



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Terapia com células-tronco em úlceras da perna na doença falciforme - revisão de literatura

Adma Barros de Oliveira

**Salvador (Bahia)
Setembro, 2013**

UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Oliveira, Adma Barros de

O48 Terapia com células-tronco em úlceras da perna na doença falciforme – revisão de literatura / Adma Barros de Oliveira. Salvador: AB, Oliveira, 2013.

37fls.

Orientador: Prof. Dr. José Valber Lima Meneses.

Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.

1. Anemia falciforme. 2. Células-tronco. 3. Medicina regenerativa. 4. Terapia celular. 5. Úlcera da perna. I. Meneses, José Válber Lima. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU - 616.155.194



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



Monografia

Terapia com células-tronco em úlceras da perna na doença falciforme - revisão de literatura

Adma Barros de Oliveira

Professor orientador: **José Valber Lima Meneses**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2013.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)
Setembro, 2013

Monografia: *Terapia com células-tronco em úlceras da perna na doença falciforme – revisão de literatura* de **Adma Barros de Oliveira**

Professor orientador: **José Valber Lima Menese**

COMISSÃO REVISORA

- **José Valber Lima Meneses** - Professor Adjunto IV do Departamento de Anestesiologia e Cirurgia da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____

- **Marilda de Souza Gonçalves** - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas-Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____

- **Victor Luiz Correia Nunes** - Professor Auxiliar I do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____

- **Alex Pinheiro Gordia** - Membro do Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde (PPgMS) da Universidade Federal da Bahia.

Assinatura: _____

TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO: Monografia avaliada pela Comissão Revisora e julgada apta à apresentação pública no V Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em ___ de _____ de 2013.

*"Deus ao mar o perigo e o abysmo deu,
Mas nelle é que espelhou o céu".
Fernando Pessoa (1888-1935)*

À Santíssima Trindade.

À Nossa Senhora Aparecida.

Ao soldado de Cristo, Santo Expedito.

Aos Espíritos de Luz.

EQUIPE

- Adma Barros de Oliveira, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Endereço para contato: Largo Terreiro de Jesus, s/n, Pelourinho. CEP: 40.026-010. Salvador, Bahia, Brasil. Correio-e: admabarros@gmail.com;
- José Valber Lima Meneses, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

FONTES DE FINANCIAMENTO

- | |
|---------------------------------|
| 1. Recursos próprios da equipe. |
|---------------------------------|

AGRADECIMENTOS

- Aos meus Pais, **Sônia Margarida Barros de Oliveira** e **Raimundo Ribeiro de Oliveira**, exemplos de Vida, Força, Honestidade e Fé.
- Aos meus irmãos, **Andréa Barros de Oliveira**, **Adriana Barros de Oliveira** e **Anderson Barros de Oliveira** e aos sobrinhos **Pedro Henrique Barros de Oliveira Sousa** e **Paulo Henrique Barros de Oliveira dos Santos**, pelo Apoio Incondicional e Companheirismo nesta longa Jornada.
- Agradeço ao meu Honrado Professor **José Valber Lima Meneses**, meu Orientador, pelo exemplo de Ética e Espírito de Vanguarda.
- Sou eternamente grata aos professores: **Telma Sumie Masuko**, **Gildásio de Cerqueira Daltro**, **Alex Guedes** e **Jorge Luiz Andrade Bastos**: Inspirações Profissionais.
- Às Prezadas Amigas e Sábias Professoras **Eleonora L. Peixinho Guimarães** e **Isabel Carmem F. Freitas**, pela Generosidade e Diálogos Acolhedores.
- Ao Professor **José Tavares-Neto**: Referência de Compromisso, Doação e Responsabilidade na Medicina.
- Ao meu Estimado Amigo **Jefferson Oliveira Silva**, pelo Carinho e Companheirismo.
- À Comissão Revisora formada por **Marilda de Souza Gonçalves**, **Victor Luiz Correia Nunes** e **Alex Pinheiro Gordia**, pela correção minuciosa e sugestões pertinentes, as quais propiciaram o crescimento científico desta obra.
- À minha Dedicada Amiga de turma **Emanuele Viana**, pela Gentileza em traduzir este trabalho.
- À Sra. **Sônia Abreu** e à Sra. **Solange Della-Cella**, sempre muito Amáveis nas atividades bibliográficas.
- Obrigada, **Meu Deus!**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	2
ABREVIATURAS	3
I. RESUMO	4
II. OBJETIVOS	5
III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
III.1 Anemia falciforme: um problema de saúde pública	6
III.2 Fisiopatologia da doença falciforme	7
III.3 Epidemiologia das úlceras na doença falciforme	9
III.4 Fisiopatologia das úlceras na doença falciforme	9
III.5 Medidas gerais para o tratamento das úlceras	10
III.6 Medidas locais para o tratamento das úlceras	11
III.7 Fatores preditivos de não-cicatrização	11
III.8 A função das células-tronco na reparação dos tecidos	12
III.9 Abordagens cirúrgicas nas úlceras secundárias à doença falciforme	14
IV. METODOLOGIA	17
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
VI. CONCLUSÃO	22
VII. SUMMARY	23
VIII. REFERÊNCIAS	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I	Aplicação das células-tronco feita de maneira aleatória, com injeções em torno da úlcera e no seu interior.	14
Figura II	Aposição de biomaterial sobre a ferida.	14

ABREVIATURAS

AF	Anemia Falciforme <i>Sickle Cell Anemia</i>
CFU-Fs	Unidades de Colônias Formadoras de Fibroblastos <i>Fibroblast Colony Forming Units</i>
CTM-h	Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea Humana <i>Mesenchymal Stem Cells derived from bone-marrow</i>
DF	Doença Falciforme <i>Sickle Cell Disease</i>
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Fator</i>
Hb	Hemoglobina <i>Hemoglobin</i>
IL-1β	Interleucina 1 beta <i>Interleucine 1beta</i>
IL-6	Interleucina 6 <i>Interleucine 6</i>
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
NO	Óxido Nítrico <i>Nitric oxide</i>
SciELO	Scientific Eletronic Library Online
SCU-h	Células-Tronco derivadas do Sangue do Cordão Umbilical Humano <i>Human Umbilical Cord Blood derived Mesenchymal Stem Cells</i>
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento <i>beta</i> <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNF - α	Fator de necrose tumoral <i>alfa</i> <i>Tumor necrosis factor alfa</i>

I. RESUMO

“TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO EM ÚLCERAS DA PERNA NA DOENÇA FALCIFORME – REVISÃO DE LITERATURA”

Introdução: A úlcera de perna representa uma morbidade importante na doença falciforme com repercussão psicossocial e na saúde de seus portadores. É mais prevalente em pacientes do sexo masculino, acima dos 10 anos de idade, homozigotos para a hemoglobina S. Seu aparecimento depende de vários fatores como o fenômeno de vaso-oclusão, hipóxia tecidual, hemólise e fatores genéticos. O arsenal terapêutico, nos casos de ulcerações refratárias, é limitado. A terapia com células-tronco revela-se como uma alternativa promissora nos casos de lesões recidivantes e de difícil cicatrização. **Objetivo:** Promover uma revisão bibliográfica sobre a terapia com células-tronco em úlceras de membros inferiores em pacientes com doença falciforme. **Metodologia:** Realizou-se uma análise da literatura nacional e internacional nos últimos 30 anos, no período de janeiro de 1983 a maio de 2013, na Gazeta Médica da Bahia e em três bases de dados: SciELO (*Scientific Electronic Library Online*), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e PubMed. Os critérios de exclusão foram artigos não referentes à úlcera de perna, células-tronco, terapia celular, epidemiologia clínica e histórico da doença falciforme. Foram excluídos artigos não disponíveis ou repetidos para a consulta. Por outro lado, foram selecionados e analisados os artigos científicos disponibilizados para o acesso e que se relacionaram com título deste trabalho, totalizando 53 artigos. **Resultados e Discussão:** Os estudos relativos ao tema foram escassos. Nas pesquisas clínicas foram encontradas apenas duas modalidades terapêuticas que empregavam células-tronco: o uso tópico do fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos e o emprego de células-tronco extraídas da medula óssea humana. Não foram relatados estudos controlados e comparativos entre tais variantes terapêuticas com a finalidade de se determinar qual a melhor conduta para o manejo de úlceras refratárias. **Conclusões:** Ensaios clínicos são necessários para avaliar a eficácia, os custos e os benefícios de cada modalidade terapêutica utilizando terapia celular em relação aos demais tratamentos; outrossim, critérios de conduta devem ser estabelecidos para o manejo de lesões recidivantes na doença falciforme. O sucesso da terapêutica com células-tronco, na medida que promove o fechamento precoce das lesões crônicas e dolorosas, exerce relevante papel psicossocial, profissional e na elevação da auto-estima do doente com anemia falciforme.

Palavras chaves: anemia falciforme, células-tronco, medicina regenerativa, terapia celular, úlcera da perna.

II. OBJETIVOS

PRINCIPAL

Pesquisar na literatura especializada as formas de terapia com células-tronco que se aplicam às úlceras de perna em indivíduos com doença falciforme

SECUNDÁRIOS:

1. Realizar uma revisão bibliográfica sobre a doença falciforme e úlceras de membros inferiores;
2. Associar as vantagens e desvantagens das modalidades de terapia com células-tronco.

III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

III.1 – Anemia falciforme: um problema de saúde pública

A Anemia Falciforme (AF) é a doença hereditária monogênica mais comum do Brasil. É causada pela mutação de um único nucleotídeo (Glu6Val) no gene da globina beta (*HBB*) (Adorno et al., 2005; Cançado et al., 2009).

A Doença Falciforme (DF) predomina entre negros e pardos e, no Brasil, a cada ano, nascem 3.500 crianças com DF e 200.000 com traço falciforme (Félix et al., 2010).

A incidência da DF entre os diferentes estados brasileiros é variada: por exemplo, é estimado na Bahia 1 caso a cada 650 recém-nascidos, enquanto no Rio Grande do Sul esta incidência é de 1 caso a cada 10.000 recém-nascidos (Adorno et al., 2005).

A homozigose da mutação no gene *HBB* ou a associação com outras hemoglobinopatias, sobretudo com a HbC (HbSC), resulta numa morbidade crônica que se associa à anemia grave e à doença vaso-oclusiva sistêmica, com a degeneração progressiva de vasos sanguíneos (Adorno et al., 2005; Santos et al., 2012).

No mundo, a AF pode ser considerada uma doença negligenciada e o seu lado mais perverso se revela na escassez de recursos terapêuticos para o seu tratamento (Santos et al., 2012). Entretanto, o Brasil vem se destacando nos cuidados relativos às morbidades associadas a essa doença, ao tratá-la como um problema de saúde pública, ao incluí-la no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), através da Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde.

O diagnóstico laboratorial da DF é realizado pela detecção da Hb S em homozigose ou da sua associação com outras variantes, mas a presença da hemoglobina S pode ser detectada pelo teste do pezinho no recém-nascido. Quando realizado o diagnóstico pela triagem neonatal, os

métodos laboratoriais mais utilizados são: cromatografia líquida de alta performance e focalização isoelétrica (MS, 2013).

III.2 – Fisiopatologia da doença falciforme

A molécula de Hb é um tetrâmero constituído por duas subunidades de cadeias globínicas, cada qual ligada a um grupo heme. Este é constituído pela protoporfirina IX (anel porfirínico) ligada a um átomo de ferro central (Fe^{+2}), responsável pela ligação com oxigênio (Santos et al., 2012).

As hemácias derivam da linhagem de células eritropoiéticas da medula óssea; são corpúsculos com formato de disco bicôncavo, anucleadas e *vivem* aproximadamente 120 dias na circulação sanguínea. Apresentam com um dos seus constituintes moléculas de hemoglobina (Hb), cuja principal função é transportar oxigênio e gás carbônico aos tecidos, embora a principal forma de transporte do gás carbônico seja dissolvido no plasma (Santos et al., 2012).

As hemoglobinas são diferenciadas de acordo com os tipos de cadeias globínicas. Os tipos mais comuns são: hemoglobina A (HbA) constituída por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias beta (β) ($\alpha_2\beta_2$), é a Hb que representa cerca de 96% do total de Hb presentes em indivíduos saudáveis; a hemoglobina A2 (HbA2) é constituída de duas cadeias alfa (α) e duas cadeias delta (δ) ($\alpha_2\delta_2$). Essas cadeias delta são sintetizadas a partir do primeiro trimestre após o nascimento e representam cerca de 2,5 a 3% das hemoglobinas em indivíduos saudáveis; a hemoglobina fetal (HbF), presente na vida fetal, é constituída por duas cadeias alfa (α) e duas cadeias gama (γ) ($\alpha_2\gamma_2$) e apresenta níveis reduzidos no adulto (Neto et al., 2003; Santos et al., 2012).

Na AF há a presença da hemoglobina S (HbS) que, como a HbA, é constituída por duas cadeias alfa e duas beta ($\alpha_2\beta_2$). Todavia, existe uma mutação pontual no sexto códon do gene *HBB* com a substituição de um ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica. Essa modificação faz com que, em condições de hipóxia, haja a polimerização das moléculas de

HbS. A presença da hemoglobina S leva a alterações importantes nas propriedades físico-químicas da molécula de hemoglobina: a morfologia das hemácias se deforma e com isso elas assumem um aspecto de foice (Meneses et al., 2010; Santos et al., 2012).

Os polímeros formados podem lesar a membrana do eritrócito e provocar hemólise. A diminuição do número de eritrócitos pela hemólise causa o quadro clínico de anemia, presente nos pacientes falciformes (Santos et al., 2012).

Na DF, há instalação de processos vaso-oclusivos. Na vaso-oclusão, há um aumento da adesão de células sanguíneas ao endotélio vascular. Este evento pode bloquear a circulação nos microcapilares, com infarto tecidual, que conseqüentemente desencadeia um processo inflamatório crônico. As citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8 tem papéis relevantes na manutenção deste quadro (Figueiredo, 2007; Santos et al., 2012; Cançado et al., 2012).

Todos esses fatores associados contribuem para eventos agudos e crônicos que ocorrem na AF como dor, seqüestro esplênico, síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral, infecção, priapismo (Daltro et al 2008; Meneses et al. 2010). Contudo, o fenótipo clínico da DF varia amplamente, influenciado por fatores celulares e genéticos, o que poderia explicar, parcialmente, por que algumas pessoas têm a doença muito grave, com complicações vaso-oclusivas frequentes, morbidade precoce e morte em uma idade muito jovem, enquanto outras podem passar assintomáticas até a idade adulta (Santos et al., 2012).

Os quadros de "viscosidade - vaso-oclusão" e o de "hemólise - disfunção endotelial" são expressões de dois subfenótipos da DF. O subfenótipo de "viscosidade - vaso-oclusão" manifesta-se clinicamente por crises de dor, síndrome torácica aguda, osteonecrose, acidente vascular cerebral, sequestro esplênico e falência renal. Por outro lado, manifestações de "hemólise - disfunção endotelial" cursa sobretudo com vasculopatia proliferativa, hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras em pernas, morte súbita, acidente vascular cerebral (Inati et al. 2008; Morris, 2011). Apesar de alguma sobreposição entre os sub-fenótipos, é esperado um

manejo inovador que possa prover terapias personalizadas para um determinado subfenótipo (Morris, 2011).

III.3 - Epidemiologia das úlceras na doença falciforme

As úlceras de membros inferiores representam complicações frequentes em adultos com doença falciforme. Ocorrem entre 8% a 10% dos pacientes homozigotos, mas existem relatos de incidência maior que 50% em pacientes que residem em áreas tropicais. A variabilidade ocorre por diferenças genéticas e condições ambientais (Meneses et al., 2010). São mais comuns em pacientes do sexo masculino, acima dos 10 anos de idade (Koshy et al., 1989; Costa, 2004; Trent et al., 2004; Powars et al., 2005).

Em pesquisa clínica realizada no Brasil com portadores de hemoglobinopatias, a prevalência de úlceras na perna associadas à anemia falciforme correspondeu a 22%. Em pesquisa anterior, realizada no Rio de Janeiro, esse percentual foi de 35% (Rocha, 2004). Na Jamaica, a prevalência é ainda maior, afetando 75% dos portadores de AF. Parece haver diferenças na apresentação relacionadas à localização geográfica; os afrodescendentes da região do Caribe apresentam úlceras mais frequentemente do que aqueles do oeste da África, dos Estados Unidos ou da Europa (Santos et al. 2012). Observou-se que, dentre os pacientes com úlceras na perna, 75% apresentavam anemia falciforme (Cançado et al., 2009).

III.4 - Fisiopatologia das úlceras na doença falciforme

Os principais mecanismos fisiopatológicos são a vaso-oclusão, que aumenta a pressão hidrostática capilar e venosa; as infecções bacterianas secundárias e a alteração na capacidade de transporte de oxigênio. A etiologia é habitualmente de origem traumática (90%), por prurido local (4%), secundária a picadas de insetos (6%) ou espontânea, devida a hipóxia tissular por crises vaso-oclusivas de repetição (Rocha, 2004).

A úlcera de perna pode ter lesão única ou múltiplas, de tamanho variável, margens definidas, bordas em relevo e base com tecido de granulação. São resistentes à terapia,

persistindo por meses ou anos (Rocha, 2004; Sakar, 2000; Serjeant et al., 2005; Meneses et al., 2010).

No início, o tecido adjacente pode ser saudável; com o tempo, a pele apresenta-se hiperpigmentada, hiperquetatótica, com perda do tecido subcutâneo e dos folículos pilosos, gerando a dermatoesclerose perilesional. Essas úlceras podem ser muito dolorosas e frequentemente são acompanhadas por celulite reativa e adenite inguinal (Meneses et al., 2010).

No Brasil, as úlceras em portadores de AF costumam situar-se acima dos maléolos, entre o maléolo e a borda lateral do gastrocnêmio, entre os dedos e na parte posterior da perna (Cançado et al., 2009; Rocha, 2004; Serjeant et al., 2005; Meneses et al., 2010).

III.5 - Medidas gerais para o tratamento das úlceras

O paciente deve estar controlado sob o ponto de vista clínico e hematológico, com correções de deficiências vitamínicas, sais minerais e de eletrólitos, além de eventual desidratação e/ou desnutrição protéico-calórica e principalmente a anemia. As infecções que afetam portadores de AF devem ser controladas, assim como as principais emergências clínicas, como as crises álgicas, a síndrome torácica aguda, o acidente vascular cerebral, o hiperesplenismo, o priapismo, dentre outras condições. É importante prevenir o trauma, garantir a manutenção de albuminemia normal e imunizar contra o tétano. A deficiência de zinco é comum na doença falciforme. O uso do sulfato de zinco nestes pacientes pode auxiliar na cura da úlcera (Meneses et al., 2010).

A hidroxúria inibe a duplicação celular da epiderme e talvez possa exacerbar a hipóxia tecidual na microcirculação (Meneses et al., 2010; Matos et al. 2009).

O uso de pentoxifilina, L-carnatina, warfarina, butirato, eritropoietina e câmara hiperbárica foi relatado, mas seus resultados são ainda inconclusivos pelo pequeno número de

pacientes em cada estudo (Banweel, 1999). O concentrado de antitrombina III em associação com heparina foi utilizado com sucesso em um paciente com úlcera de perna, doença falciforme e deficiência de antitrombina III (Paladino, 2007).

III.6 – Medidas locais para o tratamento das úlceras

As úlceras na DF podem ser colonizadas e infectadas por *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*, além de bacterióides e estreptococos (Meneses et al., 2010; Serjeant et al., 2005).

São necessárias limpeza e desinfecção da pele para remoção das secreções e tecidos necróticos. A remoção dos tecidos deve ser feita com bisturi frio ou tesoura, atentando para não danificar a epiderme em regeneração. Desta forma, o processo de cicatrização será melhor cuidado. Complicações locais devem ser cuidadas como a fibrose subcutânea, que impede o retorno venoso e a drenagem linfática, além da posição antálgica do pé, que deve ser precocemente reconhecida, evitando-se deformidades. (Meneses et al., 2010).

Ações coadjuvantes no tratamento de feridas podem ser adotadas com o uso do oxigênio hiperbárico e da terapia com pressão negativa. Oxigênio hiperbárico é administrado a 100% através de câmara selada. A maior tensão de oxigênio na câmara aumenta a quantidade de O₂ dissolvido no sangue, facilitando a cicatrização. Esse aumento fornece oxigênio extra às células, melhorando o metabolismo e minimizando a hipóxia crônica dos tecidos afetados. A terapia à vácuo promove cicatrização das feridas com a remoção contínua de fluídos estagnados e debris celulares: há diminuição do edema tissular (Meneses et al., 2010).

III.7 – Fatores preditivos de não-cicatrização

Um período de evolução maior que um ano ou extensão do comprometimento lesional maior que 10 cm² são fatores preditivos de retardo na cicatrização. A literatura corrobora que

a idade, a presença de arteriopatias ou de sequelas de trombose venosa profunda e a redução da mobilidade podem dificultar o processo de cicatrização. A idade avançada intervém de múltiplas maneiras, aumentando a frequência das arteriopatias, de doenças cardiovasculares, redução da mobilidade e envelhecimento das células envolvidas na reparação cutânea. A doença pós-flebítica constitui outro fator para a não-cicatrização, assim como a doença venosa superficial e a anquilose do tornozelo. Além disso, a intolerância a aplicação tópica de certos produtos, as infecções, a presença de calcificações subcutâneas e de neoplasias cutâneas predizem má cicatrização da úlcera (Meneses et al., 2010).

Restaurar a hemodinâmica do segmento afetado e o fechamento completo da úlcera, mediante remoção de toda a pele dermatoesclerótica através do desbridamento cirúrgico são objetivos do tratamento (Reindorf et al. 1989; Sakar, 2000; Serjeant et al., 2005; Meneses et al. 2010).

O repertório terapêutico para o manejo das úlceras na DF, em alguns aspectos, encontra-se limitado: a enxertia isolada de pele não muda a fisiopatologia da úlcera, nem aumenta o seu suprimento sanguíneo. Se por um lado os retalhos microcirúrgicos estão associados a bons resultados ao remover tecidos vaso-ocluídos e restaurar uma circulação patente, por outro, este procedimento demanda maior complexidade cirúrgica (Meneses et al., 2010).

III.8 – A função das células-tronco na reparação dos tecidos

Por serem células indiferenciadas, com capacidade de autorrenovação e de se diferenciarem em diversos tipos celulares, as células-tronco apresentam uma série de características que as tornam aspirantes à utilização terapêutica, quando os tecidos sofrem alguma injúria (Bydlowski et al. 2009) .

A medula óssea é fonte tanto de células-tronco hematopoéticas quanto de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana (CTM-h), também denominadas de células

mesenquimais estromais da medula óssea humana ou simplesmente células estromais mesenquimais multipotentes (Bydlowski et al. 2009).

As CTM-h fornecem o suporte do estroma para o crescimento e diferenciação de células-tronco hematopoéticas e para a hematopoese. Constituem uma fração populacional diminuta: a medula adulta fresca compõem cerca de 0,01% a 0,0001% das células nucleadas. As CTM-h são uma população heterogênea de células que tem morfologia semelhante ao fibroblasto. Tais células clonogênicas aderentes ao substrato, em formato de espícula, em culturas em monocamadas, na medula óssea, foram definidas como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (CFU-Fs) (Bydlowski et al. 2009).

As CTM-h secretam uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento. Desta forma, restabelecem o suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostasia tissular e imunológica sob condições fisiológicas. A terapia celular com CTM-h é uma alternativa promissora, porém a compreensão da biologia dessas células ainda é um saber em formação (Monteiro et al. 2010).

A população de CTM-h isolada da medula óssea de humanos expressa em sua superfície marcadores moleculares como: CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA- β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese) e Sca-1 (Gronthos et al., 2003; Kolf et al., 2007; Phinney et al., 2007). Paralelamente, existe um consenso na literatura de que as CTM-h não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoéticas e endoteliais. A ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 na superfície das células mesenquimais permite diferenciá-las das precursoras hematopoéticas (Kolf et al., 2007).

Após uma lesão tecidual, uma cascata complexa de eventos é desencadeada na tentativa de restaurar a integridade da área lesada (Martin, 1997; Monteiro et al.; 2010). Há a formação de coágulo em minutos; as plaquetas ativam-se e liberam fatores de crescimento. Desencadeia-se um processo inflamatório envolvendo as células do sistema imune (poucas

horas após a lesão), primeiramente neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (resposta imune inata) e, posteriormente, linfócitos (resposta imune adquirida) (Martin, 1997; Tsirogianni et al., 2006; Monteiro et al., 2010).

Simultaneamente à resposta inflamatória, as células endoteliais são ativadas pela lesão vascular e hipóxia tecidual. Em resposta a essa ativação e à perda de contato com as células endotélias e com a membrana basal, as células pericito/CTM-h se proliferam e secretam principalmente fatores de crescimento e moléculas de adesão. Tais células podem migrar para o local de lesão e/ou por diapedese e podem entrar na corrente circulatória onde exercerão efeitos parácrinos (Tsirogianni et al., 2006; Meirelles et al., 2008; Monteiro et al. 2010).

Por expressarem uma multiplicidade de receptores para quimiocinas e fatores de crescimento, as CTM-h também podem ser estimuladas a se diferenciar ou secretar fatores solúveis que estimularão outros nichos celulares. Dessa maneira, quanto mais agudo o processo patológico ou quanto mais vascularizada a região afetada, mais efetiva será a resposta das CTM-h (Fuchs et al., 2004; Morrison et al., 2008; Monteiro et al., 2010).

As moléculas bioativas secretadas pelas MSC exercem efeitos tróficos no tecido adjacente, acarretando efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomodulatórios sobre as células imunológicas, aumento da angiogênese, e quimiotaxia para outras células comprometidas com o processo de reparação (Meirelles et al., 2008). A depender da extensão e gravidade dos danos tissulares é possível a redução da resposta inflamatória inicial, em algumas doenças isquêmicas, restabelecimento do suprimento vascular e reparação adaptada do tecido (Monteiro et al., 2010).

III.9 - Abordagens cirúrgicas nas úlceras secundárias à doença falciforme

A terapia com células-tronco em úlceras de pacientes com DF vem sendo realizada como uma estratégia de intervenção com a finalidade de se tratar úlceras refratárias. Foram encontradas duas modalidades de abordagem: a que implanta células estaminais adultas

autógenas da medula óssea diretamente no tecido lesado e a que se utiliza de fatores estimuladores de colônias GM-CSF aplicados também nas feridas de difícil cicatrização.

A conduta inicial desses pacientes se baseia na avaliação da história clínica, com exame físico minucioso, observando alterações tróficas da pele, sensibilidade, temperatura local, enchimento capilar, pulsos e deformidades. São imprescindíveis a avaliação histopatológica e laboratorial. São também coletadas amostras de tecido para cultura e exame anatomopatológico, imagens arteriais e venosas não-invasivas, além de remoção da pele dermatoesclerótica pelo desbridamento cirúrgico (Meneses et al., 2010).

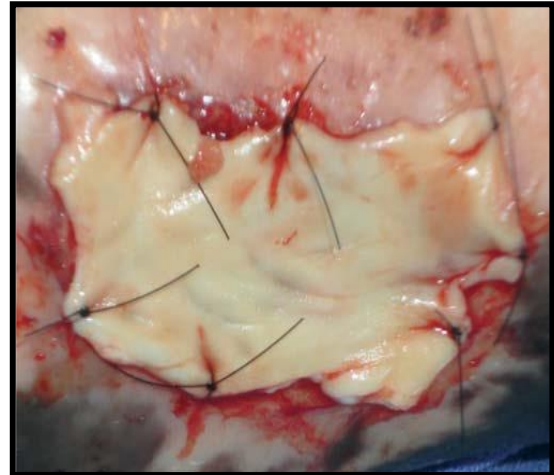
Na implantação autógena de células estaminais adultas no tecido lesado (Figura I), a derme descelularizada é utilizada para revestir o ferimento. É procedente, na maioria das vezes, do excesso de tecido descartado em cirurgias plásticas da mama ou do abdome. Tal material é enviado ao laboratório onde se realiza a separação da epiderme para a produção de queratinócitos e à descelularização da derme com glicerol, para aposicionamento e fixação sobre as úlceras (Figura II) (Lofêgo et al., 2008). Esse tratamento tem revelado melhores resultados, principalmente quando conjugado à injeção de células tronco autógenas, retiradas da medula óssea, na borda e na base das úlceras (Lofêgo et al., 2008; Meneses et al., 2010).

Meneses et al. (2010) realizaram tratamentos com células-tronco em pacientes falciformes que apresentam úlceras colonizadas e com secreção abundante, em úlceras crônicas com mais de 4 semanas sem melhora, em úlceras em mais de uma região, bem como em úlceras recidivadas, com sucesso terapêutico.

A utilização de queratinócitos cultivados *in vitro* não tem demonstrado resultados promissores no tratamento das úlceras da doença falcêmica (Serjeant et al., 2005; Lofêgo et al., 2008; Meneses et al., 2010). O transplante isolado de queratinócitos cultivados apresenta problemas, como baixo índice de integração das células ao leito receptor, sensibilidade à infecção e, principalmente, vulnerabilidade da cobertura epitelial oferecida, pois a reconstrução da membrana basal é falha e o componente dérmico para gerar maior estabilidade estrutural ao novo tecido não está presente (Paggiaro et al., 2007).



¹**Figura I.** Aplicação das células-tronco feita de maneira aleatória, com injeções em torno da úlcera e no seu interior.



²**Figura II.** Aposição de biomaterial sobre a ferida.

Por outro lado, a terapia com GM-CSF tópico tem sido utilizada em certas morbidades, a saber: úlceras secundárias à doença falciforme, feridas cirúrgicas refratárias, úlceras de pressão e venosas crônicas, além de pioderma gangrenoso.

Para a bioengenharia, é essencial uma tríade composta por células-tronco, ou progenitoras, uma matriz que funcione como arcabouço e proteínas sinalizadoras, denominadas fatores de crescimento, como estímulo para diferenciação celular. Estudos *in vivo* demonstraram que o GM-CSF promove a cicatrização da ferida ao induzir a ativação macrofágica, proliferação de queratinócitos, diferenciação dos miofibroblastos, aumento da neovascularização e a formação de tecido de granulação (Groves et al., 2000).

Pieters et al. (1995) relataram duas aplicações tópicas e uma intralesional de GM-CSF no tratamento de úlceras de perna em três pacientes com doença falciforme (Alikhan et al., 2004). Houve o relato de uma cura de úlceras nestes pacientes, mas se concluiu que a injeção intralesional precipitou crises falciformes, fato que pode estar relacionado com o uso de GM-

¹ *Fonte: Ministério da Saúde. Doença Falciforme - Úlceras: prevenção e tratamento. Brasília, DF; 2013.*

² *Meneses, JVL et al. Úlceras maleolares em portadores de anemia falciforme: Manejo clínico e operatório. Gazeta Médica da Bahia 3 (2010).*

CSF (Pieters et al., 1995). Ainda neste estudo, o tratamento com a hidroxiureia não teve qualquer efeito sobre a evolução da úlcera. Sobre a associação entre a hidroxiureia e as úlceras da DF, no momento, está mal compreendida: alguns estudos não relatam efeito, enquanto outros estudos sugerem aumento na incidência de úlceras (Cackovic et al., 1998; Chaine et al., 2001). Mèry et al. (2004) referiram o tratamento de cinco pacientes com anemia falciforme, com catorze úlceras de perna e que tinham duração de 1 mês a 6 anos. As úlceras foram tratadas com o gotejamento de solução molgramostim, um fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos recombinante humano. A cura nesta pesquisa foi obtida em nove das catorze úlceras, sem reações adversas locais ou sistêmicas.

IV. METODOLOGIA

Foi realizada uma pesquisa na literatura nacional e internacional, de janeiro de 1983 a agosto de 2013, em três bases de dados que estão entre as mais relevantes fontes de publicações da área da saúde:

- SciELO (Scientific Eletronic Library Online) - <http://www.scielo.org/php/index.php>;
- LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) - <http://lilacs.bvsalud.org>;
- PubMed, através do endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Estudos foram realizados na Gazeta Médica da Bahia através do seguinte endereço: <http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/search>.

A pesquisa das referências teve como fundamentos:

- i. Uso de vocabulários técnico-científicos e escritos nas línguas portuguesa ou inglesa;
- ii. Estratégia de busca estruturada pelo emprego de operadores booleanos específicos da base de dados.
- iii. Busca estruturada com uso de termos análogos, segundo os descritores, nos dois idiomas considerados: a saber, na língua inglesa, na Pubmed, foram utilizados os

seguintes termos referentes à úlcera: “skin” *or* “derm” *or* “ulcer” *or* “lesion” *or* “wound” *or* “sore” *or* “canker”; para o termo células-tronco: “stem” *or* “cell therapy” e para a denominação de anemia falciforme: “sickle” *or* “SCD” *or* “falciform”.

Critérios de exclusão

Artigos não referentes à úlcera de perna, células-tronco, terapia celular, epidemiologia clínica e histórico da doença falciforme. Foram excluídos artigos não disponíveis ou repetidos para a consulta.

Critérios de inclusão

Foram selecionados e analisados os artigos científicos disponibilizados para o acesso e que se relacionaram com título deste trabalho, totalizando 53 artigos.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As úlceras de membros inferiores constituem uma importante complicação da doença falciforme. O seu tratamento é um desafio clínico constante. Em função da natureza crônica, representam um impacto devastador na qualidade de vida, nas relações profissionais e sociais do paciente com anemia falciforme (Felix et al., 2010).

O repertório terapêutico para o manejo das úlceras na DF é pouco variado e limitado. O uso da solução Molgramostim, parece ser uma terapia adequada para úlceras de perna, mas uma avaliação conclusiva dependerá de uma série maior de pacientes e de outros tipos de formulações para aplicações tópicas de GM-CSF, os quais podem ser mais eficazes no futuro (Mèry et al., 2004). Existe, pois, a necessidade de ensaios clínicos controlados para avaliar a eficácia e o custo da utilização tópica de GM-CSF em úlceras falciformes, da elevada prevalência e morbidade associada, bem com os custos envolvidos na abordagem destas úlceras, os quais variam de 210.000 a 1,7 milhão de dólares por paciente, nos Estados Unidos (Ren et al., 2012).

A terapia com células-tronco em úlceras de pacientes falciformes vem sendo adotada nos casos de ulcerações recidivantes, infeccionadas ou de difícil cicatrização, com resultados promissores. Esta terapia pode fornecer uma solução abrangente, abordando múltiplos fatores durante o processo de cicatrização, incluindo a proliferação celular, síntese de matriz extracelular, liberação de fatores de crescimento e vascularização (Li,2013). Contudo, essa possibilidade deve ser analisada com entusiasmo e prudência, visto que os mecanismos biológicos utilizados pelas MSC ainda não estão integralmente elucidados e a ciência das MSC ainda é uma saber em formação (Monteiro et al., 2010). Ensaios clínicos com estudos a longo prazo, a fim de se avaliar o êxito deste procedimento: indicações e contra-indicações específicas precisam ser determinadas baseadas na população em estudo. Além disso, parâmetros celulares devem ser prontamente estabelecidos, tal que permitam relacionar propriamente a injeção de células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea, com o sucesso da cicatrização das úlceras na DF. A obtenção das células-tronco requer laboratórios

de pesquisa, hematologistas e técnicos capacitados para coleta e separação das células apenas disponíveis, no momento, em grandes centros e hospitais (Meneses et al., 2010)

Não foram encontrados relatos sobre o uso de células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo em úlceras de perna na doença falciforme. É necessário o desenvolvimento de metodologias e procedimentos eficazes de isolamento dessas células para obtenção de culturas em quantidade e qualidade suficientes para aplicação terapêutica (Yarak et al., 2010).

Estudos mostram que as CTM-h presentes no sangue de cordão umbilical são similares às obtidas a partir de medula óssea no que diz respeito ao perfil morfológico e imunofenotípico e ao potencial de diferenciação (Senegaglia et al., 2009). Todavia, não foram encontrados relatos que utilizassem células do sangue de cordão umbilical humano (SCU-h) na terapia de úlceras de pacientes com anemia falciforme. No que tange à terapia com as células-tronco do SCU-h, citam-se, como vantagens, a ausência de risco materno–infantil referente à coleta, além da facilidade da extração celular. Como desvantagens, há necessidade de criopreservação para um possível uso futuro, bem como o número de células limitado ao volume coletado (Senegaglia et al., 2009) e dos custos acessórios relativos à coleta, processamento e estocagem. Quando comparadas com as células da medula óssea, no SCU-h há frequentemente maior relação de células-tronco por volume colhido com alta capacidade de proliferação (Zhang et al., 2006; Senegaglia et al., 2009) e as células transplantadas são menos suscetíveis à reatividade alogênica no receptor (Rocha et al., 2000; Senegaglia et al., 2009).

Não foram relatados estudos controlados e comparativos entre os diversos tipos de tratamento, incluindo a terapia com células-tronco, a fim de se determinar qual a melhor conduta para o manejo de úlceras refratárias na anemia falciforme.

Qualquer que seja a modalidade terapêutica com células-tronco em úlceras é imprescindível informar ao paciente que a possibilidade de cura depende também de sua

adesão ao regime de tratamento. São necessários vigilância e cuidado nas feridas para prevenir infecções bacterianas ou cancerização dos bordos das úlceras.

A terapia gênica é outra relevante perspectiva que merece ser estudada. Esta abordagem explora a transferência de genes de regulação das cadeias globínicas em células-tronco hematopoiéticas autólogas utilizando vetores virais transplantados. No entanto, há alguns empecilhos como ausência ou reduzida expressão do gene transplantado, excessiva expressão próximo aos locais de integração, seleção adequada de vetores de transferência gênica, entre outros (Papanikolaou et al., 2010 ; Santos et al., 2012).

A única possibilidade para a cura da AF ainda é o transplante de células-tronco hematopoiéticas de doadores de medula óssea ou de bancos públicos de sangue do cordão umbilical. Apesar desse cenário, há limitações como reduzido número de doadores compatíveis; variabilidade na severidade da doença; possibilidade de rejeições; quimerismo das células hematopoiéticas e consenso médico quanto à realização deste procedimento não reconhecido no Brasil (Gaziev et al., 2010; Santos et al., 2012). No Brasil, até o momento, vinte e um pacientes com anemia falciforme já se submeteram ao transplante de medula óssea, até então experimental, com três óbitos, não por conta do transplante, mas por complicações decorrentes da doença em estágio avançado (Toledo, 2013).

Verifica-se que a DF reflete negativamente nas atividades laborais e na qualidade de vida do paciente falciforme: sentimentos de revolta, ansiedade, depressão, comportamento agressivo e medo fazem parte do repertório associado às repetidas crises de dor e internações nos pacientes com DF (Santos et al., 1999; Naoum et al., 2004). Desta forma, o sucesso da terapêutica com células-tronco, na medida em que promove o fechamento precoce das lesões crônicas e dolorosas, exerce relevante papel psicossocial, profissional e na elevação da auto-estima do paciente falcêmico.

VI. CONCLUSÃO

1. Há escassez de recursos terapêuticos para o tratamento de úlceras refratárias em pacientes falciforme;
2. Ensaios clínicos são necessários para avaliar a eficácia, os custos e os benefícios da terapia com células-tronco em relação aos demais tratamentos; outrossim, critérios de conduta devem ser estabelecidos para o manejo de úlceras refratárias na doença falciforme;
3. Embora já se tenham alguns resultados altamente promissores, pouco se sabe a respeito dos efeitos a longo prazo destas terapêuticas;
4. A adesão do paciente ao regime de tratamento é indispensável para o bom desfecho clínico;
5. O sucesso da terapêutica com células-tronco, na medida em que promove o fechamento precoce das lesões crônicas e dolorosas, exerce relevante papel psicossocial, profissional e na elevação da auto-estima do paciente falciforme.

VII. SUMMARY

“STEM CELLS THERAPY IN LEG ULCERS AT SICKLE CELL DISEASE – A LITERATURE REVIEW”

Introduction: Leg ulcer represents an important morbidity in sickle cell disease with psychosocial repercussions and in its carrier's life. It is more prevalent in above 10-year-old male patients that are homozygous for S hemoglobin. Its presentation depends on various factors such as the vase-occlusion phenomenon, tissue hypoxia, hemolysis and genetic issues. There are limited therapeutic options for refractory ulcer cases. Stem cells therapy appears to be a promising alternative for recurrent lesions of difficult healing. **Goal:** to promote a bibliographic review about stem cells therapy for inferior members ulcers in patients with sickle cell disease. **Methodology:** an analysis of the national and international literature of the last 30 years was performed, between January 1983 and May 2013, at Gazeta Médica da Bahia and three other databases: SciELO (Scientific Eletronic Library Online), LILACS (Latin-american Literature and from Caribe in Health Sciences) and PubMed. The exclusion criteria were articles that are not related to leg ulcer, stem cells, cellular therapy, clinical epidemiology and sickle cell disease history. Unavailable or repeated articles were also excluded. On the other hand, available scientific articles related to the title of this work were selected, totalizing 53 articles. **Results and discussion:** there were few studies related to the theme. At the clinical researches only two therapeutic options using stem cells were found, a topic usage of a stimulating factor of granulocyte-macrophage colony and the usage of stem cells extracted from human bone marrow. Comparative and controlled studies between these two therapeutic options aiming to determine the best conduct in treating recurrent ulcers were not reported. **Conclusion:** Clinical trials are necessary in order to evaluate efficacy, costs and benefits of stem cells therapy in relation to other treatments; likewise, conduct criteria should be established for dealing with recurrent lesions in sickle cell disease. Success in stem cells therapy represents a relevant psychosocial, professional and self-steam role for sickle cell disease patients, given its consequent promotion of early healing of chronic and painful lesions.

Key-words: sickle cell disease; stem cells; regenerative medicine; cellular therapy; leg ulcer

VIII. REFERÊNCIAS

1. Adorno EV, Couto FD, Moura Neto JP, Menezes JF, Rego M, Reis MG, et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005; 21:292-8.
2. Alikhan, MA, Gary C, Paulette M. Topical GM-CSF hastens healing of leg ulcers in sickle cell disease. *American journal of hematology*. 2004;76.2: 192-192.
3. Banweel PE. Topical negative pressure therapy in wound care. *J Wound Care* 2: 79-84, 1999. *Hemorio*. 2009; p. 4-41.
4. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LM, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009; 31, 25-35.
5. Cackovic M, Chung C, Bolton LL, Kerstein MD. Leg ulceration in the sickle cell patient. *J Am Coll Surg*.1998;187:307–309.
6. Cançado, RD. Sickle cell disease: looking back but towards the future. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 34.3.2012; 175-177.
7. Cançado RD, Lobo C, Angulo IL, Araújo PIC, Jesus JA. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxíureia na doença falciforme. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009;31(5): 361-366.
8. Cançado RD, Jesus JA. A doença falciforme no Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2007; 29(3):204-6.

-
9. Chaine B, Neonato MG, Girot R, Aractingi S. Cutaneous adverse reactions to hydroxyurea in patients with sickle cell disease. *Arch Dermatol.* 2001;137:467–470.
 10. Costa FF. Anemia falciforme. In: Marco Antonio Zago, Roberto Passeto Falcão, Ricardo Pasquini . *Hematologia: fundamentos e prática.* Editora Atheneu, 2004. p.239.
 11. Daltro, G C, Fortuna VA, Araújo MASD, Lessa PIF, Batista Sobrinho UDA, Borojevic R. Tratamento da Osteonecrose da Cabeça Femoral com células progenitoras autólogas em anemia falciforme; Femoral Head Necrosis treatment with autologous stem cells in sickle cell disease. *Acta ortop. Bras.* 2008; 16(1), 23-27.
 12. Felix AP, Souza HM, Ribeiro SBF. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2010;32.3:203-8.
 13. Figueiredo, MS. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007; 29.3 : 215-7.
 14. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004; 116(6), 769-778.
 15. Gaziev, J., & Lucarelli, G. Hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. In *Allogeneic Stem Cell Transplantation.* 2010; (pp. 491-504). Humana Press.
 16. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi, S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science.* 2003; 116(9), 1827-1835.
 17. Groves RW, Schmidt-Lucke JA. Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care.* 2000;13:107–112.
 18. Inati A, Koussa S, Taher A, Perrine S. Sickle cell disease: new insights into pathophysiology and treatment. *Pediatr Ann.* 2008;37(5):311-21.

-
19. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(1), 204.
 20. Koshy M, Entsuah R, Koranda A, Kraus AP, Johnson R, Bellvue R, et al. Leg ulcer in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989;74(4):1403.
 21. Li Q. Stem cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: where do we stand?. *BioMed research international*; 2013
 22. Lofêgo FJA, Pascarelli BMO, Souza PRC, Oliveira LF, Silva MAL, Takyia CM, Borojevic R. Aplicação de substituto de pele em oncologia cutânea: estudo experimental com derme acelular e ceratinócitos cultivados. *An Bras Dermatol*. 2008; 83: 25- 31.
 23. Martin, P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997; v.276, p.75-81.
 24. Matos AGS, Blanck M, Ferreira SS. Diretrizes para a conduta de enfermagem à pessoa com úlcera de perna como complicação da anemia falciforme. In: *Manual de Anemia Falciforme*. Salvador: 2009.
 25. Meirelles, LS, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; v.26, p.2287-2299.
 26. Meneses, JV L., Igor LF R, Guedes A, Fortuna VA, Sadigursky D, Daltro G et al. Úlceras maleolares em portadores de anemia falciforme: Manejo clínico e operatório. *Gazeta Médica da Bahia* 3, 2010.
 27. Méry, L., Girot, R., & Aractingi, S. E. L. Topical effectiveness of molgramostim (GM-CSF) in sickle cell leg ulcers. *Dermatology*, 2004; 208(2), 135-137.

-
28. Ministério da Saúde. Doença Falciforme - Úlceras: prevenção e tratamento. Brasília, DF; 2013.
 29. Monteiro BS, Argolo N, Napoleão M, Del Carlo RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc. Rural*, Santa Maria. 2010; v. 40, n. 1.
 30. Morris CR. Vascular risk assessment in patients with sickle cell disease. *Haematologica*. 2011;96 (1):1-5.
 31. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; 132(4), 598-611.
 32. Naoum PC, Naoum FA. Doença das células falciformes. 1ª ed. São Paulo: Savier; 2004.
 33. Neto GCG, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol Med Lab*. 2003; 39(1):51-3
 34. Paggiaro AO, Isaac C, Bariani G, Mathor M, Herson MR, Ferreira MC. Construção de equivalente dermo-epidérmico in vitro. *Rev Soc Bras Cir Plást*. 2007; 22(3):153-7.
 35. Paladino, SF. Úlcera de membros inferiores na anemia falciforme; Leg ulcers in sickle cell disease." *Rev. bras. hematol. Hemoter*. 2008; 29.3: 288-290.
 36. Papanikolaou, E, P Anagnou, N. Major challenges for gene therapy of thalassemia and sickle cell disease. *Current gene therapy*. 2010; 10(5), 404-412.
 37. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. *Stem Cells*. 2007; v.25, p.2896-2902.

-
38. Pieters RC, Rojer RA, Saleh AW, Saleh AE, Dults AJ. Molgrastim to treat SS sickle cell leg ulcers. *Lancet*. 1995;345:528.
39. Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia - A 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine*. 2005;84(6):363.
40. Reindorf CA, Walker-Jones D, Adekile AD, Lawal O, Oluwole SF. Rapid healing of sickle cell leg ulcers treated with collagen dressing. *J Natl Med Assoc*. 1989; 81: 866-868.
41. Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem cells translational medicine*. 2012: 1(1), 51-58.
42. Rocha HHG. Úlceras de perna na Anemia falciforme. In: *Anemia Falciforme*. Rio de Janeiro: Rubio. 2004; p. 245-251.
43. Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*. 2000; 342(25):1846-54.
44. Santos, JL; CHIN, CM. Anemia falciforme: desafios e avanços na busca de novos fármacos. *Quím. Nova*, São Paulo. 2012; v. 35, n. 4.
45. Santos ARR, Miyazaki MCO. Grupo de sala de espera em ambulatório de doença falciforme. *Rev Bras Ter Comport Cogn*. 1999;1(1):41-8.
46. Sakar PK, Ballantyne S. Management of leg ulcers. *Postgrad Med J*. 2000; 76: 674-682.

-
47. Senegaglia AC, Rebelatto CL, Suss PH, Brofman PR. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical humano. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São Paulo. 2009; 31, 9-14.
48. Serjeant GR, Serjeant BE, Mohan JS, Clare A. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2005; 19: 943:956.
49. Toledo, K. Agência de notícias da Fundação de Amparo à pesquisa de São Paulo [<http://www.agencia.fapesp.br/>]. USP e universidade francesa criam consórcio para pesquisar anemia falciforme [Acesso em 20 jun 2013]. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/17408>
50. Trent JE, Kirsner RS. Leg ulcer in sickle cell disease. *Advances in Skin & Wound Care*. 2004;17(8):410.
51. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury*. 2006; 37(1), S5-S12.
52. Yarak, S; Okamoto, OK. Células-tronco derivadas de Tecido adiposo Humano: Desafios atuais e Perspectivas Clínicas. *Uma. Bras. Dermatol*. 2010, v 85, n. 5.
53. Zhang L, Yang R, Han ZC. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularization. *Eur J Haematol*. 2006; 76 (1):1-8.