



Implantação de banco de pele congelada a -4 °C para aplicação como curativo biológico⁽¹⁾

(Implantation of bank of frozen skin -4 °C for application as biological dressing)

"Artigo Científico/Scientific Article"

PFBA Lemos^{A(*)}, MCOOC Coelho^B, VLC Monteiro^A,
EO Costa Neto^A, LSS Andrade^B

^AMédica (o) Veterinária (o) Autônoma (o). Rua Estevão de Sá, nº346, Cidade Universitária, 50740 270, Recife-PE, Brasil.

^BSetor de Cirurgia Experimental da Área de Clínica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171 - 900 Recife-PE/Brasil.

Resumo

O estudo visa avaliar a viabilidade da pele de cão congelada a -4°C através de análises macroscópicas, bacteriológicas e histopatológicas com o intuito de formar um banco de pele como suporte para as plastias cutâneas. Os fragmentos foram avaliados no momento da coleta (T₀) e aos 15, 30 e 45 dias após o descongelamento. Macroscopicamente observou-se alteração no odor, o qual se mostrou levemente adocicado. Na avaliação bacteriológica verificou-se a presença de Staphylococcus sp. e Bacillus sp. apenas no T₀, enquanto que na avaliação histopatológica a estrutura da pele e o arranjo do colágeno mantiveram-se íntegros. Conclui-se que a pele de cão congelada a -4°C é um método viável para formação de um banco de pele.

Palavras-chave: cães, curativo, glicerol, plastia cutânea.

Abstract

The study aims to evaluate the viability of dog skin frozen at -4 °C by macroscopic, bacteriological and histopathological analysis intending to build a skin bank for supporting of cutaneous plasty. The fragments were analyzed at the moment of collection (T₀) and on days 15, 30 and 45 after freezing. Macroscopically it was observed change in odor which showed to be slightly sweet. In the bacteriological evaluation it was observed the presence of Staphylococcus sp. and Bacillus sp. only in T₀, while in the histopathological evaluation the skin structure and the collagen arrangement were maintained intact. It can be concluded that dog skin frozen at -4 °C is a viable technique for building a skin bank.

Key-words: dog, dressing, glycerol, cutaneous plastic.

Introdução

A pele, que recobre a totalidade da superfície externa do corpo do animal, é o maior órgão, atingindo 16% de seu peso. Por encontrar-se em contato direto com o meio está exposta a traumatismos que causam soluções de continuidade, resultando em

perdas teciduais. As queimaduras, os atropelamentos e deiscências são algumas causas dessas perdas, necessitando da intervenção do médico veterinário para restituição de sua integridade funcional. Devido a este fato, torna-se importante a formação de um banco de pele, constituindo

⁽¹⁾Trabalho extraído da Dissertação de Mestrado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autora para correspondência/Corresponding author (mcooc@yahoo.com).

um elemento essencial em seu uso clínico e cirúrgico na rotina de feridas (BOROJERIC e SERRICELLA, 1999; BIRCHARD e SMEAK, 2000).

Os bancos de pele, de ossos e de membranas biológicas têm sido desenvolvidos, na medicina veterinária, com o intuito de serem utilizados em cirurgias reparadoras por serem de baixo custo, praticidade de aquisição e conservação (MENEZES, 2001).

Geralmente, os doadores são animais que, em decorrência de acidentes traumáticos ou anestésicos, vieram a óbito. Informações sobre o histórico médico e as circunstâncias do óbito são importantes para a escolha, visto que animais que morrem com doenças infecto-contagiosas são descartados (FRIEDLAENDER, 1987).

A pele, as membranas biológicas e o osso podem ser preservados por refrigeração com ou sem antibiótico, por congelação utilizando-se crioprotetor, por liofilização, por agentes químicos, como álcool, iodo, soluções mercuriais, betapropiolactano, glutaraldeído, esterilização pelo óxido de etileno e através da imersão em glicerina a 98% (FRIEDLAENDER, 1987; PINTO JÚNIOR et al., 1990; COSTA et al., 1996; BRAVO et al., 2000; RAISER et al., 2001). A criopreservação a seco de enxertos permite fácil armazenagem por período ilimitado, sendo a principal desvantagem o alto custo do procedimento (VÁMHIDY et al., 1990).

Webster (1944) foi o primeiro a relatar o uso clínico de enxertos cutâneos refrigerados por períodos de tempo consideráveis. O período máximo de armazenamento foi de 21 dias para enxertos viáveis.

O glicerol tem a propriedade de proteger as células, provavelmente, pela inibição da desnaturação lipoprotéica e modificação da pressão osmótica (JONCK, 1981; PINTO JR et al., 1990). Tem sido muito utilizado na medicina veterinária para conservação de diferentes materiais biológicos por ser um método simples e de baixo custo, não exigindo equipamentos específicos.

Quimicamente é um álcool triídrico simples que se apresenta na forma líquida, incolor, viscoso, de gosto adocicado e leve odor característico (SWINYARD, 1975). Tem poder fixador e desidratante rápido, dotado de propriedades anti-sépticas com amplo espectro de ação (PIGOSSI, 1967; ALVARENGA, 1992; MENEZES et al., 2002), além de substituir a maior parte da água intracelular, entretanto, sem acelerar a concentração iônica das células, protegendo sua integridade (RAISER et al., 2001).

Pigossi (1967) cita que a glicerina reduz a antigenicidade e preserva a textura da dura-máter canina e humana. Para que o tecido perca a capacidade de estimular a antigenicidade, o tempo de conservação deve ser no mínimo de 30 dias (SARTORI FILHO et al., 1997; COSTA NETO et al., 2000)

As análises microbiológicas da pele de cadáver conservada em glicerol 85% mostraram que as espécies de bactérias mais comumente detectadas foram *Staphylococcus epidermidis* e a forma esporulada do *Bacillus* sp. (VAN BAARE et al., 1998). Costa Neto et al. (2000) estudaram a ação antimicrobiana da glicerina a 98% empregada na conservação de ligamento nugal de bovinos, e verificaram que todos os microrganismos foram susceptíveis ao efeito bactericida da glicerina exceto na forma esporulada do *Bacillus cereus*.

Em vista do exposto e por ser freqüente os acidentes envolvendo os animais domésticos que acarretam em feridas cutâneas este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de um banco de pele congelada a -4°C, através de análises macroscópica, bacteriológica e histopatológica.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

A pele foi obtida de quatro cães machos, adultos, sem raça definida, de porte médio, submetidos à eutanásia devido a trauma irreversível da coluna vertebral, porém, sem nenhum sinal clínico de

enfermidade. Os 30 fragmentos cutâneos foram coletados na região torácica lateral direita e esquerda, até no máximo seis horas após o óbito. A coleta foi realizada seguindo as técnicas de antisepsias (SLATTER, 1993).

Os animais doadores foram encaminhados para o bloco cirúrgico e submetidos a todos os procedimentos de rotina, que constou de tricotomia ampla das áreas doadoras, anti-sepsia da região com álcool (*Álcool etílico, LAFEPE - Recife-PE/Brasil*), clorexidina a 2% (*Riohex 2%, Rioquímica - São José do Rio Preto-SP/Brasil*) e em seguida com álcool a 70°, colocação dos panos de campo, com posterior procedimento de exérese dos fragmentos cutâneos com auxílio de lâmina de bisturi, tesoura e pinça de dissecação sem dente.

Imediatamente após a coleta, os fragmentos foram lavados abundantemente em solução fisiológica (*Cloreto de Sódio 0,9%, LAFEPE - Recife-PE/Brasil*), seguida de lavagem com clorexidina a 2% e nova lavagem com solução fisiológica. A tela subcutânea, aderida à pele, foi retirada através de dissecação com auxílio de pinça e tesoura.

Os fragmentos de pele foram medidos com auxílio de paquímetro e colocados em frascos de vidro previamente autoclavados, contendo solução fisiológica e glicerol (*Glicerol, Dinâmica - São Paulo-SP/Brasil*) a 20% onde foram armazenados no freezer a temperatura de -4 °C.

O processo de conservação foi avaliado através dos exames macroscópico, bacteriológico e histopatológico da pele no momento da coleta (T₀) e aos 15 (T₁₅), 30 (T₃₀), e 45 (T₄₅) dias após o descongelamento. As análises foram realizadas imediatamente após o descongelamento, o qual foi efetuado em banho-maria a 38 °C.

As avaliações macroscópicas foram feitas observando-se a coloração, odor, consistência e retração da pele.

O exame bacteriológico, antes do congelamento, para análise bacteriológica, foi realizado a partir de amostras através da coleta de material da pele antes do congelamento e do meio onde a pele foi conservada após o

descongelamento com auxílio de *swabs*. O material foi encaminhado ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas do DMV da UFRPE, semeado em placas de *Petri*, contendo ágar sangue e incubados em estufa bacteriológica à 37°C, durante 24 horas. As bactérias foram classificadas através dos aspectos morfológicos de colônias e morfotintórias ao Gram (CARTER, 1988).

Para realizar a avaliação histopatológica, fragmentos de peles foram escolhidos aleatoriamente antes e após o descongelamento, fixado em solução de formalina a 10%, incluído em parafina, cortado com micrótomo manual para obtenção de cortes com cinco micras de espessura, corado pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e examinados pelo microscópio óptico de luz.

Resultados e Discussão

A opção por utilizar cães da rotina hospitalar, que seriam submetidos à eutanásia, deve-se ao fato de não justificar o sacrifício de animais apenas para a coleta de fragmentos de pele para formação de um banco de pele. Se da mesma forma que é inviável realizar coleta de animais hígidos por existirem diversas substâncias no mercado e procedimentos para o tratamento de feridas, como citado por Coelho et al. (1999), Ribeiro e Schumidt (2000) e Monteiro et al. (2001).

Para a formação do banco de pele foram utilizados quatro cães, machos, adultos, sem raça definida e de porte médio, obtendo 30 fragmentos.

Apesar da coleta ter sido asséptica, como recomendado por Pinto Júnior et al. (1995), Melo et al. (1998) e Menezes et al. (2002), no momento da coleta, foi observado em 100% das amostras analisadas a presença de *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. Segundo Slatter (1993), a microflora endógena do organismo é normalmente a maior fonte de contaminação de feridas cirúrgicas, visto que a pele é composta por bactérias residentes e transitórias. O *Staphylococcus* apesar de pertencer à flora residente, é a bactéria mais importante da pele canina, haja vista que pode tornar-se patógena quando presente no leito da

ferida. Tais resultados podem decorrer do curto intervalo de tempo entre a aplicação da clorexidina e o momento da coleta através de *swab*, o que, provavelmente, não permitiu a ação antisséptica do mesmo no material cutâneo coletado.

O processo de lavagem com soro fisiológico, seguida de lavagem com clorexidina a 2% e nova lavagem com soro fisiológico dos fragmentos cutâneos que compuseram o banco de pele, foram executados com o intuito de retirar-se qualquer resíduo da clorexidina e diminuir a possível contaminação bacteriana da pele, como recomendado por Menezes et al. (2002).

Em relação ao meio de conservação, a solução fisiológica e glicerol a 20%, mostrou-se ser viável pela facilidade no preparo da solução, mantendo as características físicas da pele, apresentando também fácil obtenção e baixo custo. O armazenamento a -4°C mostrou

ser viável pelo fato de não necessitar de aparelhos sofisticados, e sim, apenas de um freezer doméstico, tendo apenas como pontos negativos à ocupação de espaço pelo equipamento, demanda de energia e vulnerabilidade à possível falta de energia elétrica, o que poderia comprometer o material estocado, tornando o seu uso inviável. O tempo de descongelamento variou entre 8 e 10 minutos, a quantidade era igual para todos os frascos, porém, o que variou foi o tamanho dos frascos e dos fragmentos de pele.

Na avaliação macroscópica, conforme Tabela 1, no dia da coleta (T_0), as peles dos doadores eram de coloração branca, preta e malhada; consistência maleável e elástica. Observou-se a presença de retração que ocorreu devido ao fato da área doadora possuir uma derme espessa, composta por fibras, que favorece a retração primária. Quanto ao odor, apresentou-se *sui generis*.

Tabela 1 - Avaliação macroscópica dos fragmentos cutâneos no momento anterior ao congelamento (T_0) e com 15 (T_{15}), 30 (T_{30}) e 45 (T_{45}) dias após.

Parâmetros de avaliação	T_0	T_{15}	T_{30}	T_{45}
Cor	Branca, preta, malhada	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Odor	<i>Sui generis</i>	Adocicado	Adocicado	Adocicado
Consistência	Maleável	Sem alteração	Sem alteração	Sem alteração
Elasticidade	Presente	Presente	Presente	Presente

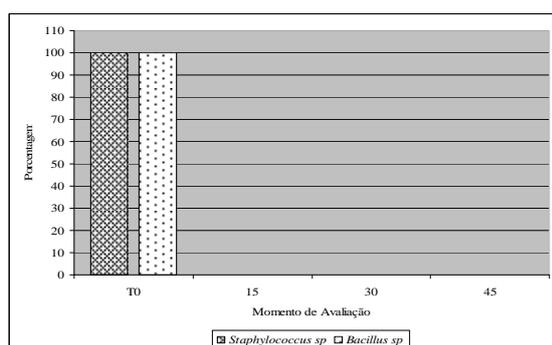


Figura 1 – Frequência da *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. isolados de fragmentos cutâneos em diferentes momentos de avaliação do banco de pele.

Nas avaliações após o congelamento, a coloração e a consistência permaneceram

inalterados, contudo, o odor apresentou-se levemente adocicado, fato que também foi observado por Menezes et al. (2002), que relata que tal fato ocorre, provavelmente, devido à incorporação do glicerol e sua impregnação a pele após a conservação. Em relação à avaliação bacteriológica não foi observada em nenhum dos momentos a presença de bactérias nas amostras analisadas, possivelmente pelo poder antisséptico de amplo espectro de ação do glicerol e pelo efeito residual da clorexidina (Figura 1).

Na avaliação histopatológica dos fragmentos cutâneos observou-se a manutenção do tecido, a integridade, organização das estruturas da pele e seus anexos, bem como do arranjo do colágeno do

tecido frouxo e denso, não se verificando alterações compatíveis com degeneração.

Conclusões

A técnica de conservação estudada permite manter a estrutura organizacional da pele, o que viabiliza o seu emprego na formação de um banco de pele.

A solução fisiológica com glicerol inibe o crescimento de *Staphylococcus* sp. e *Bacillus* sp. nas amostras de pele a partir de 15 dias de conservação.

Referências

- ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas em cirurgia. In: DALECK, C.E.; BAPTISTA, L.C.; MUKAI, L.S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. p.33-43.
- BIRCHARD, S.J.; SMEAK, D.D. **Clínica de Pequenos Animais**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p.409-416.
- BLOOMBERG, N.S. et al. Frozen diaphyseal bone allografts combined with external and internal pin splintage in small animal ortopedic surgery. **Journal American Animal Hospital Association**, v.20, p.393-402, 1984.
- BOROJERIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.7, p.16-18, 1999.
- BRAVO, D. et al. Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. **Burns**, v.26, p.367-378, 2000.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. 249p.
- COELHO, J.C.U. et al. Avaliações de anti-sépticos empregados na degermação pré-operatória das mãos. **Folha médica (BR)**, v.86, n.4, p.225-254, 1983.
- COELHO, M.C.O. et al. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p.297-303, 1999.
- COSTA NETO, J.M. et al. Ação microbiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo-povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 2000, Goiana. **Anais...** Goiania: Sociedade Brasileira de Cirurgia Veterinária, 2000. 1 CD-ROM.
- COSTA, R.F.B. et al. Arterioplastia com enxerto de pericárdio bovino. Estudo experimental em cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.12, n.2, p.111-117, 1996.
- FRIEDLAENDER, G.E. Bone banking - Support of reconstructive surgery of the hip. **Clinical Orthopedics and Related Research**. n.225, p.17-21, 1987.
- HART, M.M. et al. Bone banking: A cost affective method for establishing community. Hospital Bone Bank. **Clinical Orthopedics Archives Research**, n.206, p.295-300, 1984.
- JONCK, L.M. Allogenic Bone Tranplantation: Review of the status of allogenic bone bank. **South African Medical Journal**, v.60, p.428-433, 1981.
- KERWIN, S.C. et al. Bone grafting and banking. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.13, n.10, p.1558-1563, 1991.
- MELO, E.G. et al. Aloenxerto ósseo cortical: Avaliação do seu emprego em tibia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.50, n.4, p.385-394, 1998.
- MENEZES, F.F. **Curativo temporário de pele conservada em glicerol 98% em feridas cutâneas de cães (*Canis familiaris*)**. Recife, 2001. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).
- MENEZES, F.F. et al. Banco de pele: coleta, conservação em glicerol 98% e manutenção. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, n.1, 2002.
- MONTEIRO, V.L.C. et al. Antissepsia de pele de cães utilizando-se chlorhexidina a 0,2%, povidine a 10% e álcool iodado a 5%. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.7-12, 2001.
- OLDS, R.B. Bone grafting. In: BOJRAB, M.J. **Patophysiology Animal Surgery**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1981. p.797-802.
- PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter**. São Paulo, 1967. 36f. Tese (Livro-Docência) – Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.
- PINTO JR., H.S. **Utilização de enxertos ósseos homólogos preservados na reparação de**

- fraturas cominutivas de ossos longos.** São Paulo, 1990. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- PINTO JÚNIOR, H.S. et al. Banco de ossos: coleta, preservação e implante em cães. **A Hora Veterinária**, ano15, n.87, p.33-37, 1995.
- RAISER, A.G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães. Conservação, **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.89-94, 2001.
- RIBEIRO, M.G.; SCHUMIDT, E.M.S. Relato do uso de cicatrizante à base de sulfadiazina de prata 1% micronizada em equino. **Arquivo Ciência Veterinária Zoológica UNIPAR**, v.3, n.2, 2000.
- SARTORI FILHO, R. et al. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, v.9, p.69-77, 1997.
- SCHENA, C.J. et al. Segmental freeze-dried and freshcortical allografts in the canine femur. I. A sequential radiographic comparison over a one year time interval. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.20, p.911-925, 1984.
- SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ed. Manole, 1993, v.1, p.323-420.
- SWINYARD, E.A. Surface-acting drugs. In: GOODMAN, E.; GILMAN, A. **The pharmacological basis of therapeutics**. 5ed. New York: Macmillan Publications, 1975. p.946-959.
- TOMFORD, W.W. et al. Methods of banking bone and cartilage for allograft transplantation. **Orthopedic Clinics of North American**, v.18, n.2, p.241-247, 1987.
- VÁMHIDY, L. et al. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a review. **Acta chirurgica Hungarica**, v.31, n.3, p.209-215, 1990.
- VAN BAARE, J. et al. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. **Transplantation**, v.65, n.7, p.966-970, 1998.
- WEBSTER, J. P. Refrigerated skin grafts. **Annals Surgery**, n.120, p.421, 1944.
- WILSON, J.W. et al. Vascularization of cancellous chip bone grafts. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.1691-1699, 1985.