



PRÓTESES VIVAS DE PELE HUMANA

Radovan Borojević

Professor Titular de Histologia e Embriologia,
Instituto de Ciências Biomédicas e
Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina,
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Patrícia Serricella

Biotecnóloga
Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à
Medicina
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Fotos cedidas pelos autores

Próteses contendo as células do próprio paciente no tratamento de lesões cutâneas

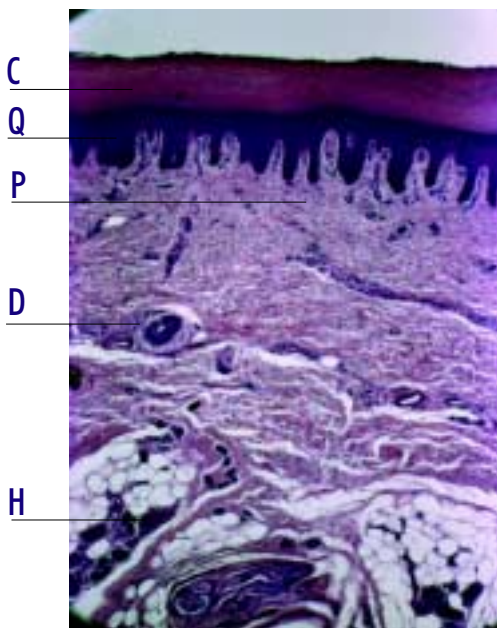


Figura 1. Corte histológico da pele humana. C – a camada córnea. Q – os queratinócitos da epiderme. P – a região papilar, unindo a derme e a epiderme. D – a derme. H – a hipoderme e o tecido adiposo subjacente.

A pele e as mucosas representam a interface do organismo com o ambiente externo. A pele, que recobre a totalidade da superfície externa do corpo, é um dos maiores órgãos, atingindo 16% do peso corporal. Graças à sua resistência física e à constituição química da camada córnea que a reveste, a pele protege o organismo contra agentes físicos e químicos, assim como contra invasão de organismos patogênicos. Além disso, o tecido cutâneo e as estruturas a ele associadas protegem o organismo contra a perda de água por dessecação, garantem a homeostasia de líquidos e minerais produzindo o suor, atuam na secreção e excreção de moléculas endógenas, participam na regulação térmica e atuam como receptores para a percepção do meio ambiente.

A pele é composta de duas camadas distintas. A superfície externa é recoberta por **epiderme**, camada estratificada composta essencialmente de queratinócitos. A camada basal de queratinócitos, repousando sobre uma “membrana basal”, é conhecida como a camada germinativa, cujas células se dividem garantindo a renovação da epiderme. À medida que as células se separam da membrana basal e avançam para a superfície, o seu corpo contém cada vez mais filamentos de queratina, aumentando as-

sim a sua resistência mecânica. A camada mais externa, a camada córnea, é composta de células mortas, que descamam progressivamente, sendo substituídas por novas células que migram a partir da camada basal. Assim, calcula-se que a epiderme humana se renove integralmente a cada 20 a 30 dias.

Além dos queratinócitos, junto à membrana basal encontram-se os melanócitos, as células responsáveis pela cor da pele. Os melanócitos sintetizam o pigmento natural da pele, a melanina, que é progressivamente transferida aos queratinócitos. As características genéticas do indivíduo e a exposição ao sol determinam a quantidade da melanina incorporada e, conseqüentemente, a cor da pele. Os defeitos de melanócitos e da sua capacidade de produzir a melanina resultam em regiões ou manchas claras na pele, tais como observadas no albinismo ou vitiligo.

A consistência física da pele é garantida pela **derme**, que é subjacente à epiderme. A derme contém uma densa malha de fibras de colágeno e elastina, produzidas por células específicas, os fibroblastos cutâneos. Essas células participam também na regeneração da pele e na renovação da trama fibrosa da derme. A membrana basal que separa a epiderme da derme é produzida por ambas as camadas, e contém as moléculas de adesão e as fibrilas perpendiculares que penetram profundamente na derme, garantido a continuidade física entre as duas camadas. A derme contém os vasos sanguíneos e linfáticos que a irrigam e garantem a nutrição

da pele, assim como os nervos, que informam o organismo sobre a sua interação com o ambiente. A interface entre a epiderme e a derme normalmente não é plana e sim papilar, aumentando a superfície de contato e permitindo que a pele se estique sem se romper. Dentro da derme encontram-se também as estruturas que são derivadas da epiderme, como pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas. Embaixo da derme encontra-se a hipoderme, a camada frouxa de tecido conjuntivo que une a pele aos órgãos subjacentes. Ela permite, por exemplo, que a pele deslize sobre os músculos.

As lesões extensas de pele e mucosas são seguidas de distúrbios graves, freqüentemente fatais, e requerem intervenção urgente visando a restituição da sua integridade. O caso de queimaduras graves, tanto térmicas quanto químicas, é um exemplo típico e freqüente dessas lesões. Quando as queimaduras são de primeiro ou segundo grau, somente as camadas superficiais são atingidas. Os restos de células epidérmicas sobre a membrana basal, ou as estruturas derivadas da epiderme que se encontram no interior da derme (por exemplo os bulbos capilares), podem garantir a regeneração cutânea. A conduta médica, nesse caso, dirige-se essencialmente para o alívio da dor, garantia do equilíbrio de líquidos biológicos, proteção da área queimada contra a infecção e o atrito físico. A dificuldade dessa tarefa é proporcional à extensão das lesões. As queimaduras mais graves, que destroem a epiderme, a derme e os tecidos subcutâneos representam um problema muito mais complexo, já que a regeneração espontânea da pele não é mais possível. O tecido conjuntivo subjacente envolve-se numa reação exacerbada de reparo, conhecida como “granulação”, cuja retração e fibrose progressiva causam extensas cicatrizes desfigurantes que, freqüentemente, imobilizam os movimentos das articulações. Nesse caso, a única solução é a substituição da pele nas regiões queimadas por pele transplantada. Curiosamente, o transplante da pele heteróloga (de um outro indivíduo) é muito mais complexo do que o transplante de órgãos internos. Como a pele representa a interface do organismo com o mundo externo, as células especializadas que nela se alojam são extremamente competentes em induzir uma resposta imune de defesa e de rejeição a qualquer tecido estrangeiro. O en-

xerto da pele de outro indivíduo (com exceção de irmão gêmeo) é sempre rejeitado, mesmo na presença de tratamento imunossupressor. Portanto, a única solução é o transplante autólogo da pele (do próprio paciente). Quando a lesão é pequena, isso é possível, mas quando a superfície queimada é grande, muitas vezes não existe área doadora adequada. A solução, nesse caso, é recorrer à biotecnologia de manipulação *in vitro* de células do paciente, visando gerar uma prótese celular viva, que propiciará a regeneração de tecidos cutâneos destruídos.

A tecnologia do cultivo de células humanas está hoje suficientemente aprimorada para obter uma grande massa celular a partir de material inicial exíguo. Por exemplo, a partir de 0,5 a 2 cm² de pele, pode-se obter, em 20 a 30 dias uma superfície de queratinócitos cultivados, que se aproxima de um metro quadrado. Conseqüentemente, os ensaios de obten-

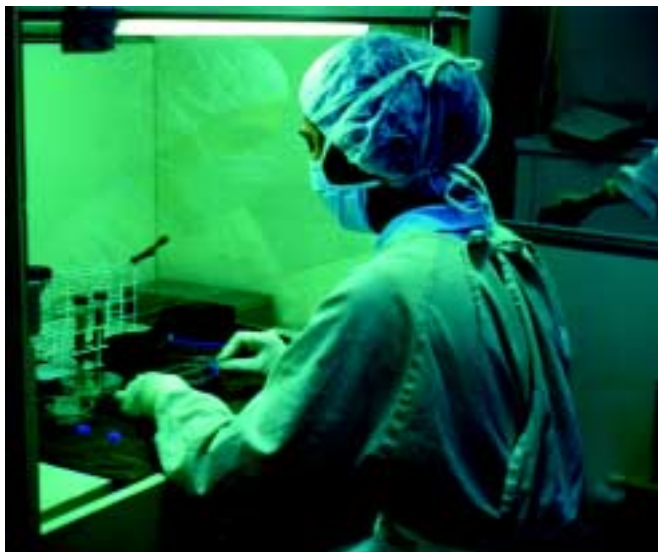


Figura 2. Preparação de uma prótese viva de pele.

ção de próteses vivas de pele cultivada a partir da biópsia do próprio paciente foram feitos, as metodologias aprimoradas, e os tratamentos usando esse tipo de próteses estão disponíveis no exterior e, mais recentemente, nos laboratórios do Programa Avançado de Biologia Celular Aplicado à Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O preparo da prótese começa retirando-se um fragmento de 1 – 2 cm² de pele. O tecido é fragmentado e digerido enzimaticamente. As células vivas obtidas são cultivadas em condições que favoreça o crescimento de queratinócitos, ao mesmo tempo que inibem a proliferação de

fibroblastos. Em condições normais de cultivo, os fibroblastos proliferam mais rapidamente que os queratinócitos impedindo a expansão dos mesmos. Ao longo do crescimento, a cultura pode ser expandida por repiques sucessivos. Após 4 a 10 dias de cultivo em confluência celular, remove-se integralmente a epiderme cultivada dos frascos de cultura com ajuda de enzimas. A epiderme é fixada em gaze, e a prótese pode ser transportada em gelo para a aplicação cirúrgica.

O cultivo e a obtenção das próteses epidérmicas, tal como descrito, são plenamente satisfatórios quando a prótese é aplicada sobre uma camada de derme parcialmente preservada. A membrana basal, indispensável para a integração da prótese com o tecido subjacente é produzida por ambas as camadas, a epiderme e a derme, e a sua formação é acelerada na presença dos dois tecidos. Na presença da derme, a camada epidérmica, originalmente plana, formará a estrutura papilar, aumentando a resistência física e, em um período relativamente curto (semanas ou poucos meses), o enxerto terá as qualidades funcionais e estéticas equivalentes à pele original.

Esse tipo de tratamento pode ser aplicado também em casos nos quais a assistência médica requer a ablação de superfícies mais ou menos extensas de tecido cutâneo. Essa ablação pode ser preventiva ou corretiva, como por exemplo nos casos de nevus gigante (sinais escuros gigantes), onde a ablação de tecidos anormais pode prevenir uma posterior deriva para o câncer de pele grave, o melanoma. É claro que nesses casos os resultados funci-

onais e estéticos são igualmente importantes. De maneira semelhante, as próteses celulares da epiderme podem ser usadas em tratamento de manchas hiperocrômicas, ou hipocrômicas como as encontradas no vitiligo. O cultivo de epiderme do fragmento biopsiado inclui os queratinócitos e os melanócitos. A cor da prótese será aproximadamente equivalente à cor do tecido doador, já que o equilíbrio quantitativo entre os dois tipos celulares e a produção da melanina é uma propriedade intrínseca do tecido. O procedimento nesse caso envolve (a) a retirada de uma superfície pequena da pele normal do paciente, (b) o cultivo da epiderme até a obtenção da superfície suficiente para cobrir as regiões hipocrômicas, (c) a abrasão da pele nessas regiões até a retirada da epiderme, e (d) a sua substituição por

epiderme cultivada, que terá a cor natural.

Infelizmente, em muitos casos, a derme não é preservada para receber o transplante da epiderme. Além dos casos de queimaduras graves, que envolvem os tecidos subcutâneos, esse problema ocorre no tratamento de lesões cutâneas degenerativas crônicas, como ulcerações extensas associadas com lesões vasculares, que ocorrem, por exemplo, na diabetes crônica, ou em caso de desenvolvimento de lesões cancerosas profundas, que requerem a ablação de tecidos degenerados e restituição da continuidade cutânea. A interação da epiderme transplantada com o tecido conjuntivo em áreas recém-descobertas, ou com tecido de granulação jovem formado no lugar de queimaduras relativamente recentes, é razoável. Entretanto, essa interação é muito fraca no tecido de granulação crônico ou nas ulcerações. A reconstituição de uma pele com as propriedades mecânicas adequadas é difícil e pode levar meses ou anos. Nesses casos, a solução é o preparo de próteses com a estrutura dermo-epidérmica.

A proposta mais simples é o plaqueamento de queratinócitos sobre um suporte acelular orgânico biocompatível, tal como as placas de acetato de ácido hialurônico, polímeros glicídicos, ou colágeno, que possa ser associado ou não a outros componentes da derme, como os glicosaminoglicanos, elastina ou fibronectina. Esses substratos oferecem um suporte físico facilitando a manipulação da prótese, que, nesse caso, não requer o tratamento enzimático para

remoção da camada epidérmica do substrato de cultivo. A capacidade de adesão da prótese pode ser diminuída por modificações causadas pelo tratamento enzimático citado. Após o transplante, o substrato é lentamente absorvido pelo tecido subjacente, e o tecido cicatricial progressivamente estabelece uma interação funcional com a epiderme. Uma variante desse método é o uso de pele humana cadavérica, acelular e tratada de maneira a conservar a estrutura e a composição quí-



Figura 3. Uma prótese pronta para ser aplicada em um paciente.

mica natural.

A proposta mais complexa e funcional é o preparo da prótese dermo-epidérmica, onde a derme também contém células do

próprio paciente. Nesse caso, simultaneamente com o cultivo de queratinócitos, estabelece-se uma cultura de fibroblastos. Após expansão, os fibroblastos são inoculados no interior de um gel de colágeno, formando uma estrutura tridimensional equivalente à derme. Tendo estabelecido essa camada, os queratinócitos são plaqueados na sua superfície, constituindo em poucos dias uma prótese viva, equivalente a um fragmento de pele. Como a camada de fibroblastos pode ter a espessura desejada, essa prótese pode ser usada para restituir o volume dos tecidos queimados ou retirados cirurgicamente. Após o transplante, os fibroblastos secretam a nova matriz funcional, a camada de colágeno é vascularizada, restabelecendo a circulação sanguínea e linfática. Os resultados desse tratamento são amplamente satisfatórios, tanto do ponto de vista funcional quanto estético.

Os grandes centros médicos europeus e norte-americanos já utilizam rotineiramente a técnica de próteses dermo-epidérmicas. Em nossos laboratórios, a utilização dessas próteses mais complexas está ainda na fase de experimentação laboratorial. Em termos gerais, uma das limitações do uso de próteses celulares de pele é o seu alto custo, e o tempo necessário para a obtenção da prótese de superfície extensa (2 a 3 semanas). No caso de queimados, o paciente requer uma assistência médica intensiva durante esse tempo. A outra é a complexidade metodológica da produção das próteses vivas.

Os aparelhos modernos de monitoramento e análise de imagens médicas ou de análises clínicas moleculares são susceptíveis de automação. Caros no momento do investimento inicial, a sua manipulação é do domínio de um especialista geral em mecânica e eletrônica modernas, sendo a possibilidade do uso desses aparelhos quase imediata. A manipulação de células humanas *in vitro* e o preparo de próteses celulares requer uma competência pessoal de biotecnólogos que dominem plenamente a biologia celular e a tecnologia do manuseio *in vitro* de células vivas. A manipulação é extensa e complexa, e deve ser feita em condições de trabalho extremamente rigorosas, já que o produto final será introduzido e incorporado no corpo humano. Essa competência é fruto de um aprendizado necessariamente longo. Sem um esforço adequado na formação de recursos humanos nessa especialidade, os progressos serão lentos. ✦

O Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada à Medicina (PABCAM) foi implantado na UFRJ, com financiamento específico da PETROBRAS, tendo como objetivo promover prestação de serviços, desenvolvimento de novas tecnologias e formação de recursos humanos para assistência médica que envolva emprego de conceitos e técnicas de biologia celular e molecular. Atualmente, o PABCAM engloba o Laboratório de Transplante Autólogo de Medula Óssea e o Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O BCRJ é o único banco de células humanas e animais da América Latina, funcionando regularmente desde 1989. Além da manutenção e distribuição de linhagens celulares, o BCRJ oferece serviços em biotecnologia de células humanas e animais, tais como desenvolvimento e caracterização de linhagens celulares e hibridomas secretores de anticorpos monoclonais, testes de citotoxicidade, identificação de contaminantes e descontaminação de linhagens celulares, pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias e formação de recursos humanos na área de manipulação *in vitro* de células humanas e animais.

O projeto de desenvolvimento de próteses celulares para tratamento de lesões cutâneas está sendo desenvolvido no PABCAM em colaboração com o Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ, sob a direção da Professora Dra. Thalita Franco, e com o Centro de Tratamento de Queimados do Hospital da Força Aérea do Galeão, sob a responsabilidade do Dr. Marcos Aurélio Leiros da Silva.