

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

ERNESTO RODRÍGUEZ-SALAS

AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA, MORFOMÉTRICA E DE CARACTERÍSTICAS
BIOMECÂNICAS DAS MEMBRANAS PERICÁRDICAS BOVINAS SUBMETIDAS A
UM NOVO MEIO DE CONSERVAÇÃO (ERS®-04-09-11-16-21)

TESE DE DOUTORADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Veterinária da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como requisito final para
obtenção do título de Doutor em Ciência Veteri-
rinária.

Orientador: Prof. (a) Dra. Maria Cristina de Oliveira
Cardoso Coelho.

RECIFE-PE

Janeiro-2006

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S161n Rodríguez- Salas, Ernesto
Avaliação histomorfológica, morfométrica e de características biomecânicas das membranas pericárdicas bovinas submetidas a um novo meio de conservação (ERS®-04-09-11-16-21)/ Ernesto Rodríguez-Salas. 2006.
93 f. : il.

Orientador: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.208 97

1. Membrana biológica
2. Conservação
3. Antibiótico
4. Fibroblasto
- I. Coelho, Maria Cristina de Oliveira Cardoso
- II. Título

DEDICO

Aos meus pais Ernesto e Rosa Elvira e sogra Wolythz (*in memorian*).

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À minha esposa Doutora Rosangela França Maia de Rodríguez, pela compreensão, carinho, opiniões, ajuda, preocupações compartilhadas e estímulo permanente para alcançar estes resultados.

Aos meus filhos Doutores Licenio Ernesto, Alessandra Maria e Yajaida Maria que sempre acreditaram nos resultados encontrados. Agradeço a eles também pela ajuda, compreensão, estímulo, carinho e discussões sobre o tema tratado.

“Vocês são o sentido da minha vida!”

AGRADECIMENTOS

À “DEUS”, criador da vida, fonte de todo o conhecimento e inspiração.

Ao Professor Dr. Roberto Soares de Castro, pela aceitação, como orientador *Pró-tempore*, atenções, amizade e apoio dispensados durante todo o curso.

À Professora Dr. (a) Maria Cristina Cardoso de Oliveira Coelho, pela orientação, ensinamentos, atenção, amizade, compreensão e confiança em mim depositada.

À Professora Dr. (a) Ana Lucia Porto pela co-orientação, ensinamentos, amizade e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Professor Dr. Valdomiro Júnior da Silva, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e sugestões, sempre me fortalecendo nos momentos de dificuldades, para alcançar o êxito nos trabalhos.

À minha esposa e filhos, Doutores: Rosângela França Maia de Rodríguez, Licenio Ernesto Rodríguez Maia, Alessandra Maria Rodríguez Maia e Yajaida Maria Rodríguez Maia, pelo apoio, encorajamento, discussões sobre o assunto abordado, compreensão, carinho, e estímulo permanente dispensados principalmente nos momentos difíceis enfrentados durante minha permanência sem eles, na realização do curso.

À meu amigo e colega Dr. Dimas Assis Bandeira, “irmão de vidas passadas”, companheiro de todas as horas, colaborador deste trabalho, nas discussões do assunto, que apesar da longe moradia, deslocou-se em várias oportunidades até esta cidade para auxiliarme na digitação, confidente das dificuldades por ocasião de estar longe de minha família, quem me acolheu com braços abertos, e com quem compartilhei preocupações, alegrias, doença, tristeza e luz. A força divina foi responsável por esse encontro. Mesmo morando distante de Recife, sempre esteve presente, através do telefone e visitas. “*Eternamente grato mano*”.

À colega e companheira de grupo de trabalho durante a realização deste curso, Dra. Carminha Batista, “amiga de todas as horas”, pelo carinho e amizade brindada e opiniões avalizadas, bem como pela colaboração com trabalhos a mim encaminhados para suporte da discussão deste trabalho que utilizou antibióticos no novo meio proposto. “Minha eterna gratidão”.

À Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais pela formação acadêmica que me forneceu a base necessária para a iniciação no âmbito da pesquisa.

À Universidade Federal do Acre (UFAC) na pessoa do Magnífico Reitor Dr. Jonas de Sousa Pereira Filho e Dr. Alceu Ranzi, Pro-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação pelo apoio no ano de minha saída de Rio Branco para iniciar o doutorado.

Ao LIKA, por proporcionar-me a infra-estrutura para realização dos procedimentos bacteriológicos.

Ao Professor Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó, pela colaboração na identificação dos fungos e encorajamento na obtenção dos resultados encontrados.

À Professora Dra. Cristina Peixoto pelas avaliações das MPBs através da microscopia eletrônica.

Ao Professor Dr. Henrique Jorge de Freitas, amigo de todas as horas, pelo apoio às aulas das minhas disciplinas por ele ministradas durante minha ausência, e solidariedade para que tudo desse certo. “Minha gratidão amigo”.

À Coordenadoria de Apoio à Pós-graduação da UFAC e a seus funcionários, pela consideração e tratamento dado durante minha ausência dessa IFES, para realização deste curso.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter-me permitido a realização desta pós-graduação e a CAPES pelo fornecimento da bolsa.

Às Professoras Dras. Eneida Willcox Rego e Glória Potier, pela amizade, compreensão e encorajamento nos momentos de dificuldades no decorrer desta investigação.

Ao Professor Frederico Celso Lyra Maia, pela amizade, consideração e opiniões nas discussões sobre aspectos patológicos do trabalho, sempre torcendo para que tudo desse certo.

Aos Professores Drs. Marcos Lemos Oliveira, Fabrício Bezerra de Sá, Joaquim Evêncio Neto, Maria Aparecida da Gloria Faustino, Leucio Câmara Alves, Rinaldo Aparecido Mota, Eduardo Coli, Leonildo Bento Galiza da Silva, Lúcio Esmeraldo Honório de Melo, Fernando Leandro dos Santos, pela consideração, consultas e amizade, sempre me estimulando no decorrer dos trabalhos para alcançar os resultados encontrados.

Ao Professor Sérgio Alves do Nascimento, pela cessão das unidades laboratoriais utilizadas nos procedimentos de preparação do meio e sugestões e opiniões no decorrer do trabalho.

Ao Dr. Genivaldo Miranda, Médico Veterinário, inspetor fiscal Agropecuário da Secretaria de Produção Rural do Estado de Pernambuco, que muito gentilmente me acolheu nessa unidade de matança, fornecendo-me todas as membranas pericárdicas, objeto de estudo no presente trabalho.

Aos colegas de curso, Flávia Menezes, Júlio Rodrigues e Éricka Albuquerque, pelo auxílio no trabalho de campo, que nos momentos de dificuldades e doença, estiveram do meu lado. “Minha gratidão”.

Aos colegas Dr. Gustavo Henrique Gouveia C. G. de Melo e Vandilson Rodrigues, pela consideração e tratamento dispensado durante a realização deste trabalho, sempre torcendo pelo nosso êxito.

À secretária do curso de Pós-Graduação, amiga Edna Cheria, minha procuradora no processo de inscrição para ingresso no curso de doutorado desta IFES, meu eterno agradecimento pela preocupação, consideração e amizade.

À Lana Cláudia Barros Bezerra e a Flávia Lins Acioly, secretárias do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, que sempre com muita consideração nos atenderam.

À Dona Waldertrudes P. Jansen, bibliotecária da UFRPE, pelas orientações na indexação dos trabalhos e Ana Karina pela grande colaboração na aquisição de informações de revistas, periódicos e trabalhos recebidos via COMUT. “Eternamente grato”.

Aos colegas Fábio Brito, José Bezerra, Mayra Bezerra, Juliano, Vanda Monteiro, Lílian Sabrina, Ricardo Chiorato pela amizade e estímulo para o êxito alcançado.

Às funcionárias do Hospital Veterinário da UFRPE, Vera, Josie e Ilma, pelo apoio nos trabalhos de esterilização de todo o material utilizado na pesquisa, que sempre com paciência e carinho me trataram. “Minha eterna gratidão”.

A todo o pessoal administrativo do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco, que me receberam de braços abertos e trataram brindando-me sempre com muito carinho durante minha permanência nesta unidade hospitalar. “Eternamente grato”.

Ao Professor Dr. Francisco Glauco de Araújo Santos (UFAC), pelas orientações no tratamento da Membrana Pericárdica Bovina (MPB) destinada a estudos de Microscopia Eletrônica.

A Rui Santana de Menezes (Diretor) e Cydia Furtado (técnica) da Unidade de Tecnologia de Alimentos da UFAC, pela sessão da Unidade de Tecnologia de Alimentos (UTAL) e preparação das soluções para tratamento da MPB para estudos de Microscopia Eletrônica.

SUMÁRIO

Dedicatória	4
Dedicatória Especial	5
Agradecimentos	6
Sumário	10
Lista de figuras	12
Lista de tabelas	14
Resumo	16
Abstract	18
1 Introdução	19
2 Revisão de literatura	21
3 Referências bibliográficas	32
4 Determinação da concentração mínima inibitória dos antibióticos benzilpenicilina, aminoglicosídeo e poliênico em um novo meio de conservação da Membrana Pericárdica Bovina (MPB)	39
Resumo	39
Abstract	40
4.1 Introdução	41
4.2 Material e métodos	42
4.3 Resultados e Discussão	46
4.4 Conclusão	52
4.5 Referências bibliográficas	53
5 Avaliação histopatológica e morfométrica da membrana pericárdica bovina (MPB) conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21 destinada a cirurgias reparadoras.	56
Resumo	56
Abstract	57
5.1 Introdução	58
5.2 Material e métodos	60
5.3 Resultados e Discussão	62
5.4 Conclusão	72
5.5 Referências bibliográficas	73
6. Avaliação biomecânica da membrana pericárdica bovina (MPB) conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.	76
Resumo	76

Abstract	11
6.1 Introdução	77
6.2 Material e métodos	78
6.3 Resultados e Discussão	80
6.4 Conclusão	82
6.5 Referências bibliográficas	89
	90

LISTA DE FIGURAS

Determinação da concentração mínima inibitória dos antibióticos benzilpenicilínico, aminoglicosídeo e poliênico em um novo meio de conservação da membrana pericárdica bovina (MPB)	22
Figura 1 Resultados das inoculações dos frascos contendo as MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21 em tubos contendo o meio de cultura BHI, atendendo os tempos da pesquisa. Observar transparência do meio.	31
Figura 2 Resultados da inoculação em placas de Petri contendo o meio Àgar Sangue. Observar ausência de crescimento bacteriano.	31
Figura 3 Resultado das sementeiras dos frascos contendo as MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21 em placas de Petri contendo o meio Agar <i>Sabouraud</i> . Observar ausência de crescimento de fungos.	31
Figura 4 Observar transparência do meio ERS®-04-09-11-16-21 e as características macroscópicas das MPBs nos tempos do estudo.	31
Figura 5 Efeito sinérgico das concentrações de antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21	33
Avaliação histomorfológica e morfométrica da Membrana Pericárdica Bovina (MPB) conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21 destinada a cirurgias reparadoras	39
Figura 1 Figura 1. MPB em T-0. Figura 1a Notar fibras colágenas paralelas (setas curtas), fibroblastos (seta larga) e capilar (C). 1000x. Figura 1b. MPB em T-30. Fibras colágenas espaçadas (setas curtas) e fibroblastos associados (seta larga). 1000x.	46
Figura 2 Figura 2. Membrana pericárdica bovina (MPB). Figura 2a. MPB em T-30. Fibras colágenas espaçadas (setas curtas) e fibroblastos associados (seta larga). 1000x. Fotomicrografia eletrônica da Membrana pericárdica bovina (MPB). Figura 2b. Fibras colágenas com manutenção arranjo paralelo típico de tecido conjuntivo frouxo (setas curtas) 7.000X. Figura 2c. Fibroblastos picnóticos (seta larga) 12.000X.	47

Figura 3	Figura 3. Membrana pericárdica bovina (MPB). Figura 3a. MPB em T-60. Observar espaçamento (E) entre as fibras colágenas (Fc) e fibroblastos vacuolizados associados (seta). 1000x; Figura 3b. Notar fibras colágenas paralelas (setas curtas) em cortes longitudinais 20.000X. Figura 3c. Observe fibroblasto necrótico (seta longa) e desarranjo de fibras colágenas em corte transversal (seta curtas) 7.000X.	49
Figura 4	Figura 4. Membrana pericárdica bovina (MPB). Figura 4a. MPB em T-90. Detalhe de Fibroblasto vacuolizado (setas) associado às fibras colágenas (Fc). 1.000x. Figura 4b. Observe espaçamento entre as fibras colágenas (setas largas), fibras elásticas (setas curtas). 4.400x. Figura 4c. Fibroblastos picnóticos (setas largas) 4.400x.	50
Figura 5	Efeito do tempo sobre a área membranas pericárdicas bovinas conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21	54
Figura 6	Efeito do tempo sobre o peso membranas pericárdicas bovinas conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21	54
Figura 7	Efeito do tempo sobre a espessura física da MPB.	55
	Avaliação Biomecânica da Membrana Pericárdica Bovina (MPB) conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.	62
Figura 1	Dinamômetro computarizado	67
Figura 2	Efeito do tempo sobre a espessura da MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.	71
Figura 3	Efeito do tempo sobre a força máxima a que foi submetida à MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.	72
Figura 4	Efeito do tempo sobre a tensão a que foi submetida à MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.	73

LISTA DE TABELAS

Determinação da concentração mínima inibitória dos antibióticos benzilpenicilínico, aminoglicosídeo e poliênico em um novo meio de conservação da membrana pericárdica bovina (MPB)	21
Tabela 1 Composição do meio líquido ERS®-04-09-11-16-21	26
Tabela 2 Agrupamento de concentrações dos antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21	27
Tabela 3 Concentrações das diferentes associações de antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21	28
Tabela 4 Resultados de testes microbiológicos de acordo com as concentrações de antimicrobianos	32
Avaliação histomorfológica e morfométrica da Membrana Pericárdica Bovina (MPB) conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21 destinada a cirurgias reparadoras	39
Tabela 1 Volumes finais, absorção e percentual do meio ERS®-04-09-11-16-21 absorvido pela membrana conforme os tempos de estudo	52
Tabela 2 Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados Médios – QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - (CV) para as variáveis físicas: peso, área e espessura das MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21	53
Tabela 3 Valores médios \pm desvios-padrão para as variáveis físicas: área, peso e espessura das membranas pericárdicas bovinas conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21	53
Avaliação biomecânica da Membrana Pericárdica Bovina (MPB) conservada no Meio ERS®-04-09-11-16-21	62
Tabela 1 Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados médios - QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - CV) para	

	espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a Membrana Pericárdica Bovina (MPB)	15 69
Tabela 2.	Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados Médios - QM, valores de F, significância e coeficientes de variação – CV) para espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a Membrana Pericárdica Bovina (MPB)	70
Tabela 3.	Volumes finais, absorção e percentual do meio absorvido pela MPB conforme os tempos de estudo	74

RESUMO

A busca de materiais, métodos e meios de conservação de membranas e tecidos vêm sendo realizada seja para preservação de peças anatômicas ou para uso nos transplantes homólogos e heterólogos. No presente trabalho foi realizada uma revisão bibliográfica sobre os materiais e meios de conservação de membranas biológicas utilizadas em procedimentos cirúrgicos. Três experimentos objetivaram: (I) - Determinar a concentração dos antibióticos benzilpenicilina, sulfato de estreptomicina e anfotericina B no meio de conservação ERS®04-09-11-16-21; (II) - Caracterizar a morfologia e histopatologia das MPBs (III) - Avaliar as características biomecânicas das MPBs, conservadas no meio proposto. Inicialmente, foram coletadas 10 MPBs, que após processadas, registraram peso médio de 21 g. Para determinação da concentração de penicilina, utilizou-se a dosagem atendendo ao peso, enquanto que para o sulfato de estreptomicina e anfotericina B, adaptou-se o procedimento utilizado em cultivo celular. Os resultados finais indicaram dosagens de 2,0 mg/ml; 0,035 mg/ml e 0,030 mg/ml nesta ordem respectivamente. No experimento II – quatro amostras foram coletadas e seccionadas em 10 fragmentos de 2 cm², determinando-se peso, tamanho e espessura, segundo os tratamentos T-0 - In natura; T-30 -, T-60 e T-90, respectivamente aos 30, 60 e 90 dias da coleta. Os resultados morfofométricos demonstraram aumento de espessura, tamanho e peso das MPBs nos diversos tempos em relação ao estado *in natura* e estudos histopatológicos (microscopia óptica e eletrônica) evidenciaram a manutenção da estrutura das MPBs, apesar de haver um maior espaçamento entre as fibras colágenas. Os fibroblastos apresentaram graus variados de vacuolização e necrose em todos os tempos. No terceiro experimento, obedeceram-se aos mesmos procedimentos de coleta e conservação do experimento II. Já, o tamanho das amostras foi de 13 cm x 20 cm para avaliação da espessura, força máxima, tensão e alongamento por meio de dinamômetro computadorizado EMIC. Tendo em vista todos os resultados, conclui-se que o meio proposto é capaz de manter as MPBs livres de contaminantes por um de 90 dias com o mesmo padrão morfológico e arranjo das fibras colágenas. As MPBs conservadas no meio e mantidas em temperatura de refrigeração 12±2°C podem ser utilizadas em procedimentos cirúrgicos num período ideal entre 13 e 69 dias dado pela conservação da capacidade de alongamento e pelo aumento da força máxima e espessura. Houve também uma redução da tensão a que foi submetida a MPB, em função do tempo, o que não compromete o uso das MPBs em procedimentos cirúrgicos

como reconstituição de cápsulas articulares, herniorafias, cirurgia reparadora de extensos traumatismos com perda de tecido conjuntivo, entre outros.

ABSTRACT

Search for materials, methods and means of conservation of membranes and tissues has been accomplished either for preservation of anatomic pieces or for utilization in homologue and heterologue transplants. In the present work, a bibliographical review about materials and means of conservation of biological membranes utilized in surgery procedures was realized. Three experiments aimed at: (I) – Determine concentration of the antibiotics benzilpeniciline, sulphate of estreptomisine and anfotericine B in the environment of conservation ERS®-04-09-11-16-21; (II) – Characterize morphology and histopathology of the BPMs (III) – Evaluate biomechanical characteristics of BPMs conserved in the environment proposed. Initially, 10 BPMs were collected, which registered an average weight of 21g after processed. In order to determine concentration of peniciline, a dosage taking weight into account weight was used, whereas for sulphate of estreptomisine and anfotericine B, procedure used in cell cultivation was adapted. Final results indicated dosages of 2,0 mg/ml; 0,035 mg/ml e 0,030 mg/ml respectively. In experiment II – four samples were collected and sectioned in 10 fragments of 2 cm², determining weight, size and thickness, according to treatments T-0 - *In natura*; T-30 - , T-60 e T-90, respectively at 30, 60 and 90 days after collecting. Morphometrical results demonstrated augmentation of thickness, size and weight of BPMs in the several timings in relation to *in natura* state and histopathological studies (optic and electronic microscopy) brought to evidence maintenance of BPMs structure, although an enlargement of spacing between collagen fibers took place. Fibroblasts presented varied degrees of vacuolization and necrosis at all timings. In the third experiment, same procedure of collecting and conservation as in experiment II were obeyed. Size of samples was of 13 cm x 20 cm for evaluation of thickness, maximum force, tension and expansion through computerized dynamometer EMIC. Taking all results into account, we come to the conclusion is the environment proposed is capable of maintaining the BPMs free of contaminants for a period of 90 days with the same morphological pattern and collagen fibers arrangement. The BPMs conserved in the environment and maintained under refrigeration temperature 12±2°C can be used in surgery procedures in an ideal period of between 13 and 69 days given conservation of capacity of expansion and augmentation of maximum force and thickness. A reduction of tension to which BMP was submitted because of timing was also observed, which does not endanger use of BPMs in surgery procedures such as reconstitution of articular capsules, herniorafies, reparation surgeries of thick traumatisms with loss of conjunctive tissue, and so forth.

1 INTRODUÇÃO

Materiais biológicos vem sendo utilizados em procedimentos cirúrgicos com apresentação de melhores resultados que os sintéticos, pois apresentam vantagens como: indução de menor reação inflamatória nos tecidos receptores, baixos custos e fácil acesso (Alvarenga, 1992).

Na década dos anos 60, é que as pesquisas sobre próteses biológicas alcançam maior grau de desenvolvimento para atendimento de patologias de valvas cardíacas e procedimentos cirúrgicos reparadores (implante).

A procura por materiais, métodos e meios de conservação para diversos tecidos vêm sendo constantemente realizada. Materiais biológicos vem sendo mais utilizados em implantes (aloenxertos e xenoenxertos), cirurgias reconstrutivas e reparadoras de elementos tubulares, valvares e principalmente de sustentação.

Dentre as membranas biológicas utilizadas, a pericárdica bovina tem sido utilizada com maior frequência que as demais, por ser de fácil incorporação ao tecido receptor e possuir baixa antigenicidade (Daleck, et al., 1988; Cunrath, 1999), alta resistência à forças de tensão/tração e fácil disponibilidade. Outro fator de suma importância: seu baixo custo permite o uso em países desenvolvidos e em desenvolvimento onde a aplicação de recursos para saúde pública é realizada em baixa escala.

Meios de conservação de membranas biológicas têm sido estudados ao longo dos anos por diferentes pesquisadores em todo o mundo. Tais estudos justificam-se pela busca de uma melhor conservação de membranas e tecidos biológicos destinados à utilização em procedimentos cirúrgicos.

De acordo com Alvarenga (1992), os estudos realizados buscam a obtenção de um meio ideal obter um meio ideal para conservação de tecidos biológicos; meio este que seja de fácil acesso, transporte e sem custos elevados. Isso facilitaria o emprego cirúrgico das membranas biológicas em diferentes procedimentos.

Uma solução conservadora “ideal” deve possuir um alto poder estabilizador que impeça a decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos, manter ao máximo

a integridade das células, aumentar a resistência à tração/tensão dos tecidos e atuar por um período de tempo prolongado.

Para garantia de sucesso nos procedimentos cirúrgicos com a utilização de membranas biológicas, é necessária a preservação das características estruturais, macroscópicas e microscópicas, morfológicas e biomecânicas.

O presente trabalho objetivou realizar uma revisão bibliográfica dos materiais utilizados nos meios de conservação de membranas biológicas usadas em diversos procedimentos cirúrgicos. Houve também como finalidade, a determinação da concentração dos antibióticos benzilpenicilina, sulfato de estreptomicina e anfotericina B no novo meio de conservação ERS®-04-09-11-16, constituído também de carboidrato, água e eletrólitos. Pretende-se com o novo meio avaliar as características histomorfológicas, morfométricas e biomecânicas e inocuidade, da membrana pericárdica bovina, nele conservadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros trabalhos sobre biopróteses nasceram com a necessidade de procedimentos cirúrgicos nas patologias do coração e procedimentos reparadores de parede torácica, diafragmática e abdominal, bem como curativos biológicos de feridas. Samwais (1898) é reportado como pioneiro em sugerir a secção de uma valva mitral estenosada. Nos anos 60, intensificaram-se as pesquisas sobre próteses biológicas, para atender as patologias das válvulas cardíacas e procedimentos cirúrgicos reparadores. As biopróteses dessa época compreendiam as válvulas naturais de cadáveres humanos (homo-enxertos), de animais (hetero-enxertos) e do próprio paciente ou auto-enxerto (Murray, 1956; Ross, 1962; Barrat-Boyes, 1964 e 1965).

Alternativas para conservação de tecidos biológicos tem sido investigados. Desta forma, Felippozi (1967) utilizou válvula aórtica homóloga conservada em álcool a 70%. Zerbini (1967) obteve bons resultados com o emprego de homoenxertos aórticos conservados em formaldeído. Pelas características anatômicas, durabilidade, baixa incidência de tromboembolismo e avaliação hemodinâmica, o uso de válvulas de animais tem sido utilizado em humanos. As da espécie suína, fixadas e tratadas pelo glutaldeído, têm sido mais utilizadas até os dias atuais, devido à baixa antigenicidade, tamanhos e disponibilidade (Binet et al., 1968; McIntosh, et al., 1975; Rivera et al., 1980; Janusz et al. 1982; Reece et al., 1986 e David et al., 1988). Carpentier et al. (1969 e 1989) introduziram o uso de glutaraldeído em baixa concentração (0,5%) para preservação de tecidos biológicos dando início a uma nova era no campo das próteses biológicas, em que o pericárdio bovino tem alcançado resultados consistentes.

Outros tecidos têm sido utilizados em procedimentos cirúrgicos do coração. Citam-se a fâscia-lata (Ionescu, et al., 1972 e 1974), a dura-máter (Puig, 1973) e pericárdio (Ionescu et al., 1974) na fabricação de próteses para substituição de valvas cardíacas. Puig et al. (1973) utilizaram um novo tipo de valva cardíaca, confeccionada com dura-máter homóloga conservada em glicerina a temperatura ambiente, em substituição de valvas cardíacas humanas, com bons resultados e ótima evolução dos pacientes. Zerbini (1975) e Verginelli et al. (1975) usaram válvulas de dura-máter homóloga preservada em solução de glicerol a 98% à temperatura ambiente, reportando dados importantes nos pacientes, como: nenhum gradiente de pressão significativa pela válvula em repouso; ausência de endocardite bacteriana; nenhuma degeneração ou retração dos folhetos; ausência de trombos na válvula e não

utilização de anticoagulante. Moraes et al. (1976) realizaram implante de valvas biológicas (fáscia lata, pericárdio e dura-máter) em pacientes, com idades variando de oito a 59 anos. Os pesquisadores reportaram resultados não satisfatórios com as válvulas confeccionadas com fáscia lata autógena, ainda no primeiro ano evolução. Observaram melhores resultados com as válvulas confeccionadas com dura-máter e pericárdio homólogos. Consideraram ainda, que, além da dura-máter e o pericárdio serem tecidos mais resistentes, outros fatores contribuíram para os melhores resultados, no entanto consideram ainda que o período de evolução dos pacientes, ainda é curto para uma conclusão definitiva. Manifestaram também, que, a glicerina parece ter influência nos resultados satisfatórios talvez por reduzir a antigenicidade do tecido.

Materiais sintéticos também têm sido utilizados em outros procedimentos cirúrgicos e critérios têm sido estabelecidos na seleção destes implantes. Amid et al. (1994) e Cristoforoni (1996) consideram que o material implantado, deve ser bem tolerado em presença de infecção, ser flexível, de fácil manuseio e provocar os menores graus de aderências. Mittelstaedt et al. (1986) referindo-se aos problemas técnicos na correção de grandes hérnias incisionais, pelo afastamento das grandes margens aponeuróticas em humanos, continua a desafiar cirurgiões, pois o emprego de próteses sintéticas, além de caro, não é a solução ideal e universal para todos os problemas. Seu emprego como “reforço” de suturas parece ser útil, mas sua colocação como “ponte” está sujeita, a elevados índices de complicações. Expressam que melhores perspectivas futuras estão no encontro de um material de prótese mais satisfatório, que seja resistente, de fácil obtenção e bem tolerado pelo leito receptor.

A substituição de tecidos no organismo é um dos principais desafios da cirurgia atual. Tais procedimentos são necessários, na perda de estrutura anatômica, por defeitos congênitos, seqüelas de trauma ou cirurgia oncológica (Andrews, 1988). Segundo Trautmann et al. (1950), biomembranas ou túnicas serosas são estruturas com função de revestimento de paredes e cavidades fechadas (torácica e abdominal) que cobrem os órgãos existentes nelas.

Meios de conservação de membranas biológicas têm sido estudados ao longo dos anos por diferentes pesquisadores no mundo. Tais esforços se justificam pela busca de alternativas capazes de conservar as características morfológicas e biomecânicas destas estruturas para utilização em procedimentos cirúrgicos.

Entre as membranas biológicas frequentemente utilizadas em procedimentos cirúrgicos, o pericárdio tem tido a preferência de muitos pesquisadores. É uma membrana que envolve o coração, constituída por tecido conjuntivo compacto em que predomina fibras

colágenas tipo I, de grande resistência à tensão (Araújo et al., 2000). Os feixes colágenos e fibras elásticas se cruzam em diversos ângulos permitindo, adaptar-se rapidamente às mudanças no tamanho do coração (Dellmann e Brown, 1999). Esta membrana tem sido utilizada, com maior frequência do que as membranas sintéticas, devido à fácil incorporação ao tecido receptor e possuir baixa antigenicidade (Daleck et al., 1988; Cunrath, 1999). Pigossi (1967) constatou a conservação de membranas biológicas em glicerina a 98% por períodos de até sete meses. O pericárdio equino, conservado em este meio foi utilizado no reparo de ampla lesão do duodeno de cães. Após coleta e tratamento, as membranas, foram armazenadas em frascos esterilizados contendo glicerina a 98%, onde permaneceram imersas a temperatura ambiente por 30 dias, sendo então considerados aptos para uso. Esta membrana também foi implantada no tecido subcutâneo de camundongos para estudo de histocompatibilidade. Comprovou a resistência desta membrana à ação e pressão dos sucos gastrintestinais servindo como substrato ao duodeno e permitindo a ocorrência de processo de restituição da lesão duodenal. A membrana implantada foi hidratada em solução salina 0,9% e tratada com 250 mg de ampicilina benzatínica associada a 50 mg de ampicilina sódica, antes de sua utilização. O estudo microscópico evidenciou infiltrado com predomínio de polimorfonucleares, na maioria dos tempos do implante, porém mais acentuado no segundo dia, acreditando que, o resultado foi compatível com o processo inflamatório agudo esperado. No sexto dia iniciou-se exuberante proliferação de fibroblastos e neoformação vascular, e no sexagésimo dia observou substituição do tecido implantado por áreas extensas de tecido de granulação, com razoável grau de colagenização. Aos 180 dias de pós-operatório, a lesão estava completamente reparada por tecido cicatricial e recoberta por camada mucosa característica, não havendo evidência de degeneração da camada muscular. O infiltrado inflamatório observado nos implantes duodenais em tempos tardios poderia ser devido ou ao efeito irritativo do pericárdio, somado às manobras cirúrgicas, ou a fenômenos de hipersensibilidade, como os dos experimentos realizados em camundongos. Apesar de não ter observado rejeição do enxerto, observou que esta membrana pode induzir estado de hipersensibilidade no hospedeiro. Pode-se afirmar que o pericárdio é pouco irritante ou inócuo, quando utilizado pela primeira vez. No entanto, um segundo implante com pericárdio de mesma origem, poderia desenvolver reação inflamatória mais acentuada, se realmente comprovado que este material tem capacidade de induzir estado de hipersensibilidade no receptor. Andretto et al. (1975 e 1976) apud Alvarenga (1992) empregaram membrana pericárdica de cães conservada em glicerina, na reparação cirúrgica da aorta abdominal,

reparo da traquéia e das vias bilíferas da espécie canina. Alvarenga (1977) utilizou membrana pericárdica homóloga conservada em glicerina para substituir segmento do colédoco em cães. Salieta que a ausência de reação granulomatosa do tipo corpo estranho, bem como a pequena presença de linfócitos adjacentes ao reparo tubular implantado, sugere um comportamento não antigênico. Alvarenga et al. (1982) usaram como tecido biológico, retalho de pericárdio eqüino conservado em glicerina, para esofagoplastia em cão, com nódulo de *Spirocerca lupi* ao nível da porção distal do esôfago torácico. O exame macroscópico não evidenciou aderências, estenose e dilatação. A avaliação histopatológica registrou grau exacerbado de proliferação do componente glandular da submucosa mucosa, com hiperplasia glandular. No tecido implantado foi observado colagenização mais ou menos acentuada, células com características morfológicas de fibrócitos e fibroblastos. O colágeno apresentou-se arquiteturalmente bem organizado e relativamente bem vascularizado. De acordo com os resultados, os pesquisadores concluem que o tecido biológico oferece condições de ser utilizado na reparação cirúrgica do esôfago de cães portadores de afecções que produzam perda tecidual mais ou menos extensa deste órgão. Daleck (1986) praticou esofagoplastia cervical experimental em cães com peritônio autólogo e homólogo conservado em glicerina. Os retalhos foram removidos do frasco com glicerina e reidratados com soro fisiológico, acrescido de 0,5 gramas de ampicilina. Ressalta ainda que entre as qualidades dos diversos tipos de materiais utilizados para reparações cirúrgicas, os biológicos, sempre que possível sua escolha, apresentam diversas vantagens com realce à possibilidade de incorporação ao organismo receptor. Conclui que a glicerina (98%) mostrou ser um excelente meio de conservação para o peritônio e que histologicamente não foi observada nenhuma diferença entre os resultados obtidos com implante autólogo ou homólogo. Ranzani (1986) utilizou membrana pericárdica eqüina conservada em glicerina a temperatura ambiente por um período não menor de três meses, para substituir um segmento da porção muscular diafragmática em cães. Observou que, tal membrana não desencadeou qualquer manifestação clínica indesejável nos animais operados. O fragmento do pericárdio foi retirado do frasco de conservação e hidratado em solução fisiológica contendo 500 mg de ampicilina, por um tempo mínimo de 10 minutos antes de sua utilização. Stopiglia et al. (1986) relatam entre as principais doenças da face interna da parede torácica de cães: tumores (condromas, condosarcomas, osteosarcoma), osteomielites, infecções crônicas das partes moles da face interna torácica com fistulação e fraturas. Indicam a necessidade de atenção especial ao fechamento da ferida. Os materiais biológicos são indispensáveis na toracoplastia

reconstrutiva. Em tais procedimentos utilizaram pericárdio equino conservado em glicerina e verificaram que a resistência desse material, proporcionou bons resultados quando utilizado em outros tecidos e órgãos de cães. Manifestaram ainda que esta membrana em particular, apresenta um aspecto amorfo, acelular, e que não causa reação inflamatória. Daleck et al. (1992) utilizaram peritônio bovino conservado em glicerina na reparação de hérnia perineal em cães, concluindo que este, utilizado nesse meio de conservação, permite boa reparação do diafragma pélvico da espécie, portadora deste mal. Almeida (1996) utilizou em estudo experimental, pericárdio caprino conservado em glicerina 98% na reconstrução do esôfago cervical de cães. O autor verificou que a reparação da área de reconstrução esofágica foi adequada; visto que não foram verificadas quaisquer alterações que pudessem comprometer a função do órgão. Conclui que o pericárdio caprino, conservado em glicerina, mostrou-se satisfatório na reconstrução de esôfago cervical de aproximadamente cinco centímetros de comprimento por dois centímetros de largura, induzida experimentalmente em cães. Sartori et al. (1997) estudaram o comportamento do centro frênico de equinos, conservado em glicerina e implantado sobre uma região do tendão do músculo gastrocnêmio de coelho, parcialmente seccionado. Na maioria dos trabalhos relacionados com lesão tendínea, utiliza-se material sintético, mas os enxertos autólogos ou homólogos trouxeram resultados muito satisfatórios. Pigatto et al. (1998) realizaram esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina a 98% e concluíram que a preservação neste meio, mostrou-se eficiente na reparação de defeitos produzidos na parede cervical esofágica dos mesmos. Concluram, então que esta membrana, conservada em glicerina, pode ser utilizada de maneira satisfatória em cirurgias reconstrutivas de face interna torácica em cães; já que permite a recuperação das funções pulmonares sem nenhum fenômeno de rejeição, favorecendo assim, a organização de tecido conjuntivo nas regiões afetadas. Ramsey et al. (1995) utilizaram diacetato de clorexidina na concentração 0,025% a 4°C na conservação de membrana amniótica equina para curativo oclusivo no tratamento de feridas em cães. Almeida (1996) utilizou pericárdio caprino conservado em glicerina a 98% para reconstituição de esôfago cervical em cães. Sartoti et al. (1997) estudaram o comportamento do centro frênico equino conservado em glicerina e implantado sobre uma região do tendão do músculo gastrocnêmio de coelho. Pigatto et al. (1998) realizaram esofagoplastia cervical em cães utilizando enxerto homólogo de cartilagem conchal conservada em glicerina a 98%. Costa Neto et al. (1999) utilizaram peritônio bovino conservado em glicerina a 98% em tenoplastia experimental do calcâneo em cães, com evolução clínica satisfatória e recuperação funcional

do membro. Costa Neto et al. (2000) avaliaram a ação antimicrobiana da glicerina a 98% na conservação e rehidratação do ligamento nugal de bovino. A ação antimicrobiana da glicerina a 98%, permitiu constatar a ação anti-séptica desta substância na conservação e reidratação do mesmo. Os microrganismos foram susceptíveis ao efeito bactericida, exceto a forma esporulada de *Bacillus cereus*. Raiser et al. (2001) praticaram homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães conservado em glicerina a 98%. O homoimplante foi imerso em solução salina isotônica com iodopovidona para adequada rehidratação e esterilização, não desencadeando sinais característicos de infecção ou rejeição. Rappeti et al. (2003) implantaram cartilagem auricular heterógena, conservada em glicerina a 98%, na parede torácica de gatos. Através de avaliação macroscópica e microscópica da região do implante, observaram proliferação de tecido fibrovascular neovascularizado sobre o implante. Concluíram que o implante de cartilagem heteróloga neste meio de conservação pode ser utilizado para reconstrução de defeitos que abrangem o espaço de três costelas e que o implante é substituído por tecido cicatricial em um período de 60 dias, sem apresentar sinais de rejeição.

O glutaraldeído também tem sido considerado na conservação de membranas destinadas à fabricação de prótese cardíaca e cirurgia reparadora por sua ação fixadora. Gallo et al. (1978) transplantaram retalhos de pericárdio suíno preservado em glutaraldeído em cães. Os pericárdios suínos assim tratados, que foram utilizados no fechamento da cavidade pericárdica de oito pacientes, não revelaram nenhum problema no período de nove meses. Janusz (1982) implantou próteses heterogênicas suínas em pacientes humanos. A avaliação, por cinco anos seguidos, demonstrou que a bioprótese suína, proporcionou qualidade excelente de vida à maioria dos pacientes. Constatou também que biopróteses preservadas em glutaraldeído, foram superiores às próteses mecânicas. Santillán-Doherty et al. (1995) efetuaram reparação de defeitos da parede abdominal de cães, utilizando biopróteses de pericárdio bovino preservado em concentrações de glutaraldeído que variaram entre 0,5% a 10%. Concluíram que a menor concentração conservou sua força de tensão/ruptura e que concentrações maiores alteram esta característica. Piza (1997) utilizou concentrações crescentes de glutaraldeído em tempos de cinco a 90 minutos e temperaturas entre cinco e 45°C, observando que nos resultados de ensaios mecânicos, com exceção da resistência à tração, o pericárdio bovino apresentou valores aceitáveis para a confecção de válvulas cardíacas. Cunrath (1999) tratou o pericárdio bovino com glutaraldeído para reparação de hérnia incisional em caprinos. Concluiu que as biopróteses assim tratadas mostraram-se

adequadas ao reparo no procedimento cirúrgico. Matucci et al. (2000) utilizaram pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído no tratamento cirúrgico da incontinência urinária por lesão do esfíncter. Concluem que as o “*sling*” de pericárdio bovino com elevadas taxas de erosão e perda do enxerto, contra-indicam sua utilização.

Soluções anti-sépticas também têm sido reconhecidas como substâncias inibidoras de crescimento bacteriano e/ou fúngico na conservação de membranas biológicas. Porém, poucos são os trabalhos desenvolvidos com a utilização de tais substâncias. Ramsey et al. (1995) utilizaram diacetato de clorexidina na concentração de 0,025% a 4°C na conservação da membrana amniótica equina para uso como curativo oclusivo do tratamento de feridas em cães. Os resultados satisfatórios. Costa Neto et al. (2000) avaliaram a ação antimicrobiana da solução aquosa de iodo-povidona a 0,1% na conservação e reidratação do ligamento nucal bovino, permitindo constatar a ação anti-séptica desta substância na conservação e reidratação do ligamento. Os microrganismos foram susceptíveis ao efeito bactericida, exceto a forma esporulada do *Bacillus cereus*. Araújo et al. (2000) experimentaram diferentes técnicas de conservação de pericárdio bovino para cirurgia reconstrutiva, incluindo-se também o soro fisiológico acrescido de clorexidina a 0,025% e conservado a 14 e -2°C, soro fisiológico com 15% de glicerol mantido a -196°C. Os melhores resultados foram registrados no grupo mantido a 14°C. Mota et al. (2003) preservaram camada de intestino delgado de cães em tintura alcoólica de timerosal 1:1.000 e solução de polivinilpirrolidona a 50%. Nas análises morfológicas e microbiológicas, observaram que o poder anti-séptico dessas substâncias, não permitiu crescimento de microrganismos. Ressaltam que a camada muscular conservada na solução timerosal apresentou alterações (aumento de volume nuclear e cariólise), provavelmente devido à toxicidade da substância.

Entre outros procedimentos realizados, a solução fisiológica acrescida de antibióticos tem sido também objeto de estudo para preservação de membranas biológicas destinadas a procedimentos cirúrgicos. Petropoulos e Kleinhenz (1962) substituíram parcialmente a parede do esôfago torácico em cães, implantando dura-máter homóloga a fresco e preservada em solução salina refrigerada contendo penicilina e estreptomicina por um período que variou entre dois a cinco dias. Da mesma forma, Almeida (1996) na reconstrução de esôfago cervical de cães, utilizou solução fisiológica a 0,9% à temperatura de 4°C para conservação de pericárdio caprino, com o mesmo tempo de conservação de aproximadamente duas horas após a coleta. Quinze minutos antes da sua utilização, as membranas foram removidas do meio de

conservação e colocadas em recipiente estéril, acrescido da solução fisiológica a 0,9% contendo 250 mg de ampicilina benzatínica sódica.

A liofilização também tem sido utilizada como método de conservação de membranas biológicas. Assim, Laun et al. (1990) utilizaram pericárdio bovino liofilizado ou duramáter liofilizada no fechamento de dura-máter em pacientes humanos. O estudo apontava a comparação de ambos materiais, em termos de resposta imunogênica; constatando baixa taxa de complicações no pós-operatório dos grupos. Consideraram que a membrana não mostrou sinais de resposta humoral celular. Logo, o pericárdio bovino liofilizado parece ser uma alternativa para o reparo cirúrgico de defeitos da dura-máter. Freud et al. (1993) empregaram dura-máter liofilizada, na forma de retalho ou tubo, na correção cirúrgica de defeitos no esôfago de cães. O estudo sugere que a dura-máter liofilizada pode ser considerada uma alternativa para reparar defeitos com pontes esofágicas em cães. Estudos posteriores poderão ser efetivos no tratamento de abertura longa, atresia congênita de esôfago e defeitos adquiridos.

Na utilização de biopróteses, com membranas biológicas, outros tecidos têm sido cada vez mais estudados. Um dos objetivos mais importantes é a utilização como tratamento alternativo acessível às diversas camadas sociais. Desta forma, Robson et al. (1973) utilizaram placentas de seres humanos conservadas a 4° C, por um período máximo de três semanas sem crescimento de microrganismos. Cerise (1974); Amid et al. (1994) e Cristoforoni (1996) reportaram que o material ideal deve ser de baixo custo, flexível, de fácil manipulação, resistente. Deve também promover o crescimento do tecido do hospedeiro, permitir que o tecido cicatricial tenha força igual ao tecido normal, ser resistente às infecções, não causar inflamação exacerbada, não promover formação de aderências e fístulas e ainda, não ter suas características físicas alteradas pelos líquidos tissulares. Rao et al. (1980) utilizaram membrana amniótica conservada a 4°C em solução contendo penicilina cristalina por seis semanas. Reportaram que em função das condições higiênicas do meio, os cuidados na obtenção da placenta de bovinos devem ser superiores àqueles relativos às humanas. Salientaram ainda o uso da mesma em função da alta disponibilidade e grande superfície. Hustson e Azmy (1985) repararam, em humanos, grandes defeitos congênitos da parede abdominal de recém nascidos utilizando dura-máter humana liofilizada e pericárdio bovino, sem observar diferenças entre ambas. Manifestaram que a dura-máter possui a habilidade de conservar sua resistência à tração durante muitos meses enquanto é substituída gradualmente por fibroblastos do tecido receptor, até a completa incorporação. Salientaram a formação de

uma lâmina cicatricial promovendo a estabilização da parede abdominal e diafragmática. Faulk et al., (1980) utilizaram membrana amniótica no leito de feridas de 55 pacientes. Depois de cinco dias observaram considerável formação de tecido de granulação no leito da ferida. Sugerem a presença de fatores angiogênicos na membrana amniótica humana, como responsáveis pelo sucesso com o uso desta membrana na prática cirúrgica.

Falcão (1999) em estudo experimental utilizou pele de rã conservada em glicerol a 15% à temperatura de refrigeração de -4°C como curativo biológico oclusivo, em feridas cutâneas produzidas em cães. Observou intensa reação inflamatória local. Rodaski et al. (2000) utilizaram fásia-lata autóloga em mioplastia experimental do esfíncter anal externo em cães. Reportaram que as características de elasticidade e resistência deste tecido de baixa antigenicidade permitiram a realização do procedimento cirúrgico sem complicações.

Novos procedimentos têm sido objetos de estudo para a conservação de membranas biológicas destinadas a procedimentos cirúrgicos. Chirife et al. (1982) utilizaram açúcar como meio de conservação de tecidos. Afirmam que o açúcar atua criando um ambiente de baixa atividade de água, inibindo o crescimento bacteriano. No mesmo ano empregaram solução hipersaturada de sal e verificaram que a ação antibacteriana e antifúngica desta solução, esta centralizada na diminuição da atividade de água. Contudo, não descartam a possibilidade de que o iodo presente no sal comercial, possa neste sentido. Postmes (1993) reporta que o mel pode trazer contaminação por resíduos de pesticidas e fármacos como a tetraciclina, utilizados no tratamento de doenças de abelhas. Tais condições estão ausentes quando se utilizam soluções hipersaturadas de açúcar ou sal como meio de conservação de membranas biológicas. Subrahmanyam (1993) realizou estudos com o mel não processado como meio de conservação de pele em enxertos de pacientes humanos em períodos de armazenamento mínimo de duas semanas. As peles implantadas no tratamento de queimaduras e úlceras, não demonstraram sinais de autólise ou alterações histológicas. Paulo (1997) utilizou membrana amniótica eqüina preservada em ácido ascético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas em cães. Amendola et al. (2000) procederam à terapêutica cirúrgica de defeitos parciais na traquéia de coelhos com centro frênico canino conservado em mel. Observaram epitelização completa sobre o tecido implantado. Gonçalves (2000) realizou ceratoplastia lamelar bilateral em cães com córneas homogêneas mantidas em solução hipersaturada de açúcar ou em glicerina. As avaliações histopatológicas revelaram processo inflamatório inicial com neovascularização abundante e repitelização completa, seguido de proliferação de colágeno com acantose e involução vascular, sem sinais de rejeição. Mazzanti (2000) realizou

reparações de extensos defeitos diafragmáticos em cães, com músculo diafragma homólogo conservado em solução de açúcar. Observou ausência de infecção bacteriana ou rejeição. Mazzanti et al. (2001) procederam à reparação do diafragma de cães com segmento muscular homólogo ortotópico, conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% mantida a temperatura ambiente. Apesar de não realizar estudos bacteriológicos e imunoquímicos da solução conservante do tecido, não foram detectados sinais de infecção ou rejeição. Brun et al. (2002) utilizaram solução hipersaturada de sal na conservação de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos *Wistar*. As membranas, mantidas no meio por um período mínimo de 90 dias, foram avaliadas bacteriológicamente demonstrando resultado negativo para bactérias e fungos. Concluem que o meio mostrou-se adequado na conservação de pericárdio canino. Mota et al. (2003) também utilizaram solução supersaturada de açúcar na concentração a 300%, desta feita, contendo cefazolina sódica a 0,5%, na preservação da camada muscular do intestino delgado de cães. Não foi observado crescimento de microrganismos. Panizzutti (1994) indica a necessidade de uso de antibióticos no meio de cultura de células em que a escolha deve considerar diversos aspectos como: espectro de ação, custo, tempo de estabilidade nos meios, pH, temperatura de estocagem e cultivo, baixa toxicidade para as células. Reporta a penicilina G potássica como a mais utilizada em cultivos celulares, por ser um agente antimicrobiano não tóxico para as células e efetivo para o controle de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Recomenda a preparação de uma solução de estoque e adicionar de 100 a 200 Unidades de penicilina por mililitro de meio. Caso faça a opção de se utilizar o sulfato de estreptomicina, deve-se acrescentar ao meio 0,1 a 0,2 mg/ml e para anfotericina B, 0,25 mg/ml no meio. Na produção de células é mais recomendado trabalhar com menores concentrações, pois ocorre menor produção de ácidos penicilínico e penicilinóico, com menor toxicidade para as células. As soluções de estoque devem ser conservadas a -20°C.

Os agentes antimicrobianos costumam ser classificados de acordo com seus efeitos sobre os microrganismos como agentes inibidores ou destruidores (letal), agindo na síntese da parede celular bacteriana (penicilinas). Outros antimicrobianos (aminoglicosídeos) atuam na síntese protéica, podendo afetar a função das subunidades ribossômicas e causar inibição reversível da síntese de proteínas (Andrade et al. 2002; Chambers, 2003). Há os que afetam a manutenção da integridade da membrana celular, alterando sua permeabilidade e ocasionando extravasamento de compostos intracelulares, ao ligar-se a esteróides da parede celular. É o caso da anfotericina B (Farias e Giuffrida, 2002; Bennett, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo revisar a bibliografia consultada, com a finalidade de determinar a concentração inibitória dos antibióticos benzilpenicilina, sulfato de estreptomicina e anfotericina B no novo meio ERS®-04-09-11-16-21. Pesquisou-se a capacidade de conservação da MPB dentro dos padrões histomorfológicos, inocuidade e preservação de qualidades biomecânicas que permitam sua utilização em procedimentos cirúrgicos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.L. Reconstituição do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. 1996. Tese (Doutorado em Cirurgia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 68 f.

ALVARENGA, J. Substituição de segmento de colédoco de cão por preparo de pericárdio homólogo conservado em glicerina: estudo experimental. 1977. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 102f.

ALVARENGA, J. et al. Reparo do esôfago de cães com retalho de pericárdio de equino PSI conservado em glicerina. Esofagoplastia na retirada de nódulo parasitário. In: SEMANA DE VETERINÁRIA, 1, 1982, São Paulo. **Anais....**São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R; BAPTISTA, L. C; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**, Jaboticabal: FUNEP, 1992, p. 33-43.

AMENDOLA, G.F. et al. Traqueoplastia em coelhos com frênito conservado em eml. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, p. 111, 2000, Suplemento.

AMID, P.K et al. Experimental evaluation of a new composite mesh with the sective property of incorporation to the abdominal wall without adhering to the intestines. **Journal Biomedical Materials Reseach**. Hoboken, v. 28, p. 373-375, 1994.

ANDRADE, S.F; GIUFFRIDA, R; RIBEIRO, M.G. **Quimioterápicos, Antimicrobianos e Antibióticos**. In: Manual de Terapêutica Veterinária. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002, São Paulo: Roca, cap. 3. p. 28-29, 2002.

ANDRADE, S.F; GIUFFRIDA, R; RIBEIRO, M.G. **Quimioterápicos, Antimicrobianos e Antibióticos**. In: Manual de Terapêutica Veterinária. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002, São Paulo: Roca, cap. 3. p. 37-38, 2002.

ANDRETTO, R; GONZALVES, J. Reparo da aorta abdominal em cão com pericárdio conservado em glicerina. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA, 30. 1975, São Paulo. **Resumos...**[s.n], p. 1.

ANDRETTO, R. Reparo da traquéia de cães com pericárdio equino conservado em glicerina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA, 2., JORNADA INTERNACIONAL DE PNEUMOLOGIA, 3., 1976., Salvador, 1976. **Resumos....**Salvador: [s.n.], 1976.

ANDRETTO, R. Reparo de vias bilíferas (vesícula biliar) de cães com pericárdio conservado em glicerina. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA, 31. 1976, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: SPMV, 1976.

ARAUJO, P.F; BRITTO, K; COELHO, M. C. O; NASCIMENTO, S; MONTEIRO, V. Diferentes técnicas de conservação de pericárdio bovino para utilização em cirurgia reconstrutiva. VIIIº CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRPE. Recife, **Resumos...**2000.

BARRAT-BOYES, B.G. Homograft aortic valve replacement in aortic incompetence and stenosis. **Torax**, London, v. 19, p. 131-50, 1964.

BARRAT-BOYES, B.G. A method for repairing and inserting a homograft aortic valve. **Brazilian Journal Surgery**, Montevideo, 52:847-56, 1965.

BINET, J.P; CARPENTIER, A; LANGLOIS, J. Clinical use of heterografts for replacement of the aortic valve. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery**, Saint Louis, v. 55, p. 240-2, 1968.

BRUN, M.V. et al. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos wistar. **Ciência Rural**, vol.32, n. 6, Santa Maria, 2002.

BRUN, M.V. Traqueoplastia em cães com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. Niterói, v. 7, suplemento, p. 58, 2002.

CARPENTIER, A. et al. Biological factors affecting long-term of valvular heterografts. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Saint Louis, v. 58, p. 467-481, 1969.

CERISE, E.J. et al. The use of mersilene mesh in repair of abdominal wall hernias. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 181, p. 728-734, 1974.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobianos (Considerações Gerais). In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. cap. 43, p. 859-860.

CHAMBERS, H.F. Antimicrobianos (Os aminoglicosídeos). In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10 ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 2003. cap. 46, p. 913-914.

CHIRIFE, J; SCARMATO, G.A; HERSZAGE, L. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. **The Lancet**, London, p. 560-561, 1982.

CRISTOFORONI, P.M. et al. Adhesion formation after incisional hernia repairs: a randomized porcine trial. **American Journal of Surgery**, New York, v. 62, p. 935-938, 1996.

COSTA NETO, J.M.C. et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 697-703, 1999.

COSTA-NETO, et. al. Ação antimicrobiana da glicerina à 98% e da solução aquosa de Iodopovidona. IVº CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA, 2000, UFRPE. **Resumos...** p. 97.

CUNRATH, G.S. Pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. 1999, São José do Rio Preto. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 116f.

DALECK. C.R. et al. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina: estudo experimental. 1986. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 48f.

DALECK. C.R. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: esofagoplastia – “estudo experimental”. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 2, 1988.

DALECK. C.R. Esofagoplastia cervical em cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina “estudo experimental”. **Veterinária e Zootecnia**. São Paulo, v. 2, p. 74, 1990.

DALECK. C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1992.

DAVID, T.E.; ROPCHAN, G.C.; BUTANY, J.W. – Aortic valve replacement with stentless porcine bioprostheses. **Journal of Cardiology Surgery**, Mount Kisco, v. 3, p. 501-5, 1988.

DELMANN, H.D; EURREL, J. 1999. **Text Book of Veterinary Histology**. 5 ed., Baltimore: Lip-poincott Willians, p. 1-380.

FALCÃO, S.C. Estudo experimental sobre o uso de pele de rã (*Rana catesbiana*) como curativo biológico oclusivo em feridas cutâneas produzidas em cães. 1999, Dissertação (Mestrado em ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 87f.

FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. **ANTIFÚNGICOS**. Cap. 4. In: ANDRADE, S. F. **MANUAL DE TERAPÉUTICA VETERINÁRIA**, 2. ed. São Paulo: ROCA, 2002, cap. 4, p. 60-61.

FAULK, W.P; STEVENS, P.J; BURGOS, H; MATHEWS, R; BENNETT, J.P; HSI, B.L. Human amnion as a adjunct in wound healing. **The Lancet**, London, v. 31, p. 1156-1157, 1980.

FELIPPOZI, H.J. Transplante de válvulas homólogas no tratamento cirúrgico das lesões da válvula aórtica. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA**. 23, São Paulo, 1967, p. 37.

FREUD, E; et al. Briding of esophagealdefects with lyopophilized dura-mater: and experimental study. **Journal of Pedriatic Surgery**, Orlando, v. 28, n. 8, p. 986-989, 1993.

GALLO, J.I; POMAR, J.L; ARTIÑANO, E; DURAN, C. M. Heterologous pericardium for the closure of pericardial defects. **Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v. 26, n. 2. p. 149-154, 1978.

GONÇALVES, G.F. et al. Ceratoplastia lamellar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina – aspectos macroscópicos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 6, n. 1, p. 31-36, 2000.

HUTSON, J; AZMY, A.F. Preserved dura and pericardium for closure of large abdominal wall and diaphragmatic defects in children. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, London, v. 67, p. 107-108, 1985.

IONESCU, M.I. et al. **Results of aortic valve replacement with frame supported fasci-lata and pericardium graft**. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THORACIC SURGERY, 53, Los Angeles, 1972.

IONESCU, M.I. et al. Long-term evaluation of tissue valves. **Journal Thoracic and Cardiovascular Surgery**, Saint Louis, v. 68, p. 361-79, 1974.

JANUSZ, M.T. et al. Experience with the Carpentier-Edwards porcine valve prothesis in 700 patients. **Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v. 34, p. 625-33, 1982.

LAUN, A; TONN, J.C; JERUSALÉM, C. Comparative study of Lyophilized human dura mater and lyophilized bovine pericardium as dural substitutes in neurosurgery. **Acta Neurochirurgica**, NewYork, v. 107, p. 16-21, 1990.

MATUCCI, R. C. et al. Pubovaginal sling with bovine pericardium for treatment of stress urinary incontinence. **Brazilian Journal of Urology**, v. 26, n. 2, p. 208-214, 2000.

MAZZANTI, A. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar envolvido ou não com segmento omental para reparação do diafragma de cão. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 62f.

MAZZANTI, A. et al. Reparação do diafragma de cães com segmento muscular homólogo ortotópico conservado em solução supersaturada de açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 21-26, 2001.

MATUCCI, R.C. et al. Pubovaginal sling with bovine pericardium for treatment of stress urinary incontinence. **Brazilian Journal of Urology**. Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 208-214, 2000.

McINTOSCH, M. L. et al. Atrioventricular valve replacement with the hancock porcine xenograft: a five year clinical experience. **Surgery**, Saint Louis, v. 78, p. 768-75, 1975.

MITTELSTAEDT, W.E.M. et al. Hérnias incisionais: revisão de 228 casos operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 117-127, 1986.

MORAES, C. R. et al. Válvulas cardíacas de fascia lata, dura-mater e pericárdio (resultados em 55 casos operados). **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 60-62, 1976.

MOTA, F. C. D et al. Análise Morfológica e Microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 4, n. 2, p. 117-123, 2003.

MURRAY, G. Homologous aortic valve segment transplants as surgical treatment for aortic and mitral insufficiency. **Angiology**, Baltimore, v.7, p. 466-471, 1956.

PANIZUTTI, N.R. **Manual de procedimentos técnicos de cultura celular**. São Paulo: Ministério da Agricultura do Abastecimento e Reforma Agrária, 1994.

PAULO, N.M. Estudo comparativo entre membrana amniótica de equino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas experimentais no cão. 1997. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 64f.

PETROPOULUS, P.C; KLEINHENZ, R.J. Experimental use of patch dura-mater homografts for closure of full-thickness esophageal defects. **Surgery**, Saint Louis, v. 51, n. 6, p. 793-796, 1962.

PIGATTO, J. A. T. et al. Esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 617-621, 1998.

PIGOSSI, N.A. (1967) A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental. São Paulo, 1967. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 36f.

POSTMES, T; BOGAARD, A.E; HAZEN, M. Honey For Wounds, ulcers, and skin graft preservation. **The Lancet**, London, v. 341, p. 756-757, 1993.

PIZA, M.A. Reticulação de pericárdio bovino com glutaraldeído: efeito da temperatura, tempo de reação e concentrações. 1997 Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Universidade São Carlos, 63f.

PUIG, L.B. et al. O uso da dura-mater homóloga em cirurgia cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 26, p.295-302, 1973.

RAIZER, A.G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães, conservação, assepsias e implantação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2001.

RAMSEY, D; POPE, E; WAGNER-MANN, C. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

RANZANI, J.J.T. Substituição de segmento da porção muscular diafragmática de cão, por pericárdio de equino conservado em glicerina: estudo experimental. Botucatu, S.P, 1986. Tese

(Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo, Campos de Botucatu, Brasil, 57f.

RAPPETI, J. C. et al. Reconstrução experimental da parede torácica de gatos com implante heterogêneo de cartilagem auricular conservada em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 1089-1094, 2003.

RAO, T.V; PRASAD, D.S; RAO, N. Bovine amnion as a biologic dressing. **Indian Veterinary Journal**, v. 57, 1036-1038, 1980.

REECE, I.J. et al. A two and a half year experience with the wessex porcine bioprosthesis. **Thai Journal Surgery**, Bangkok, v.7, p.113-116, 1986.

RIVERA, R. et al. Clinical and hemodynamic assessment of the Angell-Shiley porcine xenograft. **Annals of Thoracic Surgery**, Boston, v. 30, p. 455-64, 1980.

ROBSON, M.C; KRIZEC, T.J; KOSS, N; SAMBURG, J.L. Amniotic membranes as a tempory wound dressing. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, v. 136, p. 904-906, 1973.

RODASKI, S.; GUÉRIOS, S.D.; PERRONI, M.A; NARDI, A.B.; SILVA, C.A.M. Esfincteroplastia anal externa experimental com membrana de peritônio bovino preservada em glicerina a 98%, em cães. **Archives of Veterinary Science**. v.5, p. 55-60, 2000.

ROSS, D.N. Homograft replacement of the aortic valve. **Lancet**. London, v.280, n.7254, p. 487, 1962.

SAMWAYS, D.W. Cardiac peristalsis: its nature and effects. **Lancet**, London, v. 151, n. 38, p. 927, 1898.

SANTILLÁN-DOHERTY, P. et al. Reparación de defectos de pared tóraco-abdominal de perros con bioprótesis de pericárdio bovino. **Revista de Investigación Clínica**, México, v. 47, p. 439-446, 1995.

SARTORI-FILHO, R; GANDOLFI, W; BANDARRA, E.P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Revista de Veterinária e Zootecnia**. São Paulo, v. 9, p. 69-76, 1997.

STOPIGLIA, J.A. et al. Reparation chirurgicale de la paroi thoracique du chien. **Le Point Veterinaire**, Marsons-Alfort, v. 18, n. 97, p. 239-243, 1986.

SUBRAHMANYAN, M. Storage of skin grafts in honey. **Lancet**, London, v. 341, p. 63-64, 1993.

TRAUTMANN, A. et al. **Histología y Anatomía Microscópica comparada de los Animales Domésticos**. España: EDITORIAL LABOR, 1950, p. 107.

VERGINELLI, G. et al. Valva de dura-mater homóloga. Estudo de 338 casos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. São Paulo, v, 28, p. 21-28, 1975.

ZERBINI, E.J. Emprego de válvulas homólogas na cirurgia cardíaca. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA**, 23, São Paulo, 1967, p. 50.

ZERBINI, E.J. Results of replacement of cardiac valves by homologous dura-mater valves. **Chest**, Chicago, v. 67, n. 6, p. 706-710, 1975.

4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DOS ANTIBIÓTICOS BENZILPENICILÍNICO, AMINOGLUCOSÍDIO E POLIÊNICO EM UM NOVO MEIO DE CONSERVAÇÃO DA MEMBRANA PERICÁRDICA BOVINA

DETERMINATION OF MINIMUM INHIBITION CONCENTRATION OF THE ANTIBIOTICS BENZILPENICILINIC, AMINOGLUCOSIDE AND POLIENIC IN A NEW MEANS OF CONSERVATION OF BOVINE PERICARDIAL MEMBRANE

RODRÍGUEZ-SALAS, E¹, COELHO, M. C. O.C², PORTO, A. L. F³, SILVA JUNIOR. V³,

RESUMO: Avaliou-se um novo meio de conservação da membrana pericárdica bovina (MPB) constituído de: água, eletrólitos, fonte de carboidrato e antibióticos. Foram coletadas em matadouro, dez MPBs e destas foram coletadas amostras de swab para identificação da flora microbiana contaminante. Após a limpeza, as membranas foram pesadas, obtendo-se um peso médio de 21g. Todo o material foi transportado em caixas de isopor com gelo. Para determinar a concentração do antibiótico benzilpenicilina, foi considerado sua dosagem terapêutica e o peso das MPBs. Para o aminoglicosídeo e poliênico, adaptou-se protocolo utilizado em culturas celulares. Os antibióticos foram diluídos em água destilada, (solução de estoque), de modo a obter concentrações de 313 mg/ml, para benzilpenicilina, 100 mg/ml para o aminoglicosídeo e 5mg/ml para o poliênico. Após comprovação da inocuidade do meio, as MPBs foram imersas em recipientes de vidro contendo 62,5 ml do meio ERS[®]-04-09-11-16-21 e mantidas sob refrigeração a 12 °C± 2 °C. Avaliações microbiológicas do meio contendo as MPBs foram realizadas aos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias. As concentrações de 2 mg/ml para benzilpenicilina, 0,035 mg/ml para o aminoglicosídeo e 0,030 mg/ml para o poliênico foram capazes de manter as MPBs isentas de microrganismos por um período de 90 dias.

PALAVRAS CHAVES: Membrana biológica, conservação, antibióticos.

¹*Professor Adjunto - UFAC – Doutorando - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Recife – ernestorsa@yahoo.com.br

² Professora Adjunta, Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

³ Professores Adjuntos, Co-Orientadores, Departamento de Morfologia e Farmacologia Animal, UFRPE.

ABSTRACT: A new means of conservation of the Bovine Pericardial Membrane (BPM), constituted by water, electrolytes, source of carbon and antibiotics. Ten BPMs were collected from slaughterhouse, along with their respective “swab” samples, for identification of contaminant microbial flora. After cleanness membranes were weighed and reached an average weight of 21g. All material was transported in plastic boxes with ice. In order to determine the concentration of the benzilpenicilin antibiotics, the BPMs therapeutic dosage and weight were considered; for aminoglucozide and polienic, protocol used in cell cultures was adopted. The antibiotics were diluted in distilled water (stock solution), in order to obtain concentrations of 313mg/ml, for benzilpenicilin, and 5mg/ml for aminoglucozide and polienic, and added to the environment in study. Its harmlessness was confirmed through bacteriological routine. After corroboration of environment innocuity, the BPMs were immersed in glass recipients, containing 62,5 ml of the environment ERS®-04-09-11-16-21 and maintained under refrigeration of $12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Microbacteriological evaluations of the environment containing the BPMs took place on the 15th, 30th, 45th, 60th, 75th, 90th days. Concentrations of 2mg/ml for benzilpenicilin and 0,035 mg/ml for aminoglucozide and polienic, respectively, were capable of maintaining BMPs exempt from microorganisms for a period of 90 days.

KEY-WORDS: Biological Membrane, conservation, antibiotics.

4.1 INTRODUÇÃO

Membranas biológicas vêm sendo utilizadas há vários anos para a fabricação de válvulas cardíacas e em diversos procedimentos cirúrgicos; porém somente a partir dos anos 60, as pesquisas foram intensificadas. Entre as membranas biológicas mais utilizadas citam-se: duramáter, pericárdio, peritônio, pleura e membrana amniótica. A de maior uso tem sido a membrana pericárdica, isto pela disponibilidade e por possuir baixa antigenicidade.

O epicárdio ou pericárdio é constituído de duas camadas: uma fibrosa interna e uma serosa externa, chamada de pericárdio visceral (Neves et al., 1997), fibra colágena tipo I e glicoproteínas (Gartner e Hiatt, 2002).

Vários meios de conservação tem sido objeto de estudo para a preservação de membranas e tecidos biológicos. Entre os meios mais utilizados para conservação e preservação de tecidos e membranas biológicas, citam-se: a glicerina, por suas propriedades antisséptica, fixadora e desidratante de atuação rápida, amplo espectro de ação, excetuando-se as formas bacterianas esporuladas, e baixo custo (Alvarenga, 1992; Menezes et al., 2002). A glicerina a 98% tem sido utilizada com maior frequência como meio conservador (Stopiglia et al., 1986; Alvarenga, 1992; Bellenzani et al., 1998; Peixoto et al., 1999; Raiser et al., 2001; Aceto et al., 2002; Brun et al., 2002; Menezes et al., 2002; Safatle et al., 2002; Mota et al., 2003; Rappeti et al., 2003). Embora com tais características, Raiser et al. (2001) utilizaram este meio, garantindo a antissepsia com solução de polivinilpirrolidona; o formaldeído (Zerbini, 1967); o glutaraldeído (Gallo et al., 1978; Cunrath, 1999); solução supersaturada de açúcar (Gonçalves, 2000; Mazzanti et al., 2001; Mota et al., 2003); mel não processado (Subrahmanyam, 1993; Amendola, 2001); soro fisiológico acrescido de clorexidina a 0,025% v/v (Araújo et al. 2000); solução fisiológica refrigerada (Mota et al., 2003); solução iodo-povidona a 0,1 e 0,2% v/v (Costa-Neto et al., 2000); solução salina refrigerada contendo penicilina e estreptomicina (Petrooulos e Kleintz, 1962); solução hipersaturada de sal (Brun et al., 2002); polivinilpirrolidona, solução alcoólica de tintura de tiomersal, solução fisiológica a 0,9% contendo cefazolina sódica a 0,5% (Mota et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração dos antibióticos benzilpenicilina, sulfato de estreptomicina e anfotericina B no meio de conservação ERS®-04-09-11-16-21, que contem em sua composição: água, carboidrato, eletrólitos e antibióticos, sendo capaz de proporcionar às MPBs, nutrientes, inocuidade, manutenção das características macroscópicas, histopatológicas e biomecânicas, e sob refrigeração, permite sua conservação por um período de 90 dias.

4.2 MATERIAL E METODOS

Foram coletadas dez MPBs de bovinos machos da raça Nelore com idade aproximada de 48 meses e com peso médio de carcaça de 450 Kg, abatidos no matadouro de São Lourenço da Mata, no Estado de Pernambuco-Brasil.

Após a assepsia do material necessário, foi aberta a cavidade torácica, para a remoção do tecido adiposo, em sala contígua à sala de abate. As MPBs foram transportadas do matadouro, até o Laboratório de Implantes Biológicos (LIB) do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em caixas de isopor, contendo gelo. Foram delimitadas com placa de vidro esterilizadas de 20 cm x 30 cm e pesadas em balança eletrônica com registro de peso médio de 21,0 g. O tempo gasto no transporte até o LIB foi de aproximadamente 35 minutos.

O meio para conservação das MPBs teve sua esterilização comprovada através de sua inoculação em tubos contendo caldo de BHI e semeadura em placas de Petri contendo os meios Ágar sangue e *Sabouraud*. Este procedimento precedeu a coleta das MPBs.

Foram coletadas 14 MPBs. Destas, sete foram selecionadas aleatoriamente, e coletadas amostras com swab, para identificar a flora microbiana presente. Após a retirada do tecido adiposo e lavagem com água corrente, as MPBs foram imersas em solução de transporte contendo água destilada, e Clorexidina⁴ a 0,05% v/v, e trazidas sob refrigeração até o LIB. Aí, foi então retirado o restante de tecido adiposo, detritos e seccionadas com placas de vidro esterilizadas de 6,5 cm x 10 cm; receberam três lavagens sucessivas em cubas de inox devidamente esterilizadas, por três tempos de 30 minutos cada. A seguir, as MPBs foram imersas no meio de conservação ERS® 04-09-11-16-21 e mantidas sob refrigeração a 12 °C ± 2 °C. Para cada cm² das MPBs, foi adicionado um mililitro do meio. A membrana *in natura*, não recebeu nenhum tratamento, apenas sua limpeza. O novo meio de conservação é constituído de água, sais, os antibióticos benzilpenicilina⁵, sulfato de estreptomicina⁶ e anfotericina B⁷ e fonte de carboidrato, de maneira a obter uma osmolaridade próxima do plasma, com pH de 7,0 (tabela 1). Está registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), sob o N° PI0400935-5.

⁴ Chorohex² – Gluconato de Clorexidina – Jhonson Wax.

⁵ PENICILINA G - potássica Arison (Benzilpenicilina potássica) – 5.000.000UI.

⁶ ESTREPTOMICINA sulfato 1g. – Fundação para o Remédio Popular – FURP, S.P.

⁷ FUNGIZON® Anfotericina B – 50g. – Bristol-Myers Squibb.

Tabela 1. Composição do meio líquido ERS® 04-09-11-16-21

Elementos	Frações
Sal -1	$\frac{(5 \times K)}{2}$ mg
Sal -2	$30 \frac{(5 \times K)}{2}$ mg
Sal -3	$1,5 \frac{(5 \times K)}{2}$ mg
Carboidrato	$15 \frac{(5 \times K)}{2}$ mg
Água (q.s.p.)	100 ml

Para a diluição dos antibióticos, foram preparadas soluções de estoque com as seguintes concentrações: benzilpenicilina (313 mg/ml), sulfato de estreptomicina (100 mg/ml) e anfotericina B (5 mg/ml). Os antibióticos foram adicionados ao meio de conservação das MPBs em concentrações que variaram de 0,3 a 2 mg/ml, para benzilpenicilina e 0,005 a 0,035 mg/ml, para o sulfato de estreptomicina e anfotericina B respectivamente. No cálculo da dose de benzilpenicilina, foi usada a dose terapêutica indicada por Andrade (2002), considerando-se o peso da MPB. Para o sulfato de estreptomicina e anfotericina B, foram usadas as dosagens indicadas por Panizzutti (1994) para cultura de células. Trabalhos preliminares foram realizados para a formulação das concentrações inibitórias mínimas destes antimicrobianos. No primeiro ensaio, as concentrações dos antimicrobianos foram definidas agrupando-se os antibióticos aos pares, com concentrações crescentes conforme demonstrado na tabela 2. Testes microbiológicos foram realizados para comprovar a esterilização do meio ERS® 04-09-11-16-21, semeando-os em tubos de ensaio contendo caldo Infuso Cérebro Coração (BHI)⁸ e em placas de Petri contendo os meios: Ágar sangue e *Sabouraud* Dextrosado⁹. Os tubos e as placas contendo o meio de Agar Sangue foram incubados em estufa bacteriológica do Laboratório de Imunopatologia Keison Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco por 24 h a 37 °C, para verificar crescimento bacteriano. As placas contendo Agar Sabouraud foram mantidas a temperatura de ± 28 °C por período de 15 dias para verificação de crescimento fungos. As avaliações microbiológicas nos tempos: T-15 (aos 15 dias da coleta), T-30 (aos trinta dias da coleta), T-45 (aos 45 dias da coleta), T-60 (aos sessenta dias da coleta), T-75 (aos setenta e cinco da coleta) e T-90 (aos 90 dias da coleta), foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina

⁸Infuso Cérebro Coração (BHI) – BIOBRAS.

⁹Agar Sabouraud Dextrosado – BIOBRAS.

Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, atendendo-se a metodologia descrita por Koneman et al. (2001). As avaliações fúngicas foram realizadas no Laboratório e Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, atendo-se também aos procedimentos indicados por Koneman et al. (2001).

Para a comprovação da eficácia do novo meio de conservação, de 14 MPBs com dimensão de 65 cm², foram selecionadas sete, tratadas como anteriormente descrito, colocadas individualmente em frascos de vidro contendo 65 ml do meio (tabela 2) e foram mantidas sob refrigeração a 12 °C ± 2 °C nos tempos do estudo. Como controle, foi utilizado solução de cloreto de sódio 0,9%¹⁰ sem antibióticos. Ao final de cada tempo, foram realizadas as avaliações microbiológicas.

Tabela 2. Agrupamento de concentrações dos antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21

Frascos	Grupo 1		Grupo 2	
	Antibióticos	Concentrações	Antibióticos	Concentrações
C-1	Benzilpenicilina	0,3 mg/ml	S. Estreptomicina	0,005 mg/ml
	Anfotericina B	0,005 mg/ml	Anfotericina B	0,005 mg/ml
C-2	Benzilpenicilina	0,6 mg/ml	S. Estreptomicina	0,010 mg/ml
	Anfotericina B	0,010 mg/ml	Anfotericina B	0,010 mg/ml
C-3	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	S. Estreptomicina	0,015 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Anfotericina B	0,015 mg/ml
C-4	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	S. Estreptomicina	0,020 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Anfotericina B	0,020 mg/ml
C-5	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	S. Estreptomicina	0,025 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Anfotericina B	0,025 mg/ml
C-6	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	S. Estreptomicina	0,030 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Anfotericina B	0,030 mg/ml
C-7	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	S. Estreptomicina	0,035 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Anfotericina B	0,035 mg/ml

Após a avaliação das concentrações de antimicrobianos no meio de conservação proposto, com provável ausência de sinergismo entre as drogas estudadas, um segundo ensaio foi realizado, agrupando-se todos os antibióticos com as mesmas concentrações anteriormente utilizadas, de forma a determinar a concentração inibitória mínima, procurando-se o sinergismo desejado, capazes de causar morte da flora contaminante e inibir o crescimento de bactérias e fungos (tabela 3).

¹⁰Cloreto de Sódio 0,9% HalexIstar, Goiânia-GO.

Tabela 3. Concentração das diferentes associações de antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21

Frascos	Antibióticos	Concentrações
C-1	Benzilpenicilina	0,3 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,005 mg/ml
	Anfotericina B	0,005 mg/ml
C-2	Benzilpenicilina	0,6 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,010 mg/ml
	Anfotericina B	0,010 mg/ml
C-3	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,015 mg/ml
	Anfotericina B	0,015 mg/ml
C-4	Benzilpenicilina	1,2 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,020 mg/ml
	Anfotericina B	0,020 mg/ml
C-5	Benzilpenicilina	1,4 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,025 mg/ml
	Anfotericina B	0,025 mg/ml
C-6	Benzilpenicilina	1,7 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,030 mg/ml
	Anfotericina B	0,030 mg/ml
C-7	Benzilpenicilina	2 mg/ml
	Sulfato de Estreptomicina	0,035 mg/ml
	Anfotericina B	0,035 mg/ml

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas biológicas, bem como outros tecidos, necessitam de meios de conservação que mantenham suas qualidades histomorfológicas, biomecânicas e inocuidade, a fim de garantir o sucesso em sua utilização nos procedimentos cirúrgicos.

O cálculo da concentração de antibióticos no meio é um procedimento que exige cuidados rigorosos, para garantir às estruturas biológicas sua inocuidade, preservando suas características originais. Isso só será alcançado, se utilizarmos dosagens adequadas de antimicrobianos e/ou substância bactericida no meio. Esta é a base para a eleição de determinado fármaco para um meio de conservação, transporte de tecidos e/ou membranas e cultivos celulares.

Os exames microbiológicos dos *swabs* revelaram bacilos Gram negativos e Gram positivos e os fungos *Curvularia spp.* e *Aspergillus spp.* A mesma morfologia foi encontrada na membrana conservada em solução salina a 0,9%.

Para a dosagem da benzilpenicilina utilizada no meio líquido ERS®-04-09-11-16, para conservação de MPBs, foram observadas as recomendações de Panizzutti (1994) que são indicadas para cultura de células, na dose de 62,69 mg/ml (solução de estoque). Atendendo-se ao peso das MPBs, com a primeira formulação do meio em estudo (tabela-2) foi observada morfologia semelhante à encontrada nas amostras de *swab*. Dos microrganismos identificados, para as bactérias Gram positivas registrou-se um percentual de (33,3%), para as Gram negativas (16,7%) e para os fungos *Aspergillus spp.* e *Curvularia* (41,7%) respectivamente. Tais resultados sugerem ausência de sinergismos dos antimicrobianos no primeiro ensaio.

Em experimentos preliminares realizados, onde os antibióticos foram testados separadamente, com o objetivo de diminuir a alta concentração de benzilpenicilina no meio ERS®-04-09-11-16, foram utilizadas baixas dosagens de benzilpenicilina, tendo em vista que com menores concentrações, os produtos de degradação (ácido penicilínico e penicilóico) são produzidos em menores quantidades, com menor efeito tóxico para as células (Panizzutti, 1994).

Outra razão para diminuir a concentração da benzilpenicilina, é que o meio ERS®-04-09-11-16, é menos rico em sua composição, quando comparado com os meios utilizados em culturas celulares. Assim, as concentrações foram fracionadas até alcançar aquela que tivesse capacidade de causar a inibição/morte dos microrganismos contaminantes das MPBs. Com os resultados obtidos nos ensaios preliminares, em que foi identificada a mesma morfologia

bacteriana e fúngica presente nos *swabs*, nova formulação foi realizada, reduzindo-se a dosagem de benzilpenicilina. Nesta nova formulação, os antibióticos foram agrupados (tabela-4), utilizando-se concentrações que variaram de (0,3mg/ml a 2 mg/ml) para a benzilpenicilina, (0,005mg/ml a 0,035mg/ml) para o sulfato de estreptomicina e para anfotericina B (0,005 a 0,030mg/ml). Os resultados dos testes microbiológicos de acordo com a nova formulação estão apresentados nas figuras 1, 2, 3 e 4 e tabela 4. Pode-se observar que com a nova formulação, as concentrações de 2 mg/ml para a benzilpenicilina e 0,035 mg/ml para o sulfato de estreptomicina e 0,030 mg/ml para anfotericina B, foram capazes de causar a morte dos contaminantes e impedir o crescimento bacteriano e fúngico por um período de 90 dias. Para comprovar a ausência de crescimento bacteriano e fúngico, foram realizados repiques em caldo BHI e em placas de Petri, contendo os meios Ágar sangue e *Sabourad*. Tais resultados que comprovam a ausência de crescimento bacteriano e fúngico, foram realizados através de repique em caldo de BHI e em placas de Petri contendo os meios de Agar Sangue e *Sabouraud*, constatados na concentração C-7.



Figura-1. Resultados das inoculações em caldo BHI dos frascos contendo as MPBs conservadas no meio ERS® -04-09-11-16-21 atendendo os tempos da pesquisa. Observar transparência do meio.



Figura-2. Resultados da inoculação em placas de Petri contendo o meio Àgar Sangue. Observar ausência de crescimento bacteriano.

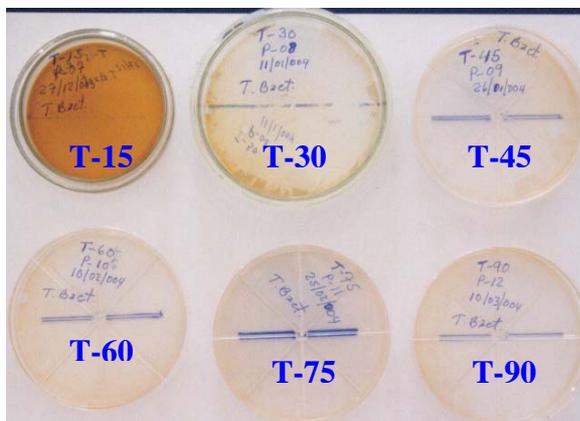


Figura-3. Resultado das sementeiras dos frascos contendo as MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21 em placas de Petri contendo o meio Agar Sabouraud. Observar ausência de crescimento de fungos.

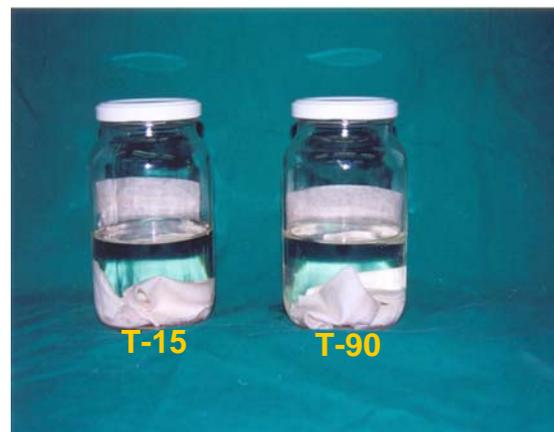


Figura-4. Observar transparência do meio ERS®-04-09-11-16-21 e as características macroscópicas das MPBs nos tempos do estudo.

Tabela-4. Resultados de testes microbiológicos de acordo com as concentrações de antimicrobianos.

Frascos	Antibióticos	Concentrações	Microrganismos
C-1	Benzilpenicilina	0,3 mg/ml	<i>Aspergillus spp</i>
	Sulfato de Estreptomicina	0,005 mg/ml	<i>Curvularia spp.</i>
	Anfotericina B	0,005 mg/ml	Bacilos Gram negativos
C-2	Benzilpenicilina	0,6 mg/ml	<i>Aspergillus spp</i>
	Sulfato de Estreptomicina	0,010 mg/ml	<i>Curvularia spp.</i>
	Anfotericina B	0,010 mg/ml	Bacilos Gram negativos
C-3	Benzilpenicilina	0,9 mg/ml	<i>Aspergillus spp</i>
	Sulfato de Estreptomicina	0,015 mg/ml	<i>Curvularia spp.</i>
	Anfotericina B	0,015 mg/ml	Bacilos Gram positivos
C-4	Benzilpenicilina	1,2 mg/ml	<i>Aspergillus spp</i>
	Sulfato de Estreptomicina	0,020 mg/ml	<i>Curvularia spp.</i>
	Anfotericina B	0,020 mg/ml	Bacilos Gram positivos
C-5	Benzilpenicilina	1,4 mg/ml	<i>Aspergillus spp</i>
	Sulfato de Estreptomicina	0,025 mg/ml	<i>Curvularia spp.</i>
	Anfotericina B	0,025 mg/ml	Bacilos Gram positivos
C-6	Benzilpenicilina	1,7 mg/ml	
	Sulfato de Estreptomicina	0,030 mg/ml	Bacilos Gram positivos
	Anfotericina B	0,030 mg/ml	
C-7	Benzilpenicilina	2 mg/ml	
	Sulfato de Estreptomicina	0,035 mg/ml	
	Anfotericina B	0,035 mg/ml	<i>Negativo</i>

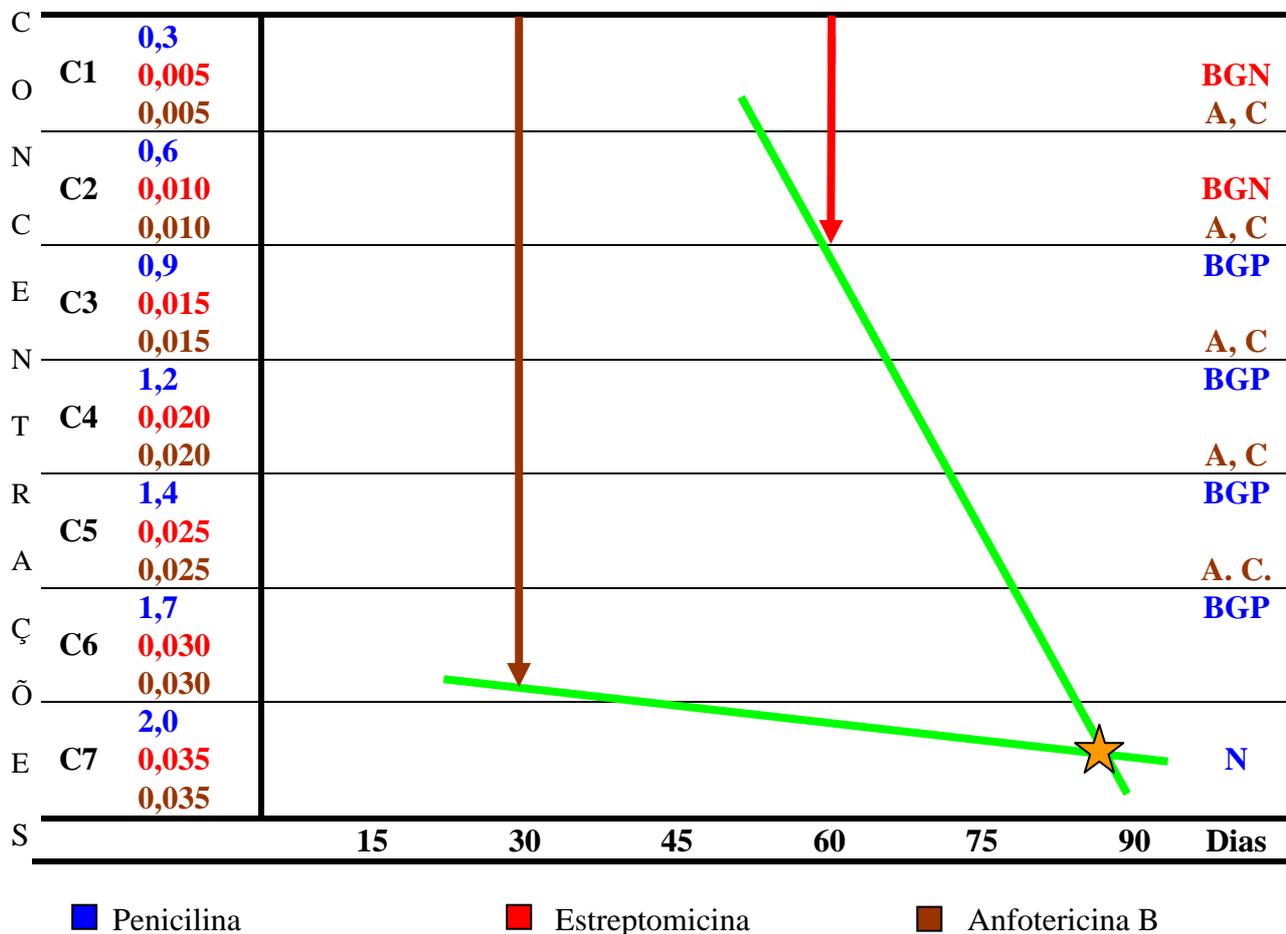
Os resultados indicados na tabela-4 estão de acordo com Araújo et al. (2000), também descritos por Peixoto et al. (1999). O comportamento evidenciado em todas as concentrações utilizadas, conforme análises microbiológicas, indicam resultados idênticos à morfologia das MPBs *in natura* (swab) e aos do grupo controle.

Os resultados apresentados na figura 5 sugerem sinergismo entre os antimicrobianos utilizados na formulação apresentada na tabela-4.

Um dos métodos utilizados para avaliar combinações de fármacos, consiste na curva de tempo-destruição, que avalia as atividades bactericidas e fungicidas, procedendo-se a repiques quantitativos no decorrer do tempo para determinar o número de bactérias remanescentes. Quando os fármacos são testados para uma variedade de concentrações proporcionais, o sinergismo é demonstrado por uma curva côncava, efeito aditivo ou por uma reta conforme Chambers (2003). Tal mecanismo observado no presente experimento, está representado pela intersecção das linhas, apontada pela estrela na figura 5.

Diante da ausência de trabalhos que contemplem a formulação de meios de conservação de MBs que contenham antibióticos, os resultados obtidos no presente trabalho, constituem um ponto de partida para orientar novas pesquisas com tais propósitos.

Figura 5 Efeito sinérgico das concentrações de antimicrobianos no meio ERS®-04-09-11-16-21



Legenda:

AC: *Aspergillus spp*; *Curvularia spp*.

BGN: Bacilos Gram negativos.

BGP: Bacilos Gram positivos.

A glicerina tem sido utilizada como meio de conservação de Membranas Biológicas (MBs) por sua propriedade fixadora e desidratação de ação rápida (Alvarenga, 1992; Meneses, 2002). Quando utilizada como meio de conservação de MBs, sugere-se um período de conservação mínimo de 30 dias antes de sua utilização e recomendam-se exames bacteriológicos periódicos para detecção de contaminantes (Alvarenga, 1992). Daleck (1992; Almeida, 1997; Oliveira e Alvarenga, 1998; Pigatto, 1998 e Rapetti, 2003, protocolaram a

imersão das MPBs em solução fisiológica e tratamento com antibióticos por períodos que variaram de 10 a 20 minutos, antes de sua utilização em procedimentos cirúrgicos.

O meio ERS®-04-09-11-16-21, devido a suas características físico-químicas, mantém as MPBs hidratadas, suas características organolépticas e de inocuidade, preservando também suas características histomorfológicas e biomecânicas. Por não necessitar dos tratamentos indicados pelos autores referenciados acima, uma vez que se apresenta hidratada e inócua, reduz os possíveis riscos de contaminação com tais procedimentos. Além do mais, com a utilização do meio proposto, a conservação das MPBs livres de contaminantes, é garantida por um período de tempo de 90 dias.

4.4 CONCLUSÃO

- ✓ O meio ERS®-04-09-11-16-21, foi capaz de manter as MPBs livres de contaminantes, preservar suas características histomorfométricas e biomecânicas por um período de 90 dias.

4.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO, M.L et al. Uso de membrana amniótica e pericárdio canino como curativo biológico e na reparação do leito receptor para enxertia cutânea autógena: estudo experimental em cães. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, UFRPE, p. 73.

ALMEIDA, E. L; ALVARENGA, J. 1997. Reconstrução do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. In: I Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE, Recife/PE. **Anais do I Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação da UFRPE.** Recife/PE: Imprensa Universitária - UFRPE. 1997, v.1, p. 93.

ALVARENGA, J. (1992). Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. R; BAPTISTA, L. C; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos.** Editora: (FUNEP, Jaboticabal), p. 33-43.

ANDRADE, S.F; GIUFFRIDA, R; RIBEIRO, M.G. Quimioterápicos, Antimicrobianos e Antibióticos. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**, 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 28-29.

AMENDOLA, G. F. Correção de defeito ósseo femoral em cães utilizando implante ósseo cortical homólogo conservado em sal. 2001. Santa Maria. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Cirurgia) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 46p.

ARAUJO, P.F.B. et al. Diferentes técnicas de conservação de pericárdio bovino para utilização em cirurgia reconstrutiva, 2000. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 98, Recife: **Resumos...Recife.** Editora: UFRPE.

BELLENZANI, M. C. R; MATERA, J. M.; GIACÓIA, M. R. Homologous pericardium as a biological dressing for treatment of distal limb wounds in horses: an experimental study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, 13, 4, 238-42, 1998.

BRUN, M.V. et al. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 10. 2002.

CHAMBERS, H. F. Antimicrobianos. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003, cap. 43, 859-889.

COSTA-NETO, J. M. et al. Ação antimicrobiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA, 4, 2000, Recife-PE, **Resumos...Recife:** UFRPE, 2000, p. 97.

CUNRATH, G.S. Pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 120f.

DALECK, C.R; DALECK, C.L.M; FILHO, J.G.P; COSTA NETO, J.M. 1992. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria. 22, 2, p. 179-183.

GARTNER, L.P; HIATT, J.L. **Atlas Colorido de Histologia**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap. 3, p. 413.

GALLO, J.I; POMAR, J.L; ARTIÑANO, E; VAL, F; DURAN, M.D. 1978. Heterologus pericardium for the closure of pericardical defects. **Annals of Thoracic Surgery**, Boston, 26, 2, p. 149-154.

GONÇALVES, G.F. et al.. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina - aspectos macroscópicos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, 6, 1, p. 31-36, 2000.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 1-1465.

OLIVEIRA, V. A; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de eqüinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 28, 4, p. 617-621, 1998.

MAZZANTI, A. et al. Reparação do diafragma de cães com segmento muscular homólogo ortotópico conservado em solução supersaturada de açúcar. 2001. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, 53, 1, p. 21-26.

MENEZES,F.F. et al. Banco de pele: coleta, conservação em glicerina 98% e manutenção. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.9, n.1, p.60-62, 2002.

NEVES, M. B. L; SOUZA, L. F; SALES, M.G, F. **Tratado de Histologia**. Ed. GUANABARA-KOOGAN, S.A. 1997, p.214.

MOTA, F.C.D. et al. Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, n. 2, p. 117-123, 2003.

NEVES, M.B.L; SOUZA, L.F; SALES, M.G.F. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997, p. 214.

PANIZZUTTI, N.R. **Manual de procedimentos técnicos de cultura celular**. São Paulo: Ministério da Agricultura do Abastecimento e Reforma Agrária. 1994

PEIXOTO, A.S. et al. Avaliação fúngica de pele e osso, membrana amniótica e pericárdio conservado em glicerina à temperatura ambiente. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CINÉTICA DA UFRPE, 9. Recife. 1999, **Resumos...** Recife: UFRPE, 1999, p. 22.

PETROPOULUS, P.C; KLEINHEZ, R.J. Experimental use of patch duramater homografts for closure of full-thickness esophageal defects. **Surgery**, St. Louis, 51, 6, p. 793-6, 1962.

PIGATTO, J.A.T. et al. Esofagoplastia cervical em caninos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, 28, 4, p. 617-621, 1998.

RAISER, A.G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães, conservação, assepsias e implantação. **Ciência Rural**, Santa Maria, 31, 1, p. 89-94, 2001.

RAPPETI, J.C. et al. Reconstrução experimental da parede torácica de gatos com implante heterogêneo de cartilagem auricular conservada em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, 6, p. 1089-1094, 2003.

SAFATLE, A.M.V. et al. Implantation of two biological membranes in a corneal micropocket as an experimental model for angiogenesis. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 4, 2002

STOPIGLIA, A. J. et al. Réparation chirurgicale de la paroi thoracique du chien. **Le Point Vétérinaire**, Maison Alford., v. 18, n. 97, 239-243, 1986.

SUBRAHMANYAM, M. Storage of skin grafts in honey. **The Lancet**, London, 341, p. 63-64, 1993.

ZERBINI, E. J. Emprego de válvulas homólogas na cirurgia cardíaca. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CARDIOLOGIA**, 23, 1967. São Paulo, p. 50.

5 AVALIAÇÃO HISTOMORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DA MEMBRANA PERICÁRDICA BOVINA (MPB) CONSERVADA NO MEIO ERS®-04-09-11-16-21 DESTINADA A CIRURGIAS REPARADORAS.

HISTOMORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL EVALUATION OF BOVINE PERICARDIAL MEMBRANE (BPM) CONSERVED IN THE ENVIRONMENT ERS®-04-09-11-16-21 FOR THE PURPOSE OF REPARATION SURGERIES.

RODRÍGUEZ-SALAS, E¹⁰; COELHO, M. C. O.C¹¹; SILVA JUNIOR, V. A¹²; PORTO, A. L. F¹³; PEIXOTO, C. A¹⁴.

RESUMO: Foi realizada avaliação histológica e morfológica de quatro Membranas Pericárdicas Bovinas (MPBs), as quais foram transportadas sob refrigeração, sendo uma *in natura* e três em solução de Clorexidina a 0,05% v/v em diferentes tempos que constituíram os tratamentos, a saber: T-0 (*in natura*, após processamento), T-30 (aos 30 dias), T-60 (60 dias) e T-90 (90 dias). Para os tempos T-30, T-60 e T-90 as MPBs foram conservadas em meio ERS®-04-09-11-16-21. Fragmentos das MPBs foram processados rotineiramente para observação em microscopia óptica e eletrônica. Os resultados histopatológicos evidenciaram manutenção da estrutura das MPBs, apesar de um maior espaçamento entre as fibras colágenas. Os fibroblastos apresentaram vacuolização e necrose em todos os tempos, confirmado pela microscopia óptica e eletrônica. Morfométricamente constatou-se aumento de espessura, tamanho e peso das MPBs nos diversos tempos em relação ao estado *in natura*. De acordo com os resultados, conclui-se que o meio ERS®-04-09-11-16-21 pode ser utilizado como meio de conservação da membrana pericárdica bovina por um período de até 90 dias.

PALAVRAS CHAVES: Membrana biológica, conservação, fibroblasto.

¹¹*Professor Adjunto - UFAC – Doutorando - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Recife – ernestorsa@yahoo.com.br

Professora Adjunta, Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

¹² Professores Adjuntos, Co-Orientadores, Departamento de Morfologia e Farmacologia Animal, UFRPE.

¹³ Professores Adjuntos, Co-Orientadores, Departamento de Morfologia e Farmacologia Animal, UFRPE.

¹⁴ Professora Pesquisadora do Laboratório de Biologia Celular e Ultraestrutura, Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife-PE.

ABSTRACT: Histological and morphometrical evaluation of four Bovine Pericardial Membranes (BPMs) was done. BMPs were transported under refrigeration, one “*in natura*” and three in Clorexidine solution at 0,05% v/v in different timings, constituting the following treatments: T-0 (*in natura*, after processing), T-30 (at 30 days), T-60 (at 60 days) and T-90 (at 90 days). For the timings T-30, T-60 and T-90, BPMs were maintained in the environment ERS®-04-09-11-16-21. Fragments of BPMs were processed in a routine way for observation in optic and electronic microscopy. The histopathology results brought to evidence maintenance of the BPMs’ structure, regardless of a major space between collagen fibers. The fibroblasts presented vacuolization and necrosis at all timings, confirmed by optic and electronic microscopy. An enlargement of thickness, size and weight of the BPMs in the several timings – in relation to “*in natura*” state – was morphometrically proved. In accordance to the results, conclusion is ERS®-04-09-11-16-21 environment can be used as a means of conservation for the bovine pericardial membrane for a period of until 90 days.

KEY-WORDS: Biological Membrane, Conservation, Fibroblast.

5.1 INTRODUÇÃO

Materiais biológicos têm sido utilizados em procedimentos cirúrgicos, tornando-se mais importantes do que os materiais sintéticos, quando comparados com outros tecidos destinados a enxerto, pois têm a vantagem de possibilitar a sua incorporação ao tecido receptor (Daleck et al., 1988).

A membrana pericárdica consiste em uma camada mesotelial mais interna que repousa numa fina camada de tecido conjuntivo frouxo, seguida por uma camada resistente e espessa de feixes colágenos e fibras elásticas que se cruzam em diversos ângulos permitindo, assim como o epicárdio, adaptar-se rapidamente às mudanças no tamanho do coração (Dellmann e Eurell, 1999). Esta membrana biológica tem sido utilizada com maior frequência do que as membranas sintéticas, em procedimentos cirúrgicos, por sua fácil incorporação ao tecido receptor e por possuírem baixa antigenicidade (Daleck et al., 1988; Cunrath, 1999).

Membranas pericárdicas de diferentes espécies têm sido utilizadas na confecção de válvulas cardíacas devido a sua alta resistência e fácil aquisição (Ionescu et al., 1974; Moraes et al., 1976; Schlichter e Kreutzer, 1985; Alvarenga, 1992), no reparo da dura-máter (Parízez et al., 1989), na proteção de suturas pulmonares (Date et al, 1998) e em procedimentos cirúrgicos que visem reparar ou substituir segmentos de órgãos como em esôfago de cães (Mittelstaed et al., 1986; Daleck, 1988), proteção de extensas lesões em membros locomotores de eqüinos (Oliveira e Alvarenga, 1998) e em hérnias incisionais (Cunrath, 1999).

Alguns meios são reportados como conservadores de membranas biológicas e tecidos (Alvarenga, 1992) e são citados aqueles à base de glicerina (Daleck et al, 1992; Pinto Jr. et al., 1995; Almeida, 1996; Paulo, 1997; Sartori Filho et al., 1997; Pigatto et al., 1998; Bellenzani et al., 1998; Gonçalves, 2000; Menezes, 2002), glutaraldeído (Piza 1997; Cunrath, 1999), soluções supersaturadas de açúcar (Mazzanti 2000) ou sal (Brun et al. 2002), mel (Subrahmanyam, 1993; Amendola et al 2000; Amendola, 2001) e soluções anti-sépticas à base de timerosal, clorexidina e iodo-povidona (Alvarenga, 1992; Peixoto, 1999; Costa Neto, 2000; Aceto et al., 2002).

Dentre os meios utilizados na conservação de membranas e estruturas biológicas, a glicerina tem sido a mais freqüente, devido ao baixo custo, fácil manipulação, poder anti-séptico e permitir seu armazenamento a temperatura ambiente (Alvarega, 1992). Apesar de não ter sido referenciado nenhum inconveniente na utilização desta substância para

conservação de membrana pericárdica bovina (MPB), Castillero (1996) relaciona a ocorrência de seroma, inflamação, fístulas e micro-abcessos em cirurgia reparadora de parede abdominal e a correção de extensas hérnias incisionais, em seres humanos, a este meio de conservação. Tais complicações, segundo o mesmo, são decorrentes da utilização de glicerina como meio de conservação para o pericárdio.

Além da utilização de meios de conservação de membranas biológicas, meios de preservação à base soro fisiológico e antibióticos têm sido propostos na manutenção de MPBs (Petropoulos e Kleinz, 1962; Almeida, 1996). Entretanto, o inconveniente da utilização destes meios é o curto período de tempo que estes podem abrigar tais membranas sem produzir efeitos deletérios à estrutura das mesmas.

Nos organismos vivos os processos metabólicos são mantidos através do aporte de nutrientes, gases e eletrólitos indispensáveis ao funcionamento celular. Com a supressão desta condição proveniente do sacrifício de animais para consumo das populações, as células são privadas de tais condições. Desta forma, para preservar as características macroscópicas, biomecânicas e estrutura tecidual das MPBs, por um maior período, é necessário dispor de meios de conservação, que possibilitem sua utilização em procedimentos cirúrgicos e produção de biopróteses.

Assim, este trabalho teve como objetivo realizar uma avaliação histopatológica e morfométrica das MPBs mantidas sob refrigeração, por um período de 90 dias, no meio ERS®-04-09-11-16-21¹⁵, constituído de água, sais, fonte de carboidrato e antibióticos.

¹⁵ PI0400935-5

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Membranas pericárdicas de quatro bovinos da raça Nelore com idade aproximada de 48 meses, machos, com peso médio de carcaça de 450 Kg, foram coletadas no matadouro de São Lourenço da Mata no estado de Pernambuco. Três membranas foram transportadas em solução resfriada de água destilada contendo Clorexidina¹⁶ a 0,05% v/v até o Laboratório de Implantes Biológicos (LIB) do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), enquanto que a membrana *in natura* não recebeu meio de transporte, apenas o resfriamento.

Posteriormente, três MPBs, exceto aquela transportada sob refrigeração, foram colocadas sobre panos de campos esterilizados para retirada da solução de transporte e lavados com água bidestilada. Todas as MPBs foram seccionadas em 10 fragmentos de 2 cm², com auxílio de placa de vidro esterilizada. As MPBs que foram transportadas em solução de Clorexidine a 0,05% v/v foram imersas em cubas de inox contendo água bidestilada por três tempos de 30 minutos, para retirada de vestígios da solução de transporte. Em seguida, os fragmentos imersos em vidros esterilizados contendo 65 ml do novo meio ERS®-04-09-11-16-21 constituído de água, sais, e antibióticos, com doses que variaram para benzilpenicilia (0,3mg/ml a 2mg/ml), sulfato de estreptomicina (0,005 a 0,035mg/ml) e anfotericina B (0,005mg/ml a 0,035mg/ml). As MPBs foram mantidos sob refrigeração a 12°C ± 2°C para garantir tempos de 30, 60 e 90 dias. No final de cada tempo foram determinados o volume do meio, peso e as dimensões médias dos fragmentos.

A avaliação biométrica dos fragmentos foi realizada em quatro tempos: T-0 (*in natura*), T-30 (30 dias), T-60 (60 dias) e T-90 (90 dias). Todos os fragmentos foram pesados em balança eletrônica com três casas decimais¹⁷, o tamanho medido com paquímetro (METER)¹⁸ e a espessura foi aferida com auxílio de medidor de espessura (Starret®)¹⁹ com resolução de 0,01mm.

Para avaliação histopatológica, foram coletados fragmentos das MPBs nos tempos T-0, T-30, T-60 e T-90 que foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados

¹⁶ ChoroHex² – Gluconato de Clorexidina – Jhonson Wax.

¹⁷ Balança Eletrônica Modelo BG-200, Marca® GEHAKA

¹⁸ Paquímetro (METER)

¹⁹ Medidor de espessura (Starret®)

em Hematoxilina e Eosina (HE) e tricrômico de Masson e analisados em microscópio óptico (Olympus BX 51)²⁰. A avaliação histopatológica nos tempos: T-0, T-30, T-60 e T-90 visava verificar a influência do meio ERS®-04-09-11-16-21 sobre os fibroblastos e arranjo das fibras colágenas das MPBs neste meio conservadas.

Para as avaliações em microscopia eletrônica, as amostras foram fixadas por uma hora em solução de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio a 0,1M, com pH 7,2. Depois da fixação, as MPBs foram lavadas duas vezes com uma solução de tampão fosfato de sódio a 0,1M, com pH 7,2 e fixadas em uma solução tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,2, desidratada em acetona e incluída em resina Epon 812²¹ (Compania Sigma, St. Louis, MO). A polimerização foi feita a 60°C por dois dias. Cortes ultrafinos foram colocados em grades de malha de cobre e contra-corados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas por meio de microscópio eletrônico ZEISS 109²².

²⁰ Microscópio Olympus

²¹ Epon 812 – Compania Sigma, St. Louis, MO

²² ZEISS – Microscópio Eletrônico

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas pericárdicas foram avaliadas histopatologicamente nos tempos T-0, T-30, T-60 e T-90 para verificar a influência de meio ERS-04-09-11-16-21 sobre os fibroblastos e arranjo das fibras colágenas.

No T-0 foi observado arranjo típico de tecido conjuntivo denso não modelado na membrana pericárdica caracterizado pelo alinhamento paralelo entre as fibras e presença de fibroblastos orientados no mesmo sentido desta fibra, além de capilares. Apesar dos fibroblastos apresentarem morfologia típica em T-0 através da Microscopia Óptica (M O), as fotomicrografias eletrônicas (ME) revelam fibroblasto vacuolizados e com organelas degeneradas (Figura 1a, 1b e 1c).

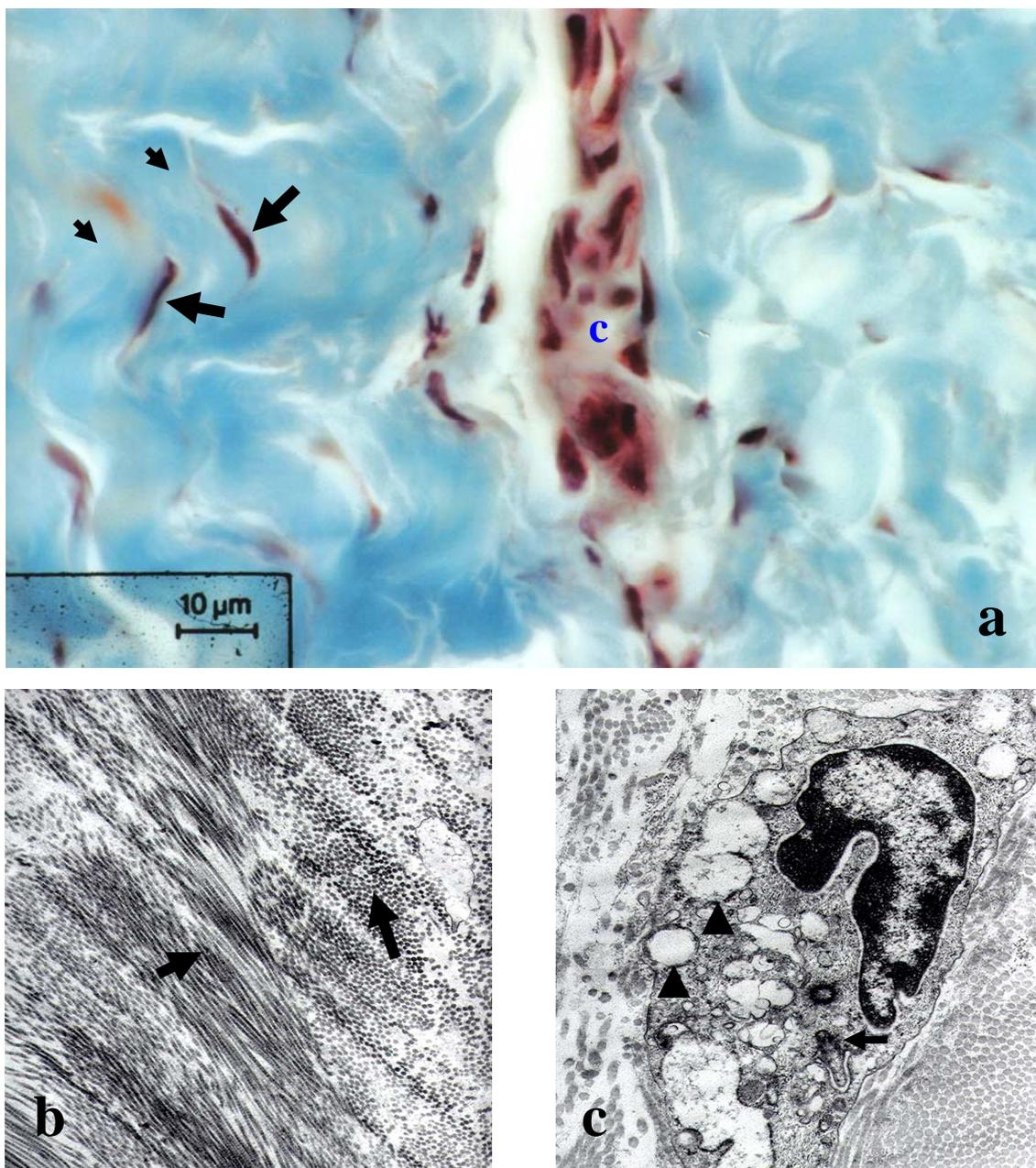


Figura 1. Membrana pericárdica bovina (MPB). **Figura 1a.** MPB em T-0. Notar fibras colágenas paralelas (setas curtas), fibroblastos (seta larga) e capilar (C). 1000x. Fotomicrografia eletrônica da Membrana pericárdica bovina (MPB). MPB em T-0. **Figura 1b.** Notar fibras colágenas paralelas (setas curtas) e em cortes transversais (setas longas) 7.000X. **Figura 1c.** Observe fibroblasto com inúmeros vacúolos (cabeça de setas) e organelas degeneradas (seta curtas) 12.000X.

As MPBs preservadas durante 30 dias mantiveram o arranjo das fibras colágenas, porém foi observado discreto espaçamento entre estas. Os fibroblastos mantiveram a mesma

relação com as fibras descrita em T-0, contudo, foi observada vacuolização e núcleo picnótico indicativo de necrose destas células (Figura 2a, 2b e 2c).

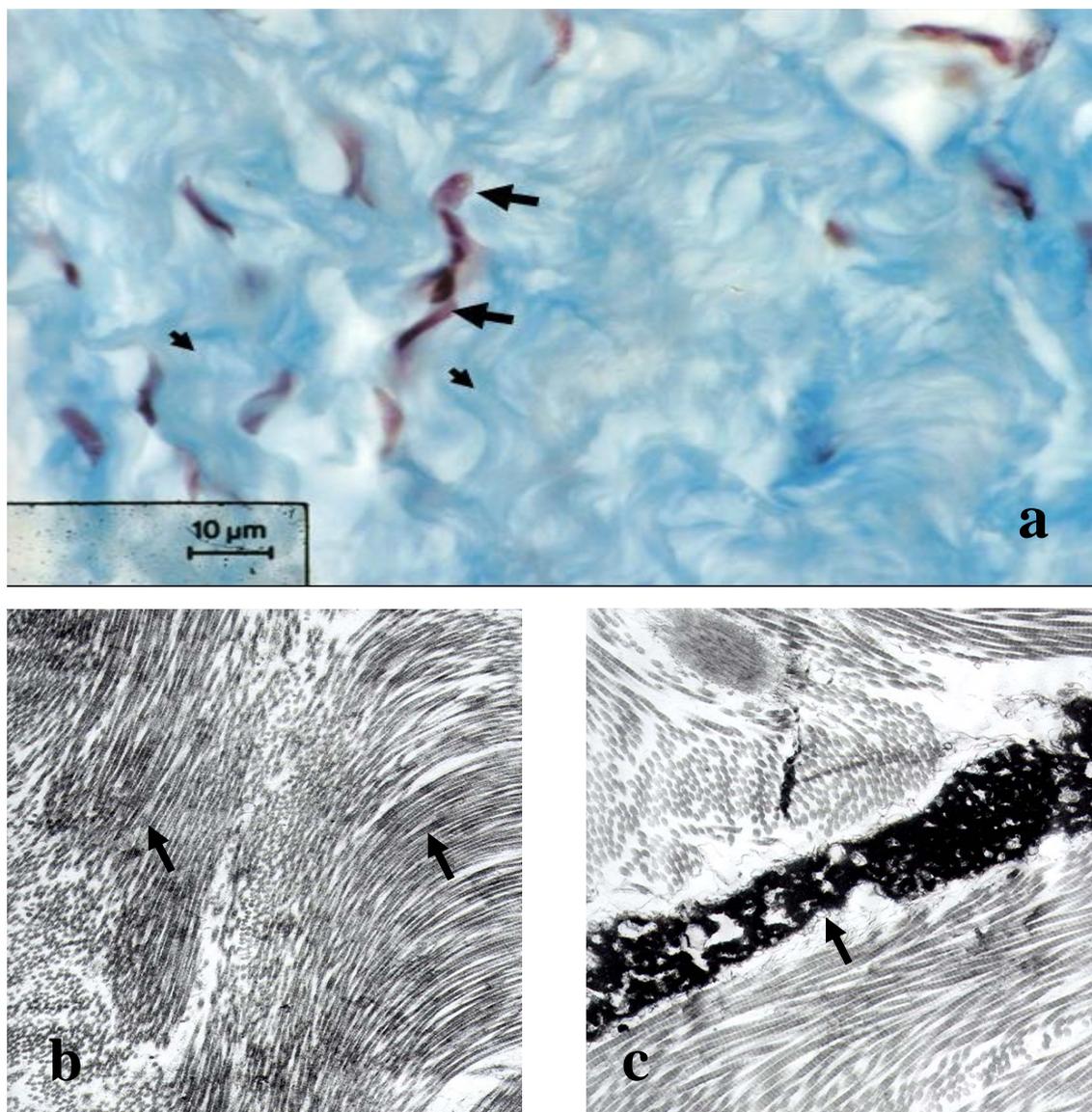


Figura 2. Membrana pericárdica bovina (MPB). **Figura 2a.** MPB em T-30. Fibras colágenas espaçadas (setas curtas) e fibroblastos associados (seta larga). 1000x. Fotomicrografia eletrônica da Membrana pericárdica bovina (MPB). **Figura 2b.** Fibras colágenas com manutenção arranjo paralelo típico de tecido conjuntivo frouxo (setas curtas) 7.000X. **Figura 2c.** Fibroblastos picnóticos (seta larga) 12.000X.

Após 60 dias de conservação das MPBs constatou-se o mesmo arranjo descrito para as fibras colágenas aos 30 dias. A análise histológica e ultraestrutural dos fibroblastos após 60 dias de conservação das MPBs, revelaram resultados muito semelhantes aos anteriores, com exceção do maior espaçamento entre as fibras colágenas (Figura 3a, 3b e 3c).

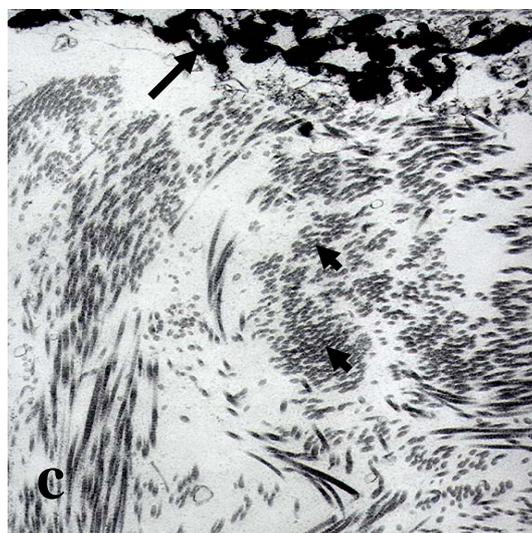
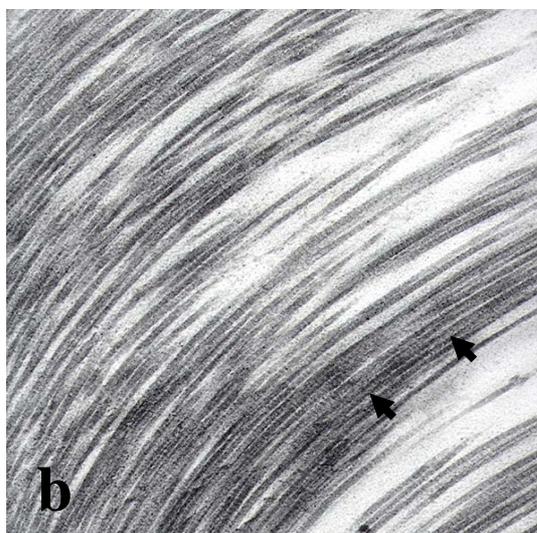
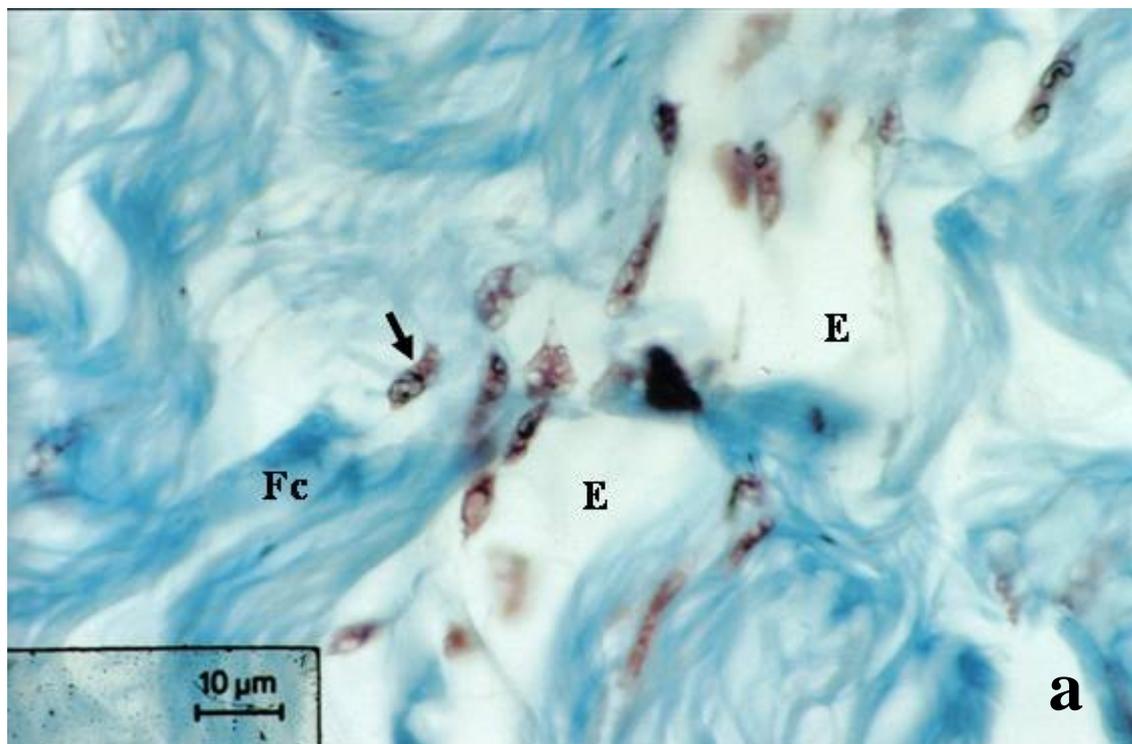


Figura 3. Membrana pericárdica bovina (MPB). **Figura 3a.** MPB em T-60. Observar espaçamento (E) entre as fibras colágenas (Fc) e fibroblastos vacuolizados associados (seta). 1000x; **Figura 3b.** Notar fibras colágenas paralelas (setas curtas) em cortes longitudinais 20.000X. **Figura 3c.** Observe fibroblasto necrótico (seta longa) e desarranjo de fibras colágenas em corte transversal (seta curtas) 7.000X.

Aos 90 dias, as MPBs conservadas no meio ERS-04-09-11-16-21® seguiram o mesmo padrão morfológico descrito anteriormente para os tempo T-30 e T-60 (Figura 4a, 4b e 4c).

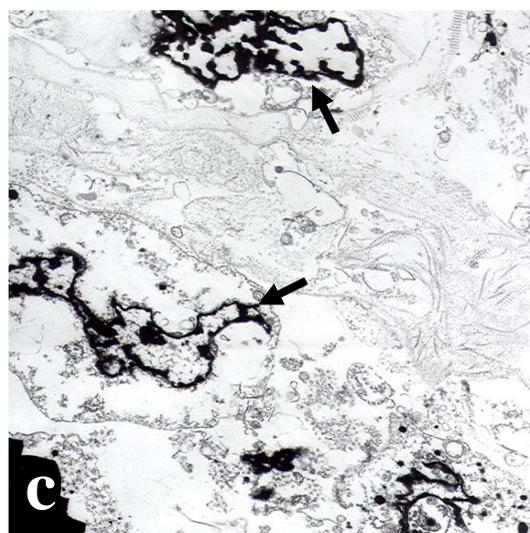
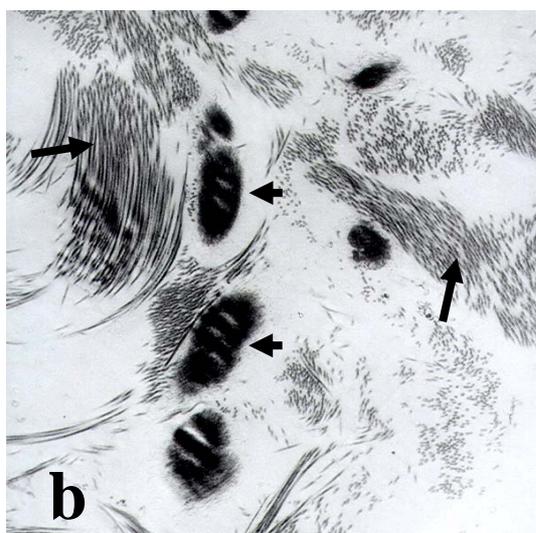
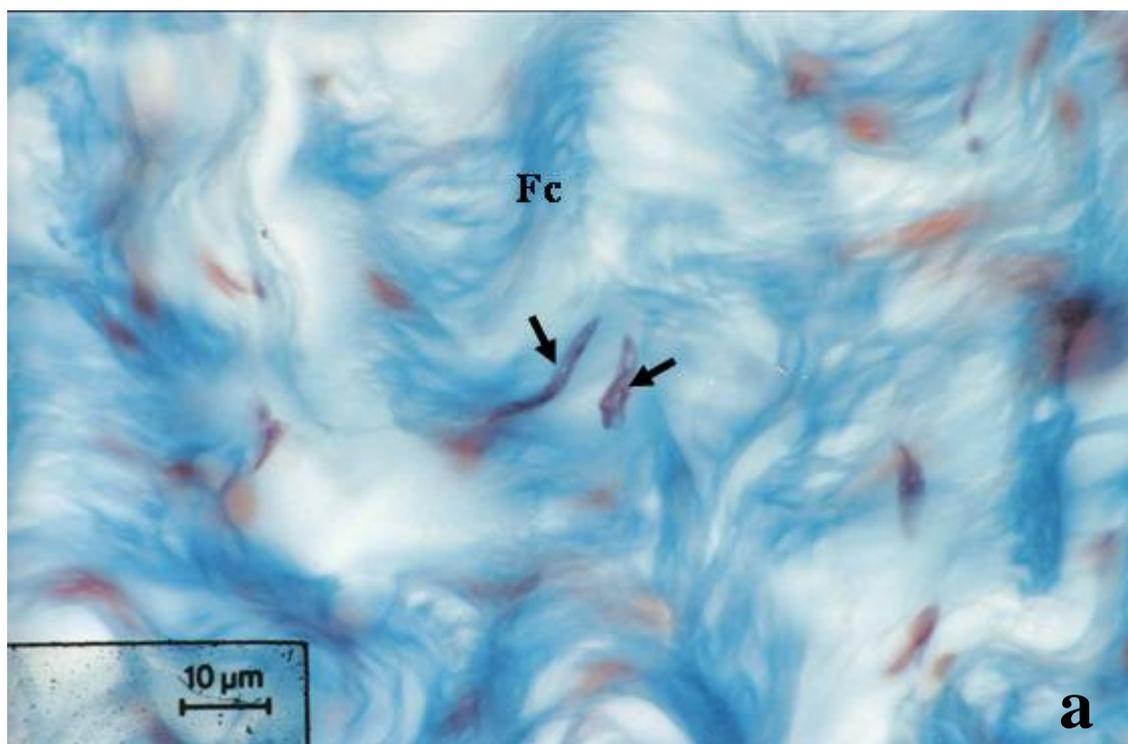


Figura 4. Membrana pericárdica bovina (MPB). **Figura 4a.** MPB em T-90. Detalhe de Fibroblasto vacuolizado (setas) associado às fibras colágenas (Fc). 1.000x. **Figura 4b.** Observe espaçamento entre as fibras colágenas (setas largas), fibras elásticas (setas curtas). 4.400x. **Figura 4c.** Fibroblastos picnóticos (setas largas) 4.400x.

O fibroblasto é uma célula de origem mesenquimal que sintetiza os componentes fibrilares (colágeno e elastina) e não-fibrilares (glicoproteínas e proteoglicanos) da matriz celular do tecido conjuntivo (Moraes e Joazeiro, 2005). Quando em intensa atividade, estas células apresentam núcleo volumoso e elíptico, cromatina frouxa e um ou mais nucléolos evidentes;

prolongamentos citoplasmáticos irregulares que se insinuam entre as fibras depositadas durante a atividade de síntese de matriz extracelular, o que não foi observado nas avaliações microscópicas, em função das alterações microscópicas apresentadas pelo fibroblasto.

Entre os fatores que induzem perdas da capacidade proliferativa, função e morte dos fibroblastos destacam-se os ambientais, químicos e físicos. A hipóxia desencadeia mecanismos que podem levar desde a perda da capacidade proliferativa dos fibroblastos até morte celular por apoptose ou por necrose. A inibição da respiração mitocondrial *in vitro*, desencadeia na maioria dos fibroblastos, aparecimento de sinais morfológicos e bioquímicos condizentes com apoptose, mimetizando as fases iniciais de apoptose, seguida de intensa lise celular, característica de necrose (Moraes e Joazeiro, 2005).

No presente experimento não foram encontrados fibroblastos com características morfológicas típicas de células vivas. Apesar do meio ERS®-04-09-11-16-21 estar dentro dos padrões de osmolaridade equivalentes ao plasma sangüíneo, além de nutrientes que por ventura manteriam os fibroblastos vivos, é possível que o tempo de processamento das MBPs antes de seu acondicionamento no meio tenha provocado a morte dos fibroblastos por hipóxia o que justifica os achados em MO e ME.

Os resultados dos volumes do meio ao final de cada tempo são apresentados na tabela 1. Nesta, observa-se que houve uma redução gradativa no volume do meio ERS®-04-09-11-16-21 nas proporções de cinco mililitros (7,7%) em T-30, 13 mililitros (20%) em T-60 e 14 mililitros (21,5%) em T-90, em relação ao volume inicial. É bastante provável que a redução do volume do meio de conservação das MBPs tenha ocorrido devido à incorporação de água aos componentes da matriz extracelular.

Na matriz extracelular existem elementos não fibrilares representados pelas glicoproteínas estruturais não-colagênicas e os proteoglicanos (Alberts et al., 2004). Os proteoglicanos caracterizam-se pela presença de proteína central, que além de servir como molde para a ligação dos glicosaminoglicanos (GAGs), permite seu trânsito intracelular. Esta proteína central dos proteoglicanos possui domínios específicos que lhe permite interação com diversos açúcares, os glicosaminoglicanos (GAGs), além de uma gama de arranjos associados a diversas funções no organismo (Alberts et al., 2004; Gomes, 2001). Os GAGs são carboidratos formados por uma estrutura dissacarídica básica, com cadeias lineares de comprimento variável, que apresentam cargas negativas devido à presença de radicais carboxílicos e sulfatados. Estes radicais garantem a estas moléculas a capacidade de retenção de água nos tecidos (Gomes, 2001). Portanto, segundo os mesmos autores, a alta densidade de

cargas negativas atraindo uma nuvem de cátions, que são osmoticamente ativos, resultando na incorporação de grandes quantidades de água na matriz (Alberts et al. 2004). A temperatura de manutenção das MPMs no supracitado meio ($12\pm 2^\circ\text{C}$) parece haver contribuído para a manutenção da integridade dos glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanas da matriz celular das MPBs durante todos os tempos do estudo.

Tabela 1. Volumes finais, absorção e percentual do meio ERS®-04-09-11-16-21 absorvido pelas MPBs conforme os tempos de estudo.

Volume final (ml)	T-30 (dias)		T-60 (dias)			T-90 (dias)		
	Absorção (ml)	Percentual de volume absorvido	Volume final (ml)	Absorção (ml)	Percentual de volume absorvido	Volume final (ml)	Absorção (ml)	Percentual de volume absorvido
60	5	7,7	52	13	20	51	14	21.5

Os resultados das análises de variância com regressão e os valores médios e desvios-padrão para as variáveis morfométricas: área, peso e espessura das MPBs são apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Nestas, observa-se que a área e o peso das MPBs apresentaram aumento linear em relação ao tempo com tendência quadrática significativa ($P < 0,01$).

Tabela 2. Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados médios - QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - CV) para as variáveis físicas: área, peso e espessura das MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21

Fontes de variação	GL	Área (cm^2)		Peso (g)		Espessura (mm)	
		QM	F	QM	F	QM	F
Tempo	3	4,1433	31,31 **	0,0192	12,30 **	274,0458	2,30
Linear	1	11,9508	90,43 **	0,0283	18,11 **	119,9025	1,01
Quadrático	1	0,3354	2,54	0,0292	18,68 **	702,1125	5,89 *
Cúbico	1	0,1436	1,09	0,0002	0,11	0,1225	0,00
Resíduo	16	0,1322		0,0016		119,2500	
CV(%)		11,34		16,78		24,44	

* Significativo a 5% de probabilidade

** Significativo a 1% de probabilidade

Tabela 3. Valores médios \pm desvios-padrão para as variáveis físicas: área, peso e espessura das MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21

Variáveis	Tempo (dias)			
	0	30	60	90
Área (cm ²)	2,00 \pm 0,00	3,10 \pm 0,19	3,57 \pm 0,27	4,15 \pm 0,65
Peso (g)	0,15 \pm 0,02	0,26 \pm 0,04	0,29 \pm 0,03	0,25 \pm 0,06
Espessura (mm)	35,50 \pm 0,00	49,40 \pm 18,37	51,80 \pm 9,71	42,00 \pm 6,75

Na figura 5 pela equação de regressão obtida, estima-se que esse incremento linear foi de 0,023047 cm para cada unidade de tempo aumentada. Este resultado indica que os tempos testados não foram suficientes para proporcionar estimativa da área máxima da MPB, fato este observado em T-90, onde nota-se ainda uma tendência de crescimento. Porém deve haver um ponto para estabilização.

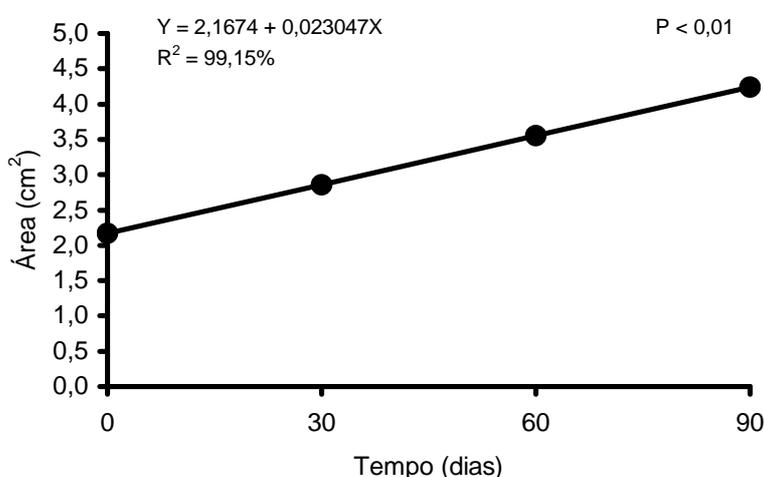


Figura 5 Efeito do tempo sobre a área das MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21

Na figura 6 observa-se que o peso da MPB em função do tempo apresentou tendência quadrática significativa ($P < 0,01$), atingindo valor máximo estimado de 0,291g no tempo ótimo aos 58 dias, diminuindo sua taxa de crescimento posteriormente. Este comportamento sugere que em um primeiro momento, ocorreu uma absorção dos componentes do meio pela matriz extra celular da MPB até o seu engurgitamento.

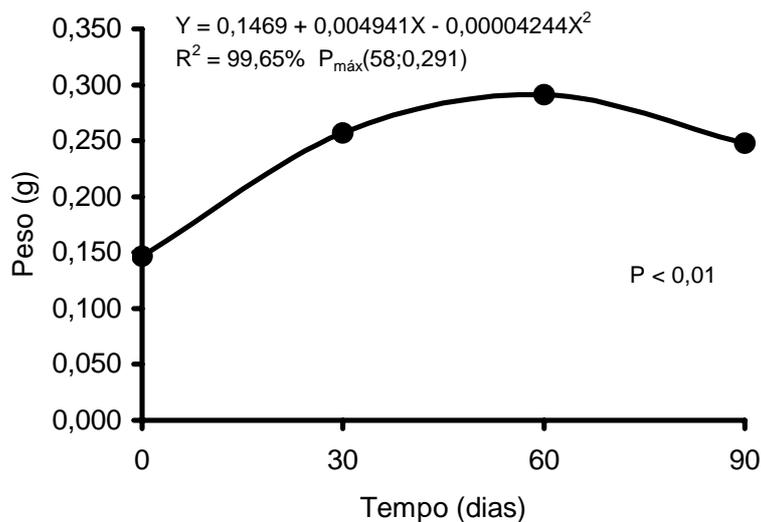


Figura 6 Efeito do tempo sobre o peso membranas MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21

De modo análogo ao peso, a espessura física da membrana pericárdica bovina apresentou comportamento quadrático significativo ($P < 0,05$) em função do tempo, cujo efeito está expresso na figura 7. Verifica-se que a espessura aumentou até o tempo estimado de 51 dias, atingindo valor máximo de 52,28 mm, para então decrescer com o efeito de maiores tempos.

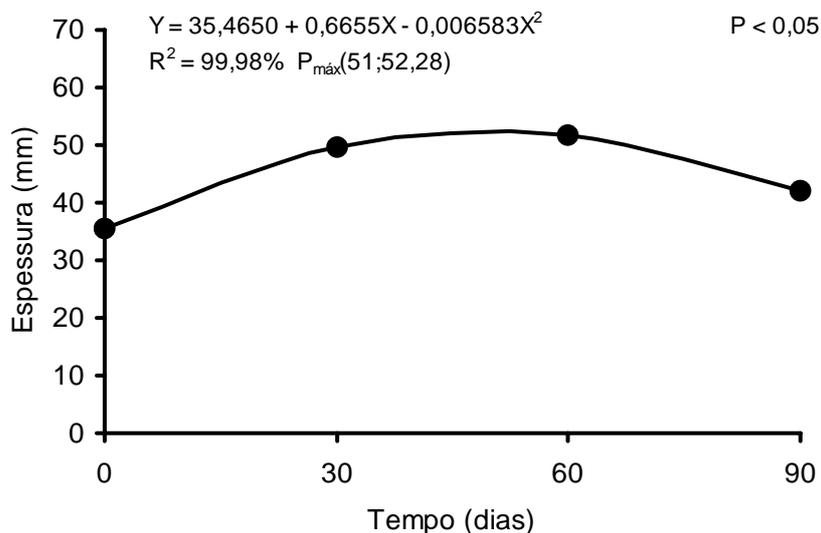


Figura 7 Efeito do tempo sobre a espessura física das MPBs.

De acordo com os resultados expressos na tabela 3 e figuras 5, 6 e 7, foram constatados aumentos na área, peso e espessura das MBPs conservadas no meio ERS®-04-

09-11-16-21 ao longo dos tempos estudados. Devido à ausência de fibroblastos vivos nas amostras de MBPs, avaliadas microscopicamente, não podemos correlacionar os aumentos descritos anteriormente à atividade sintética de fibroblastos. Por outro lado, a justificativa mais plausível para tal fenômeno estaria relacionada à incorporação dos componentes do meio utilizado, as glicosaminoglicanas e peptidioglicanas da matriz extracelular. Esta justificativa baseia-se na redução gradativa dos volumes do meio de conservação onde estavam contidas as MBPs e no espaçamento observado entre as fibras colágenas ao longo dos tempos de avaliação. Por outro lado, a justificativa mais plausível para tal fenômeno estaria relacionada à incorporação dos componentes do meio utilizado, as glicosaminoglicanas e peptidioglicanas da matriz extracelular. Esta justificativa baseia-se na redução gradativa dos volumes do meio de conservação onde estavam contidas as MBPs e no espaçamento observado entre as fibras colágenas ao longo dos tempos de avaliação. Alguns estudos têm demonstrado o crescimento *in vitro* de fibras semelhantes às de amilóide a partir de protofilamentos de amilina (Stolz et al., 2000; Goldsbury et al., 2001). Assim, possivelmente o aumento da área das MBPs após mantidas no meio de conservação utilizado, poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela formação de fibras colágenas a partir da reunião espontânea de protofilamentos presentes nas MBPs.

5.4 CONCLUSÕES

- ✓ O meio ERS®-04-09-11-16-21 é capaz de preservar o arranjo das fibras colágenas das MPBs nos tempos estudados ;
- ✓ As MPBs conservadas no meio ERS®-04-09-11-16-21, podem ser utilizadas a partir do 13º de conservação, até um período de 90 dias;
- ✓ O meio ERS®-04-09-11-16-21 promoveu incremento de área, peso e espessura no período de até 90 dias;
- ✓ O meio ERS®-04-09-11-16-21 está provido de condições que permitem sua utilização como meio de transporte de MPBs.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO, M.L. et al. Uso de membrana amniótica e pericárdio canino como curativo biológico e na reparação do leito receptor para enxertia cutânea autógena: estudo experimental em cães. 2002. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife.

ALMEIDA, E.L. Reconstituição do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. 1996. 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula.** 3 ed., Artmed, Porto Alegre, 2004. p. 1-1292.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. B; BAPTISTA, L. C; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**, Jaboticabal: FUNEP, 1992, p. 33-43.

AMENDOLA, G.F. et al. Traqueoplastia em coelhos com centro frênico conservado em mel. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 1, p. 11, 2000. Suplemento.

AMENDOLA, G.F. Correção de defeito ósseo femoral em cães utilizando implante ósseo cortical homólogo conservado em sal. 2001. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. .

BELLENZANI, M.CR; MATERA, J.M; GIACÓIA, M.R. Homologous pericardium as a biological dressing for treatment of distal limb wound in horses – experimental study. *Acta Cirúrgica Brasileira*, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 238-242, 1998.

BRUN, M.V. et al. Traqueoplastia em cães com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p. 60-67, 2002.

CASTILLERO, J.T. Diretor do Hospital de Cirurgia Especializada da “Caja del Seguro Social – Panamá, 1996, **Comunicação Pessoal.**

COSTA NETO, J.M.C. et al. Ação antimicrobiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo-povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA, 4, 2000, Recife. **Resumos...**Recife: UFRPE, 2000, p. 97.

CUNRATH, G. Pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. 1999, 115f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração: Biologia Médica – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo.

DALECK, C.R. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: Esofagoplastia -“estudo experimental”. **Ciência Veterinária Jaboticabal** (Boletim de publicação de resultados de Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP), v.2, n.2, 1988.

DALECK, C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1992.

DATE, H. et al. Bilateral lung volume reduction surgery via median sternotomy for severe pulmonary emphysema. **Annals Thoracic Surgery**, Boston, v. 65, p. 939-942, 1998.

DELMANN, H.D; EURELL, J. 1999. **Text Book of Veterinary Histology**, 5. ed. Baltimore: Lip-pincott William & Willians. P. 1-380.

GOMES, L. Proteoglicanos. In: CARVALHO, H. F; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. Edit. Manole Ltada, cap. 19, p. 221-224, 2001.

GONÇALVES, G.F. Ceratoplastia lamellar homóloga em cão com conservação em solução supersaturada de açúcar ou glicerina. Santa Maria, 2000, 54f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria.

GOLDSBURY C; AEBI U; FREY P. Related Articles, Links. Visualizing the growth of Alzheimer's A beta amyloid-like fibrils. **Trends Molecular Medical**. v. 7, n. 12, p.582, 2001.

IONESCU, M.I. et al. Long-term evaluation of tissue valves. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, St. Louis, v. 68, p. 361-379, 1974.

MAZZANTI, A. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar envolvido ou não com segmento omental para reparação do diafragma de cão. 2000. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MENEZES,F.F. et al. Banco de ele: coleta, conservação em glicerina 98% e manutenção. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 2002, v.9, n.1, p.60-62.

MITTELESTAEDT, W. et al. Hérnias incisionais: revisão de 228 casos operados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Revista Paulista de Medicina**, v.104, n 3, p. 117-127, 1986.

MORAES, C.R. et al. Válvulas cardíacas de fáschia lata, duramáter e pericárdio (resultados de 55 casos operados). **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. Rio de Janeiro, v. 3, p. 60-62, 1976.

MORAES, S.G; JOAZEIRO, P.P. **Fibroblasto**. In: CARVALHO, H.F; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células: Uma Abordagem Multidisciplinar**, Edit. Manole Ltada, 2005, cap. 3, p. 22-33.

OLIVEIRA, V. A; ALVARENGA, J. Membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 617-621, 1998.

PAULO, N.M. Estudo comparativo entre membrana amniótica de equino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25% no tratamento de feridas cutâneas

experimentais no cão. 1997.64f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PARÍZEC, J. et al. Xenogeneric pericardium as a dural substitute in reconstruction of suboccipital dura mater in children. **Journal of Neurosurgery**, St. Louis, v. 70, p. 905-909, 1989.

PEIXOTO, A.S. et al. Avaliação fúngica de pele, osso, membrana amniótica e pericárdio conservado em glicerina à temperatura ambiente. 1999. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. UFRPE, 10, 1999, Recife. **Resumos...** Recife: UFRPE, p.123.

PETROPULUS, P.C; KLEINHENZ, R.J. Experimental use of patch dura-mater homografts for closure of full-thickness esophageal defects. **Surgery**, Saint Louis, v. 51, n.6, p. 973-976, 1962.

PIGATTO, J.A.T. et al. Esofagoplastia cervical em canídeos com enxerto homólogo de cartilagem conchal preservada em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p.617-621, 1998.

PINTO JUNIOR, H.S; ALVARENGA, J; IWASAKI, M. Banco de ossos: coleta, preservação e implantação em cães. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 15, n. 87, 1995.

PIZA, M.A. Reticulação de pericárdio bovino com glutaraldeído: efeito da temperatura, tempo de reação e concentrações. 1997, 63f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Carlos, São Carlos.

SARTORI-FILHO, R; GANDOLFI, W; BANDARRA, E.P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-76, 1997.

SCHLINDER, A; KREUTZER, G.O. Autologous pericardial valved conduit. **Revista Latinoamericana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular Infantil**. Buenos Aires, v. 1, p. 43-48, 1985.

STEEL, R. G. D.; TORRE, J. H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.

STOLZ, M.; STOFFLER, D.; AEBI, U.; GOLDSBURY, C. Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 131, p.171-180, 2000.

SUBRAHMANYAN, M. Storage of skin grafts in Money. **The Lancet**, London, v. 341, p. 63-64, 1993.

6 AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA DA MEMBRANA PERICÁRDICA BOVINA (MPB) CONSERVADA NO MEIO ERS®-04-09-11-16-21.

BIOMECHANICAL EVALUATION OF THE BOVINE PERICARDICAL MEMBRANE (BPM) CONSERVED IN THE ENVIROMENT ERS®-04-09-11-16-21.

RODRÍGUEZ-SALAS, E²³; COELHO, M. C. O. C²⁴; SILVA JUNIOR. V. A²⁵; PORTO, A. L. F²⁶; SOARES, E²⁷.

RESUMO: Quatro MPBs de animais da raça Nelore, com idade média de 4,5 anos e peso de carcaça de 450 Kg foram coletadas para avaliação biomecânica através de testes realizados no Centro do Couro e do Calçado Albano Franco no município de Campina Grande, Paraíba – Brasil, para avaliação da espessura, força máxima, tensão e alongamento, através de dinamômetro computadorizado EMIC, atendendo a norma ASTM-638 da American Society for Testing and Materials (2001). Os tratamentos estudados foram: T-0 (*in natura*, após processamento), T-30 (aos 30 dias), T-60 (aos 60 dias) e T-90 (aos 90 dias), concluindo-se que o meio testado foi capaz de conservar e proporcionar aumento das características avaliadas, exceto quanto à tensão, preservando suas características biomecânicas por um período de até 90 dias.

PALAVRAS CHAVES: Membrana biológica, conservação, fibroblasto.

²³*Professor Adjunto - UFAC – Doutorando - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Recife – ernestorsa@yahoo.com.br

²⁴ Professora Adjunta, Orientadora, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

²⁵ Professores Adjuntos, Co-Orientadores, Departamento de Morfologia e Farmacologia Animal, UFRPE.

²⁶ Professores Adjuntos, Co-Orientadores, Departamento de Morfologia e Farmacologia Animal, UFRPE.

²⁷ Estatístico – EMEPA – Empresa de Pesquisa Agropecuária - PB

ABSTRACT: Four BPMs of animals of the Nelore race, with an average age of 4,5 years and carcass weight of 450 kg, were collected for biomechanical evaluation through tests carried out at the *Centro do Couro e do Calçado Albano Franco* (Albano Franco Leather and Footwear Center) in the city of Campina Grande, Paraíba – Brasil, evaluating thickness, maximum force, tension and elongation. The procedure was accomplished through a computerized dynamometer EMIC, respecting norm TM-638 of the American Society for Testing and Materials (2001). Treatments studied were: T-0 (*in natura*, after processing), T-30 (at 30 days), T-60 (at 60 days) and T-90 (at 90 days), coming to the conclusion that the tested environment was capable of preserving and providing augmentation of the evaluated characteristics, except for the tension, preserving their biomechanical characteristics major for a period of 90 days.

KEY-WORDS: Biological, Membrane, Conservation, Fibroblast.

6.1 INTRODUÇÃO

Meios de conservação tem sido objeto de estudo para preservação de membranas e tecidos biológicos.

Segundo Petropoulos e Kleinhez (1962) e Almeida (1996) há meios que preservam as características de Membranas Biológicas (MBs) por curtos períodos de tempo. Já, Alvarenga (1992), Ramos et al. (2001), Cunrath (1999), (Raiser et al., 2000) e Brun et al. (2002) citam a conservação destas características por maiores tempos.

Materiais biológicos quando comparados aos sintéticos, possuem vantagem quanto a incorporação e baixa antigenicidade (Daleck et al, 1988). Materiais sintéticos devem possuir como qualidade: não ser fisicamente modificados pelo tecido receptor, ser quimicamente inertes, não induzir a reação inflamatória tipo corpo estranho, não possuir efeito carcinogênico, não causar reação alérgica ou de hipersensibilidade e ser fabricado na forma requerida com baixo custo. Esses critérios são também considerados para outros tipos de materiais (Amid et al., 1994; Cristoforoni et al., 1996). Já Cerise (1974) e Alvarenga (1992) indicam que o material utilizado deve ser de baixo custo de produção, fácil manipulação, promover o crescimento dos tecidos do hospedeiro, permitir que o tecido cicatricial tenha força igual ao tecido normal, serem resistentes às infecções, não causar inflamação exacerbada, não promover formação de aderências e fístulas e não ter suas características físicas alteradas pelos líquidos tissulares. Ser flexível, inerte, poroso, resistente, manter a integridade celular, impedir o crescimento de microorganismos, e ainda, aumentar a resistência à tração dos tecidos e atuar por um período de tempo prolongado, impedindo a decomposição dos tecidos.

Os materiais de próteses sintéticas, como as telas de poliéster e polietileno são dispendiosos; por este motivo proibitivos para a grande maioria da população de países em desenvolvimento. O uso de tais materiais pode acarretar riscos de erosão, infecção e fístulas (Larson, 1986 e Prevel, 1995), o que pode ocasionar uma série de complicações.

A substituição de tecidos no organismo é um dos principais desafios da cirurgia atual. Esses procedimentos são necessários na perda de estrutura anatômica, em caso de defeitos congênitos e seqüelas de trauma ou cirurgia oncológica (Andrews, 1988). Leber et al., (1998) reportaram que complicações decorrentes do uso de material prostético para reconstrução da

parede abdominal podem ser conseqüência das propriedades físicas de tal material. Para Giroto (2003), as bases para reconstituição da parede abdominal devem seguir os critérios de DiBello et al., (1996), prevenindo a eventração, promovendo suporte muscular dinâmico e aproximação livre de tensão.

Quanto aos materiais biológicos de procedência animal, destaca-se importância para a Membrana Pericárdica Bovina (MPB). As células aqui encontradas são os fibroblastos achatados e organizados em fileiras paralelas (Ham, 1991). É constituída por uma parte parietal e uma visceral. A parietal reveste a lâmina fibrosa à qual está intimamente ligada. A visceral cobre o coração e parte dos grandes vasos (Getty, 1975; Neves, 1997).

O meio ERS®-04-09-11-16-21, constituído de água, sais, fonte de carboidrato e antibióticos, com osmolaridade próxima do plasma, proporciona a hidratação das MPBs, preserva suas qualidades biomecânicas e inocuidade torna-se uma nova alternativa para conservação de MPBs.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a espessura, força máxima, tensão e alongamento do pericárdio bovino conservado no meio ERS®-04-09-11-16-21 em períodos de (30, 60 e 90 dias).

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Membranas pericárdicas de oito bovinos da raça Nelore com idade aproximada de 48 meses, todos machos, com peso médio de carcaça de 450 Kg, foram coletadas no matadouro de São Lourenço da Mata no estado de Pernambuco. Das oito membranas, apenas quatro foram selecionadas para análises. A MPBs *in natura* foi transportada em isopor contendo e as outras três foram transportadas em solução resfriada de água destilada contendo Clorexidina²⁸ a 0,05% v/v até o Laboratório de Implantes Biológicos (LIB) do Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Posteriormente, estas membranas, exceto a *in natura*, foram colocadas sobre panos de campos esterilizados para retirada da solução de transporte e lavadas com água bidestilada. As MPBs foram delimitadas com placas de vidro esterilizadas de 13 cm x 20 cm e enseguida imersas em cubas de aço inox devidamente esterilizadas em tempos de 30, 60 e 90 minutos para retirada da solução de transporte e imediatamente imersas no meio ERS®-04-09-11-16-21. Finalmente foram transportadas para o Centro do Couro e do Calçado Albano Franco no município de Campina Grande, Paraíba – Brasil sob a mesma forma para avaliação biomecânica em T-0 (*in natura*, após processamento), T-30, T-60 e T-90 aos 30, 60 e 90 dias respectivamente de conservação no meio proposto. As quatro MPBs coletadas foram classificadas atendendo a dimensão da placa de vidro de acordo com seu tamanho, classificadas em grandes (G), média (M) e pequenas (P). Cada frasco foi identificado com o número da MPB. Para esta classificação, estabeleceram-se alguns critérios em relação à dimensão da placa de vidro (13 x 20 cm) e o tamanho da MPB. Foi classificada com G aquela em que se encaixava com grande facilidade na placa de vidro, como aquela que se encaixava na placa de vidro com algum esforço e como P aquela que somente se encaixava na placa com a secção dos extremos. Em todas as amostras foram realizados cortes em planos verticais, horizontais e transversais. Atendendo a norma técnica ASTM-D638 (2.001) foram confeccionados 12 corpos de prova (figura 1) utilizados para avaliação biomecânica das MPBs. No final dos tempos T-30, T-60 e T-90. A avaliação da força máxima, tensão e alongamento foi realizada avaliação de força máxima, tensão e alongamento através

²⁸ ChoroHex² – Gluconato de Clorexidina – Jhonson Wax.

dinamômetro (EMIC²⁹). As análises estatísticas obedeceram aos procedimentos indicados por Steel e Torres, 1960; Snedecor e Cochran, 1967 e Statistical, Analysis System, 1996.

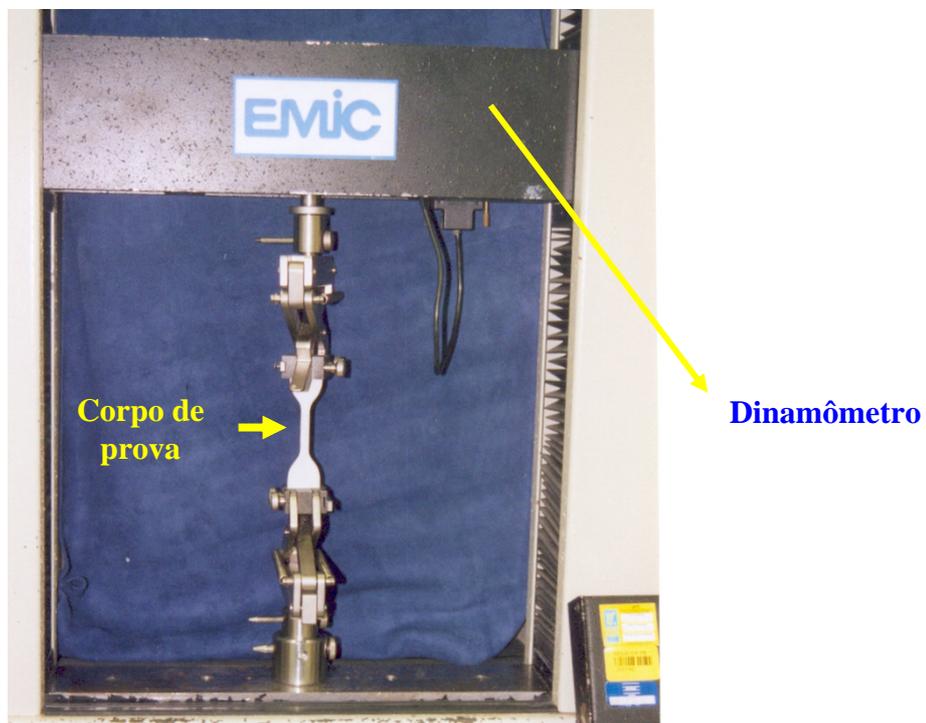


Figura 1. Dinamômetro computadorizado.

²⁹ Dinamômetro computadorizado EMIC®

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na matriz extracelular celular da MPB existem elementos não fibrilares representados pelas glicoproteínas estruturais não-colagênicas e os proteoglicanos (Alberts et al., 1997). Os glicosaminoglicanos (GAGs) são carboidratos formados por uma estrutura dissacarídica básica, com cadeias lineares de comprimento variável que apresentam cargas negativas devido à presença de radicais carboxílicos e sulfatados. Estes radicais garantem a estas moléculas a capacidade de retenção de água nos tecidos (Gomes, 2001).

Os proteoglicanos caracterizam-se pela presença de uma proteína central que serve como molde para a ligação dos glicosaminoglicanos (GAGs). Esta proteína central possui domínios específicos que lhe permite interação com diversos açúcares, além de uma gama de arranjos associados a diversas funções no organismo (Alberts et al., 1997; Gomes, 2001).

Os resultados das análises de variância com regressão (Quadrados médios-QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - CV) para espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a MPB estão apresentados na tabela 1, cujos dados revelam que houve efeito do quinto grau do tempo, com significância de 1% sobre a espessura e tensão a que foi submetida. O tempo também teve efeito cúbico significativo a 1% sobre a força máxima com efeito linear a 5% sobre o alongamento.

Tabela 1. Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados médios -QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - CV) para espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a Membrana Pericárdica Bovina (MPB).

Fontes de Variação	GL	Espessura (mm)		Força máxima (N)		Tensão (N/mm ²)		Alongamento %	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Tempo	6	0,6240	283,02**	762,3297	7,64**	114,5009	6,80**	129,2963	1,79
Linear	1	0,1560	70,76**	555,5314	5,57 *	5,9360	0,35	394,0734	5,45*
Quadrático	1	1,5588	707,04**	5,7483	0,06	325,2459	19,30**	10,7963	0,15
Cúbico	1	0,5101	231,34**	3.338,2621	33,47**	53,8722	3,20	37,2960	0,52
4º grau	1	0,7209	326,98**	142,5074	1,43	102,0746	6,06	14,4372	0,20
5º grau	1	0,7822	354,79**	20,9503	0,21	187,4644	11,13**	43,4173	0,60
6º grau	1	0,0159	7,21 *	510,9788	5,12 *	12,4122	0,74	275,7577	3,82
Resíduo	14	0,0022	-	99,7410	-	16,8492		72,2497	-
CV(%)		7,37		23,78		35,14		20,89	

* Significativo a 5% de probabilidade

** Significativo a 1% de probabilidade

Na tabela 2 estão apresentados os valores médios com respectivo desvio-padrão para espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a Membrana Pericárdica Bovina. O comportamento desses dados foi expresso por meio de equações de regressão, com exceção da variável alongamento que não foi afetado pelo aumento do tempo. Os valores médios referentes à variável alongamento não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$), os quais variaram de $36,87 \pm 5,58\%$ a $46,16 \pm 12,10\%$, denotando-se tendência de estabilidade com 46,16% a partir dos 60 dias. Tais resultados são indicativos de que em T-60 os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos demonstraram índices de saturação dos componentes do meio em estudo.

Tabela 2 Resultados das análises de variância com regressão (Quadrados médios - QM, valores de F, significância e coeficientes de variação - CV) para espessura, força máxima, tensão e alongamento a que foi submetida a Membrana Pericárdica Bovina (MPB).

Variáveis	Tempo (dias)			
	0	30	60	90
Espessura (mm)	0,34 ± 0,07	0,39 ± 0,06	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,01
Força máxima (N)	47,14 ± 16,42	29,80 ± 4,76	65,07 ± 6,40	35,91 ± 4,24
Tensão (N/mm ²)	19,41 ± 10,30	11,66 ± 1,34	5,96 ± 0,72	12,63 ± 1,82
Alongamento (%)	36,87 ± 5,58	43,10 ± 9,87	46,16 ± 12,10	46,16 ± 12,10

A análise de regressão revelou que a espessura da MPB apresentou comportamento cúbico significativo, aumentando a partir de 13 dias com valor mínimo de 0,06 mm, significativamente em função do aumento do tempo até aproximadamente 65 dias, atingindo a espessura de 1,42 mm, para então diminuir consideravelmente, como se observa na figura 5. A temperatura de 12±2°C utilizada na conservação das MPBs no novo meio ERS®-04-09-11-16-21, foi capaz de preservar os glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos da matriz extracelular da membrana em estudo (Albert et al., 1997; Gomes, 2001). Estes açúcares carregados negativamente, são responsáveis pela incorporação de cátions, água e açúcar, componentes do meio, mecanismo que ocorre provavelmente sob influência da temperatura de conservação na MPB no meio (12±2°C). Na medida em que ocorre saturação destes componentes da matriz extracelular pelos elementos constituintes do meio, também ocorre espaçamento das fibras colágenas das MPBs.

Os resultados encontrados para espessura, força máxima e alongamento satisfazem ao exigido por Cunrath (1999) garantido sua utilização na confecção de válvulas. Com relação à tensão, os resultados foram semelhantes ao encontrado por Piza (1997), que encontrou valores inferiores ao convencional padrão Braile para a confecção de válvulas cardíacas.

Na figura 2, referente a MPB, a espessura em função do tempo apresentou tendência cúbica significativa ($P < 0,01$) atingindo valor mínimo de 0,06 mm aos 13 dias e máximo de

1,42 mm aos 66 dias. Tais resultados indicam que houve um processo de adaptação da MPB ao meio, iniciando a absorção do mesmo aos 13 dias, atingindo seu valor máximo de absorção aos 66 dias. Os resultados máximos de 1,42 mm foram bastante superiores aos indicados por Cunrath (1999) que afirma que as melhores medidas de espessura para confecção de biopróteses é rigorosamente medida entre 0,25 mm e 0,35 mm.

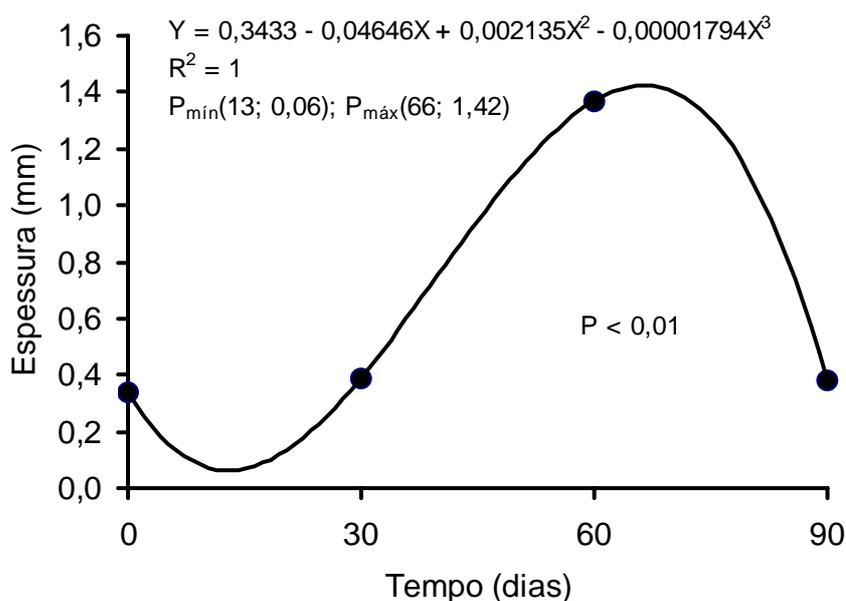


Figura 2. Efeito do tempo sobre a espessura da MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.

Na figura 3, referente a MPB, a força máxima a que foi submetida em função do tempo apresentou tendência cúbica significativa ($P < 0,01$) a partir de 19 dias com valor mínimo de 23,86 N, e atingiu valor máximo estimado de 68,41 N aos 68 dias. O declínio inicialmente observado nesta figura, poderia estar relacionado ao período de adaptação das MPBs ao novo meio e à temperatura de conservação ($12 \pm 2^\circ\text{C}$). Passado esse período de adaptação, inicia-se o processo de incorporação dos componentes do meio aos glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos da matriz extracelular da membrana. Em consequência da absorção de água e componentes do meio em estudo pela matriz extracelular da MPB, estes dois indicadores seriam responsáveis pela diminuição da força de tensão.

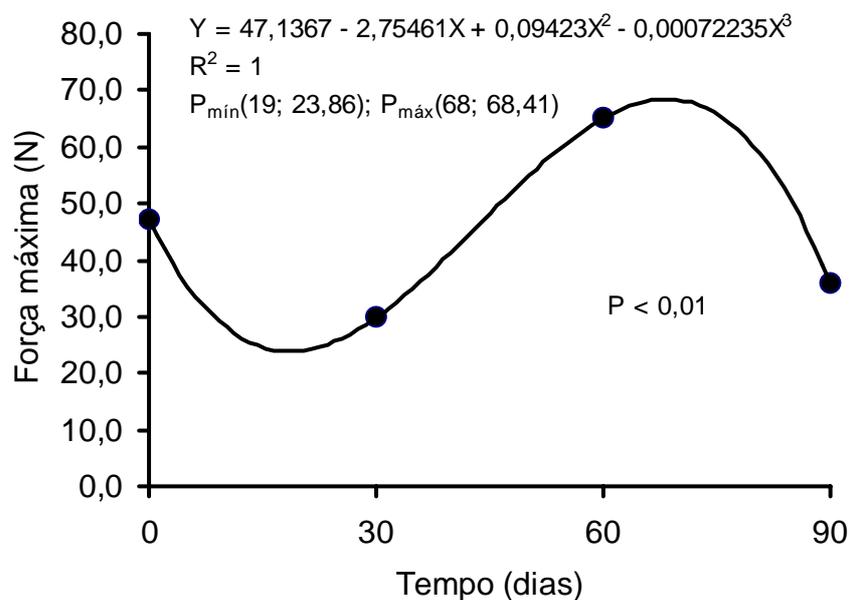


Figura 3. Efeito do tempo sobre a força máxima a que foi submetida à MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.

Na figura 4, referente a MPB, a tensão máxima a que foi submetida em função do tempo, apresentou tendência cúbica significativa ($P < 0,05$). Ao contrário do comportamento das variáveis mecânicas espessura e força máxima verificou-se que a tensão diminuiu à medida que o tempo aumentava, porém até 56 dias, atingindo valor mínimo estimado de $7,44 \text{ N/mm}^2$. Este resultado demonstra que a tensão, em N/mm^2 , apresenta comportamento inverso ao da espessura e força máxima a que foi submetida essa membrana.

Da mesma forma que ocorreu com a espessura, a MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21 registrou valores maiores de tensão do que aquela reportada como ideal por Cunrath (1999), que encontra-se em torno de $1,8 \text{ Kgf/mm}^2$ ou $17,65 \text{ N/mm}^2$ ou superior, de modo a adequar esse valor em razão direta com o diâmetro do anel da válvula a ser montada.

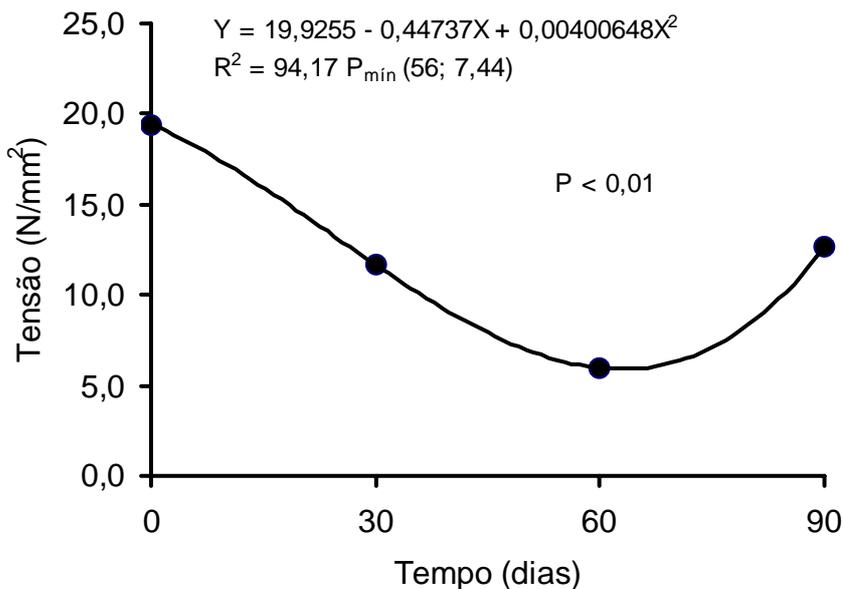


Figura 4. Efeito do tempo sobre a tensão a que foi submetida à MPB conservada no meio ERS®-04-09-11-16-21.

As MPBs coletadas foram classificadas atendendo o tamanho em grandes (G), médias (M) e pequenas (P). É provável que a queda de tensão da MPB observada em T-60, guarde relação com sua classificação (P) e à absorção de água e componentes do meio em estudo, pela matriz extracelular (tabela 3).

O desempenho biomecânico das MPBs, acontece em função da absorção dos componentes do mesmo. Devido a fatores físico-químicos, em que as altas densidades de cargas negativas osmoticamente ativas dos glicosaminoglicanos e proteoglicanos, permitem a incorporação de grande quantidade de água e constituintes do meio à matriz extracelular. Tal mecanismo gera pressão e/ou turgor, o que faz com que a MPB resista a forças compressoras e de tensão (Alberts et al., 1997; Gomes, 2001).

Tabela 3. Volumes finais, absorção e percentual do meio absorvido pela MPB conforme os tempos de estudo.

Volume final (ml)	T-30 (dias)		Volume final	T-60 (dias)		Volume final	T-90 (dias)	
	Absorção	Percentual de Volume absorvido		Absorção	Percentual de Volume absorvido		de volume absorvido	%
240	20	7,7	226	34	20	204	56	21,5

Analisando conjuntamente todos os resultados, verificou-se que ocorreram aumentos significativos das variáveis relacionadas com a resistência biomecânica, sem entretanto observar-se aumento no alongamento. Estudos têm demonstrado o crescimento *in vitro* de fibras semelhantes às de amilóide a partir de protofilamentos de amilina (Stolz et al., 2000; Goldsbury et al., 2001). Por outro lado, o aumento da área, espessura, força de tensão e alongamento das MPBs após mantidas no meio de conservação utilizado, por um período de até 90 dias, poderia também ser explicado, pela formação de fibras colágenas a partir da reunião espontânea de protofilamentos presentes nas MPBs.

Assim sugere-se a utilização da MPB conservada no meio ERS®04-09-11-16-21 em procedimentos cirúrgicos de cavidades que necessitem força de tensão sobre o tecido a reconstituir (Leber, et al., 1998; Larson, 1986). O novo meio além de manter as MPBs hidratadas e inócuas, permite sua utilização com períodos mínimos de conservação de 13 e 19 dias, e máximos de 68 a 90 dias. Já Alvarenga (1992) utilizando a glicerina como meio de conservação sugere um tempo mínimo de 30 dias para utilização de MPBs, e ainda assim, mediante a realização prévia de exames microbiológicos para detectar possíveis contaminações.

6.4 CONCLUSÕES

- ✓ O melhor período para utilização das MPBs conservadas no meio ERS®04-09-11-16-21 esta entre 13 e 19 dias (período mínimo) e 68 e 90 dias (período máximo);
- ✓ O novo meio ERS®04-09-11-16-21 foi também capaz de proporcionar aumento da espessura, força máxima e alongamento das MPBs, nele conservadas, por um período de até 90 dias. Vale ressaltar que, mesmo observando-se uma redução da tensão a que foram submetidas as MPBs em função do tempo, estas poderão ainda ser utilizadas em procedimentos cirúrgicos diversos (reconstituição de cápsulas articulares, herniorrafias, cirurgia reparadora de extensos traumatismos com perda de tecido conjuntivo, entre outros).

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACETO, M.L. et al. Uso de membrana amniótica e pericárdio canino como curativo biológico e na reparação do leito receptor para enxertia cutânea autógena: estudo experimental em cães. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, UFRPE, p. 73.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 1997. p. 949-973.

ALMEIDA, E.L. Reconstituição do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. 1996. 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C. B; BAPTISTA, L. C; MUKAI, L. S. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**, Jaboticabal: FUNES, 1992, cap. 2, p. 33-42.

AMID, P.K et al. Experimental evaluation of a new composite mesh with the selective property of incorporation to the abdominal wall without adhering to the intestines. **Journal Biomedical Materials Research**, Hoboken, V. 28, p. 373-375, 1994.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standar Test Method for Tensile Properties of Plastic** - ASTM-D638, Philadelphia, 2.001.

ANDREWS JM. Biomateriais em cirurgia plástica. In: MÉLEGA J.M, ZANINI AS, PSILLAKIS J.M. **Cirurgia plástica reparadora e estética.** 3. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1988, p. 111-118.

ARAUJO, P.F. et al. Diferentes técnicas de conservação de pericárdio bovino para utilização em cirurgia reconstrutiva. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2000, Recife. **Resumos...Recife**,: UFRPE, 2000.

BRUN, M.V. Traqueoplastia em caso com pericárdio equino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 7, suplemento, p. 58, 2002.

CERISE, E.J. et al. The use os mersilene mesh in repair of abdominal wall hernias. **Annals od Suregery**, Philadelphia, v. 181, p. 728-734, 1974.

CRISTOFORONI, P.M et al. Adhesion formation after incisional hernia repair: a randomized porcine trial. **American Surgery**, New York, V. 62, p. 935-938, 1996.

COSTA NETO. et al. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino cconservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n. 4, p. 697-703, 1999)

CUNRATH, G. Pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. 1999, 115p. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração: Biologia Médica – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo.

DALECK, C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1992.

DALECK, C.R. Esofagoplastia cervical em cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina. “estudo experimental”. **Veterinária e Zootecnia, São Paulo**, v. 2, p. 74, 1990.

DALECK, C.R. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: Esofagoplastia- “estudo experimental”. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v.2, n. 2, 1988.

DELMANN, H.D; EURREL, J. **Textbook of Veterinary Histology**. 5 ed. Baltimore: Lippincott William & Willians, 1999, p. 1-380.

DIBELLO, J.N; MOORE, J.H. Sliding myofascial flap of the rectus abdominus muscles for the closure of recurrent ventral hernias. **Plastic Reconstruction surgery**, Baltimore, 1996, v. 98, p. 464-469.

GETTY, R. G. Generalidades sobre o coração e os vasos sanguíneos. In: **Anatomia dos Animais Domésticos**, 5. ed, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1975, cap. 11, p. 153.

GIROTTO, J.A. et al. Recalcitrant abdominal wall hernias: long-term superiority of autologous tissue repair. **Plastic Reconstruction Surgery**, Baltimore, 2003, v. 112, p. 106-14.

GOLDSBURY C; AEBI U, FREY P. Related Articles, Links. Visualizing the growth of Alzheimer's A beta amyloid-like fibrils. **Trends Molecular Medical**, v. 7, n. 12, p.582, 2001.

FAULK, W.P. Human amnion as adjunct in wound healing. **The Lancet**, London, v. 31, p. 1156-1157, 1980.

GOMES, L. Proteoglicanos. In: CARVALHO, H. F; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula**. 2001. São Paulo: Manole, cap. 19, p. 221-224.

HAM, D. C. **Histologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 128-131.

LARSON, G.M; HARROWER, H.W. Plastic mesh repair of incisional hernias. **American Journal of Surgery**, New York 135: 559-563, 1986.

LEBER, G.E. et al. Long-term complications associated with prsotetic repair of incisional hernias. **Archives Surgery**, Chicago, v. 133, p. 378-382, 1998.

MAZZANTTI, M. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar envolvido ou não com segmento omental para reparação do diafragma do cão. Santa

Maria, RS, 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 2000.

NEVES, M. B. L; SOUZA, L. F; SALES, M.G, F. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997, p.214.

PETROPOULUS, P.C; KLEINHEZ, R.J. Experimental use of patch duramater homografts for closure of full-thickness esophageal defects. **Surgery**, St. Louis, v. 51, n. 6, p. 793-796, 1962.

PREVEL C.D. et al. Small intestinal submucosa: utilization for repair of rodent abdominal wall defects. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, 1995; 35: 374-80.

PIGOSSI, N.A. A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental. 1967, 36f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 17, p.263-278, 1971.

RAO, T.V; PRASAD, D.S; RAO, N. Bovine amnion as a biologic dressing. **Indian Veterinary Journal**, Masdras, v. 57, p. 1036-1038, 1980.

RAMOS, J.A.C. et al. Resistência física do pericárdio conservado em glicerina. In: 5 JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA: CINQUENTENARIO DO CNPq, 2001. Recife. **Resumo....p. 272**.

RAISER, A.G. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4. 2000, Goiânia.....**Resumos** [s.n.], Goiânia.

RAISER, A.G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães: conservação, assepsia e implantação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 89-94, 2001.

ROBSON, M.C. et al. Amniotic membranes as a temporary wound dressing. **Surgery, Gynecology and Obstetrics**, Chicago, v. 136, p. 904-906, 1973.

SARTORI FILHO, R.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E.P. Emprego de membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-76, 1997.

SAS INSTITUTE. User's guide: statistics. Versão 6:12. Cary, USA: North Carolina State University, 1996, CD-ROM.

SNEDECOR, G.R; COCHRAN, W.G. **Statistical Methods**. Sixt Edition, Iowa, USA: The Iowa State University Press Ames, 1967, 593p.

STEEL, R. G. D.; TORRE, J. H. **Principles and procedures of statistics**, New York: McGraw-Hill, 1960. 481 p.

STOLZ, M.; STOFFLER, D.; AEBI, U.; GOLDSBURY, C. Monitoring biomolecular interactions by time-lapse atomic force microscopy. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 131, p.171-180, 2000.

SUBRAHMANYAN, M. Storage of skin grafts in honey. **The Lancet**, London, v. 341, p. 63-64, 1993.