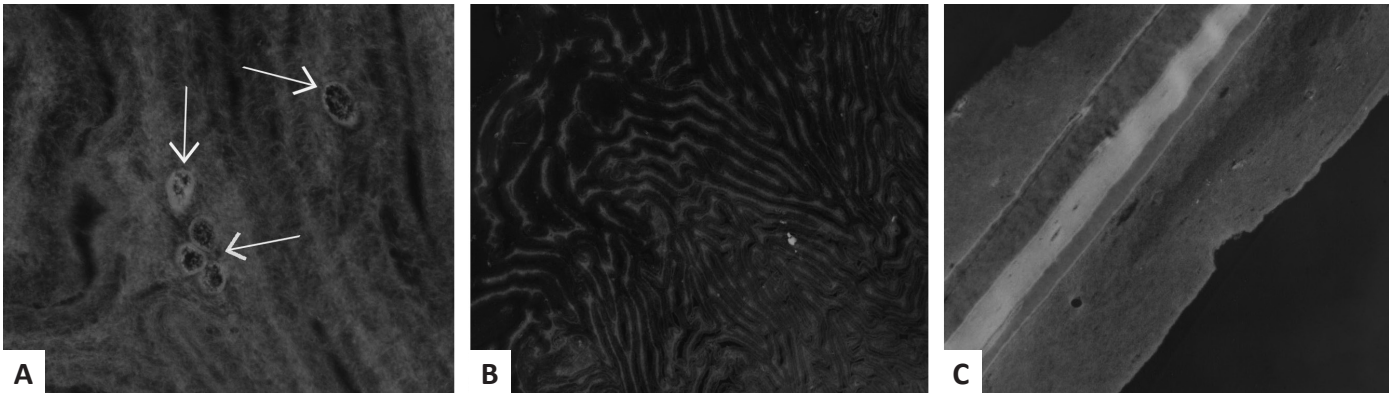

Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão: **A -** membrana de quitosa e xantana com as células (setas brancas) (12930x); **B -** membrana de quitosana e alginato (1293x); **C -** membrana de quitosana e alginato (3597x)

Figura 2: Aspecto clínico das feridas. **A, B, C -** apresentação clínica do paciente com DMJ e múltiplas lesões

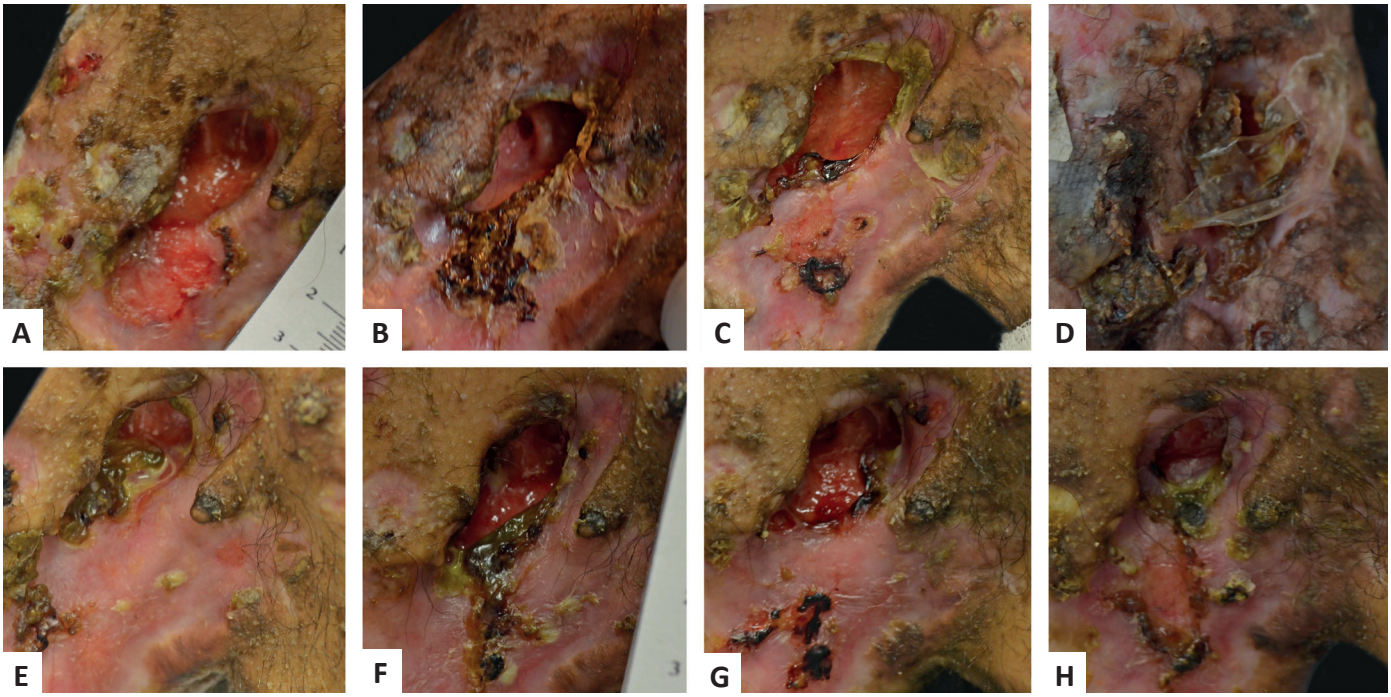

Figura 3: A-H - acompanhamento clínico da porção lateral do joelho esquerdo; **A -** semana 0 – primeira aplicação da cultura autóloga de fibroblastos e queratinócitos com membrana de Q-A – notar a exposição óssea; **B -** semana 3 – segunda aplicação – presença de crosta e início da cicatrização centrípeta; **C -** semana 4 – 75% de melhora; **D -** semana 6 – terceira aplicação – notar a membrana de Q-A aplicada; **E -** semana 21 – quarta aplicação – completa reepitelização da porção distal da úlcera; **F -** semana 28 – quinta aplicação – devido à atividade da doença, uma progressão da ferida foi observada (de 0,88cm² para 1,22cm²); **G -** semana 42 – sexta aplicação, progressão da extensão da úlcera (de 1,22cm2 para 1,43cm²) com melhora em relação à profundidade da lesão; **H -** semana 64 – 87,85% de melhora

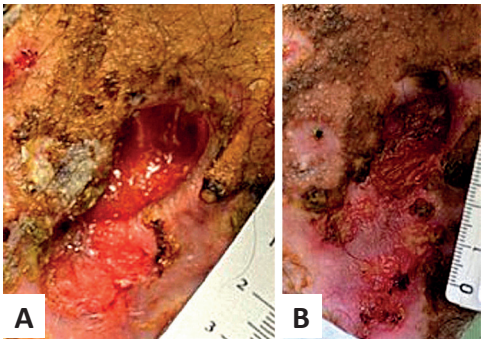

Figura 4: Seguimento do joelho direito porção lateral: **(A)** semana 0; **(B)** semana 79

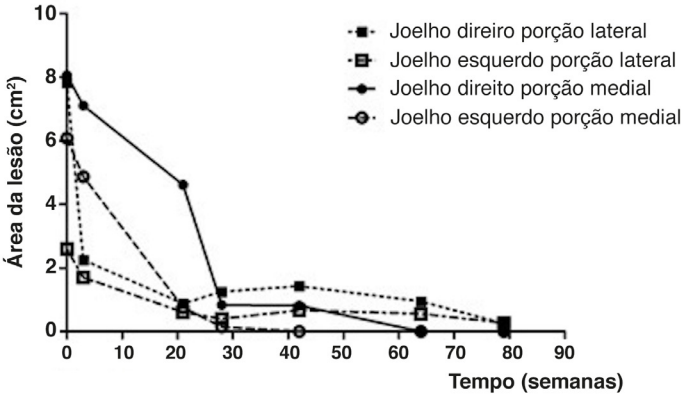

Gráfico 1: Evolução da cicatrização das úlceras; as setas indicam o momento da aplicação (semanas 0, 3, 6, 21, 28, 42 e 70). Nas lesões do joelho direito foi utilizada membrana de quitosana-alginato e, nas do esquerdo, quitosana-xantana

em combinação com células cumprindo os requisitos de biossegurança e que são ativas no tipo de ferida tratada.[20] Resultados positivos e relevantes foram vistos em nosso paciente com DMJ depois da aplicação dos fibroblastos e queratinócitos autólogos, aplicados com cola de fibrina, e seguidos pela cobertura de membranas feitas de quitosana com xantana ou alginato.

A proteção fornecida pelos curativos de quitosana-alginato e quitosana-xantana com estímulos negativos do ambiente desempenha um papel no processo de cicatrização. De acordo com Wang *et al.*,[29] o curativo ideal deve ser flexível e possuir a habilidade de controlar a perda de água no local da feriada. Deve ser resistente à invasão bacteriana, prevenindo sepse, ter boa aderência na úlcera, como também ser não antigênico, atóxico e de fácil aplicação e remoção. Da perspectiva da engenharia, o material para o curativo deve também ter boas propriedades mecânicas para que sua integridade seja mantida durante o uso.[24] As taxas de evaporação de água também são importantes, tanto para manter a umidade adequada no leito da ferida como para evitar acúmulo indesejado de secreção. Ambas as membranas utilizadas nesse trabalho atingi-

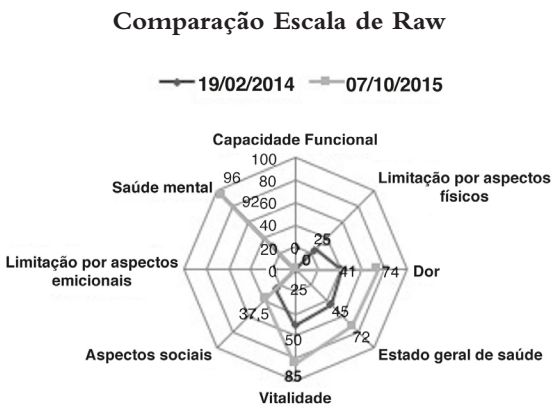

GRÁFICO 2: - SF-36 inicío e final do tratamento – Pontuação varia de 0 (saúde ruim) a 100 (saúde excelente)

ram essa expectativa, sendo efetivas na contribuição para acelerar a regeneração tecidual e promover rápida cicatrização. Além disso, as membranas são transparentes, permitindo a observação do leito da ferida, sem necessidade de removê-las.

O complexo quitosana-alginato parece ter ação positiva no processo de remodelação tecidual na cicatriz, aumentando as taxas de síntese de colágeno, enquanto também melhora a compactação das novas fibras e promove a presença de fibroblastos maduros.[29] Além disso, essas membranas parecem estimular e regular as várias fases do processo de cicatrização,[21] sendo útil no tratamento das úlceras cutâneas. Tanto a síntese de colágeno como a modulação da contração da ferida pela membrana de quitosana-alginato podem resultar em rápido fechamento da lesão.[21] Resultados similares foram vistos nas membranas de quitosana-xantana, associadas a células mesenquimais.[20]

O papel da cola de fibrina não está claro nesse caso. O produto é um adesivo biológico que funciona por simular a fase exsudativa da cicatrização, sendo frequentemente utilizada na cirurgia plástica, como também em transplante de órgãos. Nossa hipótese do seu potencial benefício, nesse caso, é de que seja pela melhora da aderência das células e membranas à lesão, e pelas ações hemostática e antibacteriana.[30-33] Em condições normais, logo após o ferimento, fibrina e fibronectina são depositadas na ferida. Lá a fibrina age como barreira hemostática, aderindo o tecido e as células em volta e estimulando a migração de fibroblastos, o que também deve ter ocorrido no presente caso. Redher *et al.*[34] demonstraram que a aplicação apenas da cola de fibrina, sem a cultura de células, foi incapaz de reepitelizar a ferida, apesar da formação de crosta. Os autores não mencionaram a redução da dor com essa aplicação.

A matriz de fibrina libera fatores de crescimento, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator transformador de crescimento b (TGF-β), e essas proteínas podem estar relacionadas com a melhora da dor, logo após o início do tratamento. Além da ação antibacteriana, o aumento da migração e proliferação de células endoteliais pode contribuir para uma melhora da irrigação vascular e também promover um ambiente ideal para migração, proliferação e diferenciação dos fibroblastos e queratinócitos melhorando a cicatrização.[31]

A melhora da calcinose não está clara, e o fenômeno de Köebener não foi observado após o início do tratamento, mesmo na área da biópsia.

A terapia celular com fibroblastos e queratinócitos autólogos foi usada nesse trabalho para um tratamento mais efetivo das úlceras em paciente com DMJ, com melhor resultado funcional e estético, como também levando a uma recuperação mais rápida e eliminação da dor, permitindo que o paciente retomasse seus estudos. O desenvolvimento de uma estratégia baseada em terapia celular representa um avanço no tratamento de úlceras de diferentes etiologias,[17] e o uso das membranas de Q-A e Q-X em associação com as células autólogas é muito vantajoso, porque as membranas podem funcionar com uma barreira física, prevenindo contaminações externas,[20] além de um potencial papel na cicatrização. Não foi observada diferença de *performance* na taxa de cicatrização com as diferentes membranas.

Os implantes descritos aqui foram efetivos quando comparados aos tratamentos convencionais de enxerto de pele de áreas doadoras saudáveis,[16,17,35] mesmo que algumas das úlceras não tenham cicatrizado em sua totalidade, provavelmente devido à extensão e profundidade. As culturas celulares podem ser criopreservadas e, eventualmente, utilizadas em uma nova aplicação. As células autólogas são ótimas candidatas, pois com elas elimina-se completamente o risco de rejeição. Outro aspecto positivo é a não necessidade de hospitalização ou debridamento das lesões.

CONCLUSÃO

Esse foi o primeiro caso descrito mostrando o uso de culturas autólogas de fibroblastos e queratinócitos associados a membranas de quitosana-alginato ou quitosana-xantana para o tratamento de úlceras cutâneas associadas a dermatomiosite juvenil.

Neste trabalho demonstrou-se uma estratégia efetiva no tratamento de doença cutânea causada pela dermatomiosite juvenil, embora não tenha sido completamente curada. Talvez a combinação do transplante de células-tronco com células cutâneas autólogas possa ser a cura para um paciente como esse, que apresenta doença extensa e debilitante. Apesar de ser técnica sofisticada e restrita, mostrou estratégia terapêutica válida que pode ser utilizada na DMJ como também em úlceras de diferentes etiologias. ●

REFERÊNCIAS

1. Batthish M, Feldman BM. Juvenile Dermatomyositis. Curr Rheumatol Rep. 2011; 13(3): 216-24.
2. Martin N, Li CK, Wedderburn LR. Juvenile dermatomyositis: new insights and new treatment strategies. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2012; 4(1): 41-50.
3. Meher BK, Mishra P, Sivaraj P, Padhan P. Severe calcinosis cutis with cutaneous ulceration in juvenile dermatomyositis. Indian Pediatr. 2014; 51(11): 925-27.
4. Shinjo SK, Souza FHC. Update on the treatment of calcinosis in dermatomyositis. Rev Bras Reumatol 2013; 53(2):211-14.
5. Hoeltzel MF, Oberle EJ, Robinson AB, Agarwal A, Rider LG. The presentation, assessment, pathogenesis and treatment of calcinosis in juvenile dermatomyosistis. Curr Rheumatol Rep. 2014; 16(12): 467.
6. Valenzuela A, Chung L, Casciola-Rosen L, Fiorentino D. Identification of Clinical Features and Autoantibodies Associated With Calcinosis in Dermatomyositis. JAMA Dermatol 2014; 150(7):724-29.
7. Pruniéras M, Régnier M, Woodley D. Methods for cultivation of keratinocytes with air-liquid interface. J Invest Dermatol 1983; 81(Suppl 1): 28s-33s.
8. Régnier M, Patwardhan A, Scheynius A, Schmidt R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. Med Biol Eng Comput 1998; 36(6): 821-244.
9. Kim BM, Suzuki S, Nishimura Y, Um SC, Morota K, Maruguchi T, *et al.* Cellular artificial skin substitute produced by short period simultaneous culture of fibroblasts and keratinocytes. Br J Plast Surg. 1999; 52(7):573-78.
10. Bolívar-Flores YJ, Kuri-Harcuch W. Frozen allogeneic human epidermal cultured sheets for the cure of complicated leg ulcers. Dermatol Surg. 1999; 25(8):610-17.
11. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. Annu Rev Med. 2001; 52:443-451.
12. Margulis A, Zhang W, Garlick JA. In vitro fabrication of engineered human skin. Methods Mol Biol. 2004; 289:61-70.
13. Rehder J, Souto LR, Issa CM, Puzzi MB. Model of human epidermis reconstructed in vitro with keratinocytes and melanocytes on dead de-epidermized human dermis. São Paulo Med J. 2004; 122(1):22-5.
14. Johnsen S, Ermuth T, Tanczos E, Bannasch H, Horch RE, Zschocke I, *et al.* Treatment of therapy-refractive ulcera cruris of various origins with autologous keratinocytes in fibrin sealant. Vasa. 2005; 34(1):25-9.
15. Souto LR, Rehder J, Vassalo J, Cintra ML, Kraemer MHS, Puzzi MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. São Paulo Med J. 2006; 124(2):71-6.
16. Bosnardo CAF. Análise clínica prospectiva randomizada aberta, para o tratamento das úlceras de venosas, através da terapia celular com o enxerto de queratinócitos autólogos; comparada em dois grupos, associado ou não, a Diosmina Hesperidina Micronizada. [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2010.
17. Dinato M, Puzzi MB, Rehder J, Batista F. Tissue therapy with autologous dermal and epidermal culture cells for diabetic foot ulcers. Cell Tissue Bank. 2012; 13(2): 241-49.
18. Muzzarelli RAA, Morganti P, Morganti G, Palombo P, Palombo M, Biagini G, *et al.* Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments. Carbohydr Polym. 2007;70(3):274-84.
19. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Carbohydr Polym 2009; 76(2):167-82.
20. Bellini MZ, Caliari-Oliveira C, Mizukami A, Swiech K, Covas DT, Donadi EA, *et al.* Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. J Biomat Appl. 2015; 29(8): 1155-66.
21. Caetano GF, Frade MA, Andrade TA, Leite MN, Bueno CZ, Moraes AM, *et al.* Chitosan-alginate membranes accelerate wound healing. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2015; 103(5):1013-22.
22. Rodrigues AP, Sanchez EMS, Costa AC, Moraes AM. The Influence of Preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. J Appl Polymer Sci. 2008; 109(4):2703-10.
23. Bueno CZ, Moraes ÂM. Development of porous lamellar chitosan-alginate membranes: Effect of different surfactants on biomaterial properties. J Appl Polym Sci. 2011;122(1):624-31.
24. Pires ALR, Moraes ÂM. Improvement of the mechanical properties of chitosan-alginate wound dressings containing silver through the addition of a biocompatible silicone rubber. J Appl Polym Sci. 2015;132(12):41686.
25. Veiga IG, Moraes AM. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xanthan membranes. J Appl Polym Sci. 2012;124(Suppl 1): E154-60.
26. Bellini MZ, Pires ALR, Vasconcelos MO, Moraes AM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. J Appl Polym Sci. 2012;125(Suppl 2): E421-31.
27. Souto LRM. Modelo de pele humana (Derme + Epiderme) Reconstruída In Vitro. [dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2005.
28. Enders FB, Delemarre EM, Kuemmerle-Deschner J, van der Torre P, Wulffraat NM, Prakken BP, *et al.* Autologous stem cell transplantation leads to a change in proinflammatory plasma cytokine profile of patient with juvenile dermatomyosistis correlating disease activity. Ann Rheum Dis. 2015; 74(1): 315-317.
29. Wang L, Khor E, Wee A, Lim LY. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: assessment of incisional wound healing. J Biomed Mater Res. 2002; 63(5): 610-18.
30. Scardino MS, Swaim SF, Morse BS, Sartin EA, Wright JC, Hoffman CE. Evaluation of fibrin sealants in cutaneous wound closure. J Biomed Mater Res. 1999; 48(3): 315-21.
31. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R. Use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: a review. Plast Reconstr Surg. 2001; 108(6):1713-26.
32. Pérez-Guisado J, Gaston KL, Benítez-Goma JR, Cabrera-Sánchez E, Fidalgo-Rodríguez FT, Rioja LF, *et al.* Smoking and diabetes mellitus type 2 reduce skin graft take; the use of fibrin glue might restore graft take to optimal levels. Eur J Dermatol 2011; 21(6): 895-8.
33. Jeschke MG, Finnerty CC, Shahrokhi S,Branski LK, Dibildox M, ABA Organization and Delivery of Burn Care Committee. Wound coverage technologies in burn care: novel techniques committee. J Burn Care Res. 2013; 34(6):612-20.
34. Rehder J, Bosnardo CAF, Kraft MBPL, Frade MAC, Guillaumon AT, Batista FBX, *et al.* A comparative study of cell therapy and fibrin glue applied to chronic venous ulcers. Procedia Engineering 2013; 59: 85-91.
35. Gómez C, Galán JM, Torrero V, Ferreiro I, Pérez D, Palao R, *et al.* Use of an autologous bioengineered composite skin in extensive burns: clinical and functional outcomes. A multicentric study. Burns. 2011; 37(4): 580-89.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Paula Tavares Colpas | ORCID 0000-0002-1389-0749
Investigadora principal do artigo, responsável pela revisão de literatura, escrita, correções e aprovação final.

Paulo César Martins Alves | ORCID 0000-0002-6833-0343
Responsável pela cultura celular e revisão do manuscrito.

Carolina Caliari Oliveira | ORCID 0000-0001-7906-9809
Responsável pela cultura celular e revisão do manuscrito.

Ana Luiza Resende Pires | ORCID 0000-0001-8247-6288
Responsável pela produção de membranas e revisão do manuscrito.

Angela Maria Moraes | ORCID 0000-0002-5813-332X
Orientação e revisão do estudo.

Maria Beatriz Puzzi | ORCID 0000-0001-8248-7884
Orientação e revisão do estudo.