



repetido
016 PE

Artigo Original

Bancos de Pele II

Seleção de Doadores – Captação, Processamento e Armazenamento dos Tecidos

Marisa R. Herson

Médica Responsável – Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas/Cirurgia Plástica – FMUSP.

Monica B. Mathor

Pesquisadora Responsável – Setor de Banco de Tecidos – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares de São Paulo – IPEN.

Marcus Castro Ferreira

Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras – FMUSP.

Introdução

Neste segmento serão abordados os aspectos éticos, legais e clínicos relacionados à seleção dos doadores, aspectos técnicos quanto à captação do tecido cutâneo, técnicas de processamento, conservação e armazenamento.

Leis e Normas

A disponibilização de tecidos humanos para transplante passa a ser regulamentada no Brasil, em fevereiro de 1997, pela Lei nº 9.434¹, cujo conteúdo estabelece critérios para a retirada de tecidos para transplante ou tratamento de doadores *in vivo* ou *post mortem*. A lei estabelece que a retirada de tecidos, órgãos ou partes do corpo humano *post mortem* para transplante ou tratamento deve ser precedida de diagnóstico de morte encefálica, realizado por dois médicos não participantes da equipe de remoção e transplante, baseado em critérios clínicos e tecnológicos predefinidos.

Inicialmente, propunha-se a doação presumida de órgãos e tecidos para qualquer indivíduo que não houvesse declarado em vida sua vontade em contrário. No entanto esta proposta gerou reação negativa na população em geral e em 22 de outubro de 1999 foi publicada medida provisória permitindo que cônjuge, mãe ou filhos de doador potencial pudessem manifestar-se a favor ou contrariamente à doação, quando na ausência de manifesto em vida quanto à doação por parte do falecido. Hoje é praxe a consulta familiar e sua autorização para a doação específica de cada órgão ou tecido.

Algumas penalidades são previstas na Lei 9.434: remoção de tecidos órgãos ou partes do corpo de pessoa ou cadáver em desacordo, reclusão de dois a seis anos e multa; crime praticado em doador vivo com prejuízo de suas funções, etc., reclusão de três a 10 anos e multa; compra ou venda de

tecidos, partes ou órgãos do corpo humano, reclusão de três a oito anos e multa; realização de transplantes ou enxertos de tecidos que tenham sido obtidos em desacordo com a Lei, reclusão de um a seis anos; recolher, transportar, guardar ou distribuir partes do corpo humano obtido em desacordo com esta lei, reclusão de seis meses a dois anos; realizar transplante em desacordo, detenção de seis meses a dois anos.

Em 1997 (Decreto Lei 2.268)² é estabelecido o Sistema Nacional de Transplantes (SNT) que é responsável em gerenciar, em nível nacional, a captação e distribuição de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para finalidades terapêuticas (exceto sangue, espermatozóide e óvulo). Criam-se as Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos (CNDOs) em níveis municipal e estadual, e as Organizações de Procura de Órgãos (OPOs) em nível hospitalar. Em agosto de 2000 (Portaria 901)³ é criada a Central Nacional de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos.

A realização do transplante de tecido alógeno é permitida mediante o consentimento do receptor (ou seu responsável), após explicações quanto aos benefícios e riscos envolvidos e exige o registro no prontuário médico do receptor. O fato de que os testes antivirais atualmente aplicados na triagem sorológica rotineira dos doadores ainda incluem janela biológica; a importância e consequências de resultados falso-negativos devem ser consideradas quando da indicação do uso dos tecidos. Possivelmente a realização de exames sorológicos mais sensíveis, como através de PCR, venha a diminuir estes riscos.

Tanto a captação como o transplante de órgãos e tecidos só podem ser realizados por equipes especializadas, devidamente cadastradas nas Secretarias de Saúde estaduais e ocorrer em instituições médico-hospitalares cadastradas no SNT para a execução destes procedimentos.

Internacionalmente Bancos de Tecido autorizados pelos sistemas nacionais de saúde obedecem a normas estabelecidas pelos órgãos competentes dos Ministérios de Saúde (ex: INCUCAI na Argentina), grupos de trabalho⁴ ou preconizadas pelas organizações de classe ao qual são afiliados e acreditados, tais como a Associação Americana de Banco de Tecidos (AATB)⁵, a Associação Européia de Bancos de Tecidos (EATB)^{6,7}, etc. Estas normas procuram estabelecer padrões de trabalho que assegurem a qualidade final dos tecidos produzidos.

Desde 2000, existem no Brasil portarias ministeriais estabelecendo critérios para o credenciamento de Bancos de Olhos, de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, de Valvas Cardíacas e de Tecidos Osteofasciocondroligamentosos⁸. Ainda não existem normas para a instalação ou funcionamento de Bancos de Pele.

A grande relutância na população em geral quanto à doação de órgãos se acirra quanto à doação de enxertos de pele. O medo de que o corpo do doador seja aviltado durante o procedimento permanece como o principal temor dos familiares dos potenciais doadores. É importante, portanto, o trabalho de esclarecimento junto às equipes profissionais e ao público em geral para que este preconceito diminua e que todo o trabalho seja realizado de maneira profissional e discreta.

Seleção de Doadores

Devido à morbidade do ato de retirada de enxertos em doadores vivos e a limitação quanto à extensão das áreas factíveis para a retirada dos mesmos nestas circunstâncias, apenas doadores *post mortem* são considerados para o trabalho dos bancos de pele. Estes podem ser doadores com morte cerebral diagnosticada (também doadores de órgãos perfundidos) ou doadores cadavéricos (depois de parada cardíaca, principalmente doadores de tecidos).

Uma vez identificado o doador em potencial é feita comunicação à Central de Transplantes, que envia o representante da Organização de Procura de Órgãos (OPO) ao hospital onde se encontra o possível doador é afiliado. O agente da OPO avalia o doador em potencial, obtém dados sobre antecedentes médicos e sociais e consulta os familiares quanto à possibilidade de doação (especificando quais tecidos e órgãos)⁹. Colhem-se amostras de sangue para a realização de exames sorológicos para Hepatite B, Hepatite C, AIDS, HTLV, Sífilis, Doença de Chagas, Toxoplasmose e Citomegalovírus. Em doadores com suspeita de morte cerebral realizam-se dois exames que devem corroborar a mesma. Finalmente, uma vez aprovada a doação, as equipes de captação de órgãos e/ou tecidos são mobilizadas pela Central de Transplantes (CNDO) local.

Os critérios para a recusa de doador potencial de pele são baseados nos resultados dos exames sorológicos, na idade e peso, antecedentes sociais, antecedentes médicos, dados de prontuário da internação atual e no exame físico do doador^{4,6}.

- **Resultados de exames sorológicos:** os resultados dos exames sorológicos realizados deverão ser negativos para Hepatite B, Hepatite C, Chagas, Sífilis, HTLV, AIDS. Casos com sorologia IgG positivo para Toxoplasmose ou Citomegalovírus podem ser aceitos, apesar do risco de doença ativa em receptores imunossuprimidos (ex.: criança grande queimada). Este risco se exacerba tremendamente em portadores de sorologia IgM positiva para estas patologias.

Visto que é comum a infusão de grandes volumes de cristalóides e colóides para a manutenção de boa perfusão de doadores de órgãos, é importante verificar que as amostras de sangue colhidas para os testes sorológicos não apresentem hemodiluição excessiva com conseqüentes resultados falso-negativos devido à diluição dos anticorpos ou proteínas. O montante de volume transfundido e sua retenção nas 24 horas que antecederam a coleta de sangue sua retenção podem ser calculados bem como sua proporção

quanto ao volume plasmático do doador (Tabela 1); hemodiluições das amostras de sangue colhidas para a sorologia acima de 50% invalidam os resultados obtidos.

- **Idade e peso dos doadores:** sugere-se exclusão de doadores menores de 15 anos ou de idade acima de 60 anos. Doadores abaixo de 15 anos e/ou abaixo de 50 quilos de peso terão superfície corpórea reduzida e, portanto, áreas doadoras muito pequenas. E em indivíduos acima de 60 anos ou com baixo peso, o tecido cutâneo tende a ser atrófico e de qualidade pobre.
- **Antecedentes Sociais:** em entrevista, familiares e companheiros devem ser questionados sobre comportamentos e convívio em grupos de risco, que possam haver exposto o potencial doador à contaminação por doenças infecto-contagiosas, principalmente virais, como por exemplo: homossexualidade, uso de drogas endovenosas, possível contato físico com portadores de doenças infecto-contagiosas, hábitos sexuais promíscuos, confinamento em prisões. Tatuagens, maquiagem definitiva, colocação de adereços corporais (*body piercing*) não são uma contra-indicação à doação desde que tenham sido realizados em intervalo superior a 12 meses da doação e que não tenham sido retocados neste intervalo. Na Tabela 2 pode se observar um modelo de questionário aplicável a parente próximo ou companheiro do doador para a obtenção deste tipo de informação.
- **Antecedentes médicos:** através de entrevista com familiares, pesquisa no prontuário de internação, contato com médicos, análise do laudo de autópsia (quando realizada), pode-se traçar o perfil da saúde do doador anteriormente à internação atual, procurando identificar fatores de exclusão tais como: doenças auto-imunes, doenças malignas, tratamento com hormônio de crescimento de origem humana, tratamento prolongado por corticoesteróides, diálise crônica, transfusões de sangue ou de hemoderivados nos 12 meses precedentes à doação, história de doença neurológica, tratamento por acupuntura, malária, transplante anterior de tecidos ou órgãos, cirurgias anteriores de causa desconhecida. Sugere-se que cada Banco possua um protocolo de exclusão ou aceite de doadores.
- **Dados do prontuário da internação:** a causa do acidente deve ser levada em consideração, originando questões quanto a patologias prévias, uso de drogas, etc. e que tenham contribuído para a causa da atual internação. Ferimentos penetrantes não são uma contra-indicação formal para a ablação de pele, mas infecções sistêmicas ou locais da pele aumentam consideravelmente o risco de contaminação do tecido e deverão ser consideradas para o aceite ou recusa do doador.
- **Exame físico do doador:** devem ser observadas e anotadas no prontuário do doador, a presença de lesões cutâneas suspeitas, de tatuagens e *piercings*, cicatrizes, abrasões, úlceras de decúbito, secreções anais, vaginais e orais, marcas de injeções endovenosas anteriores, icterícia, hepatomegalia, linfadenopatia difusa, cicatrizes anteriores à doação. Este exame físico pode ser posteriormente enriquecido com dados obtidos em autópsia formal do doador.

Tabela 1
Cálculo do Fator de Hemodiluição

Cristalóides Infundidos			
Intervalo Antes da Amostra Sorológica	Volume Infundido	% Retida	Volume Retido (ml)
> 24 horas		0	Nenhum
2-24 horas		25	
1-2 horas		50	
< 1 hora		75	
Total de Cristalóides Retido:			
Sangue - Colóides Infundidos			
Intervalo Antes da Amostra Sorológica	Volume Transfundido	% Retida	Volume Retido (ml)
24-8 horas		100 (sangue)	
0-24 horas		50 (colóide)	
		100	
Total Sangue e de Colóide Retidos:			
Volume Sangue Total: 45-60ml por kg de peso*		$\% \text{ Hemodiluição} = \frac{\text{cristalóide retido} + \text{sangue} \text{colóide retidos} \times 100}{\text{volume sangue total calculado}}$	

Tabela 2
Questionário de Antecedentes Médicos e Sociais

	Sim	Não	Sim, Detalhes (inclusive datas)
1) Foi submetido a alguma cirurgia importante?			
2) Sofre(u) de alguma doença?			
3) Recebeu tratamento ou suspeita de CÂNCER?			
4) Sofre de alguma doença osteoarticular?			
5) Sofre de doença cardíaca ou cutânea?			
6) Recebeu transfusão de sangue ou produtos nos últimos 12 meses?			
7) Fez tratamento por acupuntura, tatuagem, body piercing ou aplicou maquiagem permanente nos últimos 12 meses?			
8) Sofreu acidente com perfurocontusos (ex.: agulhas) que possam expô-lo a HIV ou Hepatite?			
9) Sofreu de Hepatite ou teve icterícia?			
10) Recebeu transplante prévio de órgão ou tecido (ex.: osso, córnea, pele, válvula, etc.)			
11) Sofreu neurocirurgia antes de 1992?			
12) Recebeu hormônio de crescimento ou tratamento para infertilidade antes de 1985?			
13) Sofreu doença neurológica (ex.: perda de memória recente, confusão)			
14) Teve febre de origem desconhecida?			
15) Perdeu peso recentemente?			
16) Sofria de alguma transmitida por sexo (ex.: gonorréia, etc.)			
17) Doenças oculares/tratamentos			
18) Apresentou infecções recorrentes, suores noturnos, glândulas inchadas?			
19) Apresentava doenças de pele?			
20) MEDICAMENTOS que tomava prescritos por?			
21) Tinha médico de família			Nome:

Captação dos Tecidos

O Banco deve estabelecer em seu manual de procedimentos, o protocolo de coleta da pele; este deverá ser avaliado regularmente e modificado procurando atingir as metas de excelência propostas.

Cada doador deverá receber uma identificação exclusiva do Banco. Os dados que influenciaram seu aceite como tal deverão ser registrados em formulário próprio, constando cópias dos documentos de doação emitidos pela OPO, endereço do doador e familiares consultados, dados relevantes do prontuário hospitalar, da história clínica e social, resultados dos testes sorológicos, destino dado aos demais órgãos e tecidos retirados e exame físico prévio à captação, constituindo o primeiro documento do "prontuário do doador".

A retirada de enxertos de tecidos para uso alógeno é um procedimento cirúrgico que deve ser realizado em condições de esterilidade, por pessoal médico e paramédico devidamente treinado para a função. O procedimento *a priori* deve ser feito em sala cirúrgica. É possível a retirada em morgue ou outras salas hospitalares, desde que o local permita a higiene necessária para a captação em condições de esterilidade, principalmente porque, como será comentado posteriormente, a esterilização complementar da pele por métodos já validados ainda apresenta dificuldades.

A ordem de captação dos vários tecidos passíveis de doação procura respeitar a necessidade da manutenção da viabilidade celular e questões técnicas que possam afetar a qualidade final dos tecidos retirados. Internacionalmente é aceita a seguinte ordem: pele, vasos, fáscia muscular, tendões, cartilagem e ossos. Alguns cirurgiões ortopedistas receiam que a retirada da pele antes do tecido ósseo possa aumentar o índice de contaminação deste último; no entanto, a remoção da pele é um ato cirúrgico estéril que removeria justamente a camada mais "contaminada" da pele (epiderme e derme superficial). Por sua vez, a retirada prévia do tecido ósseo pode comprometer a qualidade dos enxertos de pele por vários fatores: a rigidez do compartimento muscular é desfeita pela incisão das fáscias musculares; a reconstrução rígida do membro pós-ablação óssea impede a rotação externa da coxa, as cicatrizes deixadas na captação óssea reduzem a quantidade de enxertos cutâneos a serem retirados e a reconstrução dos membros com materiais não estéreis contaminam as áreas doadoras de pele. A estes problemas, soma-se o retardo para o início da captação da pele pós-parada cardíaca (isquemia), muitas vezes ultrapassando o limite máximo indicado para a refrigeração dos tecidos.

O procedimento de retirada de pele tem início com o pessoal técnico devidamente paramentado para ato cirúrgico, ou seja, após higiene das mãos, usando roupas privativas do centro cirúrgico, luvas estéreis, gorros e máscaras (Fig. 1).

Dois critérios são utilizados para a eleição das áreas doadoras. O primeiro, considera o impacto social e psicológico do procedimento sobre os familiares do doador, evitando-se captações em áreas que poderão estar expostas à vista pública tais como braços, e superfície anteriores de pernas em doadores do sexo feminino. O segundo leva em

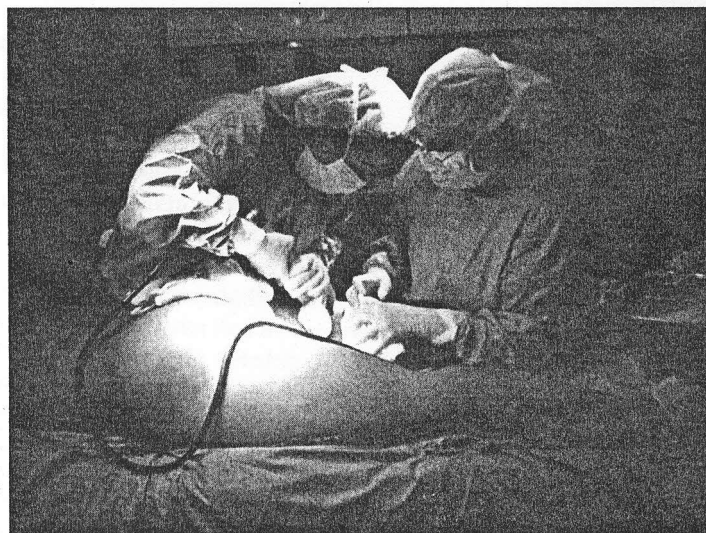


Fig. 1 – Técnica de captação estéril dos tecidos.

conta o padrão de qualidade das lâminas de tecido a serem retiradas, procurando-se acessar áreas que permitam a obtenção de lâminas amplas ou dentro dos padrões estabelecidos (ex.: comprimento mínimo de 10cm a máximo de 20cm e de largura mínima de 3cm a máxima de 6cm). Estas considerações apontam para a retirada de tecidos no sexo masculino dos membros inferiores nas superfícies anteroposteriores e do dorso; no sexo feminino, de coxas anteroposteriores e dorso; eventualmente retira-se lâmina de pele da região das panturrilhas no sexo feminino.

Para manter o padrão de qualidade na retirada dos tecidos, a equipe pode levar ao local de captação, todos os materiais necessários. O kit de captação de pele ora em uso no Banco de Tecidos do ICHC é composto por (Tabela 3): a) mala contendo o prontuário do doador, com formulários para registro da captação, pacote de campos estéreis, pacote de aventais estéreis, frasco com Chlorexidina 4%, frasco com etanol 70% e caixa com "miudezas" (esponjas com PVPI, máscaras, *culturettes*, vaselina, sacos para lixo, etc.); b) geladeira de transporte com gelo validada para manter temperaturas de até 8°C durante o transporte entre o local da captação e o Banco, contendo frasco estéril com solução de transporte refrigerada (soro fisiológico 0,9% com antibióticos – penicilina, estreptomicina e anfotericina B); c) maleta com dermatomo elétrico e suas lâminas. Este material permite total autonomia de ação, exceto por três litros de soro fisiológico facilmente disponíveis em qualquer centro cirúrgico.

A retirada dos tecidos com dermatomo elétrico (Fig. 2) é fundamental para a obtenção de enxertos. Mesmo o técnico mais habilidoso no uso de facas de retirada de enxertos não conseguirá retirar tecidos com a qualidade desejada para um Banco de Pele. Esta prática não deve ocorrer.

Todas as etapas do processo de captação deverão ser registradas no formulário de retirada, já identificado por um número exclusivo do doador, e incluirão: consentimento da doação, dados do doador, resultados dos exames sorológicos, exame físico, descrição do procedimento de retirada,

Tabela 3
Materiais para Ablação de Pele

a) Mala de transporte

- Prontuário do doador + etiquetas de identificação/caneta
- Pacote com aventais estéreis
- Pacote com campos estéreis
- Bandeja estéril p/ anti-sepsia (cuba, compressas, bandeja)
- Bandeja estéril para ablação (cuba, cúpula, compressas, gases, tesoura, pinça anatômica, pinça com dente, *cheron*, *backhaus*, porta-agulha, bandeja)
- Caixa com adicionais (gorros, máscaras, pares de luvas de procedimento, esponjas para degermação com PVPI, seringas e agulhas, lâminas de bisturi 20, sacos plásticos para transporte de materiais contaminados; *hamper* plástico, sacos plásticos para embalar os frascos de coleta e lacres; luvas estéreis, *culturettes*;
- Frasco *spray* com álcool 70%
- Frasco com *chlorhexidine* sabão

b) Mala do dermatômo elétrico

- Dermatômo
- Transformador de força
- 03 lâminas

c) Maleta térmica

- Frasco estéril para a captação
- Soro fisiológico (4°C)
- Solução de antibióticos
- gelo

Processamento

Quarentena

Por quarentena dos tecidos entende-se o período de tempo entre sua coleta e o momento em que são liberados para seu processamento e distribuição; variável segundo o tecido e a rotina do Banco. Para tecidos musculoesqueléticos, este intervalo de tempo é dedicado ao recebimento ou confirmação dos dados acerca dos antecedentes do doador, dos resultados dos exames de sorologia e dos resultados dos exames de microbiologia. Estas informações são utilizadas pelo Diretor Médico para estabelecer o destino dos materiais, ou seja, descarte, tipo de processamento e necessidade de esterilização complementar. Estas decisões serão reforçadas pela revisão dos critérios de inclusão ou exclusão de doadores do Banco e do tipo específico de tecido, podendo ser complementadas através de um novo contato com os familiares do doador, contato com outras equipes de transplantes, ou mesmo com outros Bancos de tecidos no caso de uma dúvida de conduta. A maioria dos bancos musculoesqueléticos opta em iniciar o processamento dos tecidos após esta quarentena, tanto para evitar gastos em processar tecidos que serão em última instância descartados, como para proteger a seus funcionários da manipulação de tecidos contaminados. Neste ínterim, os tecidos permanecem em congeladores.

Em Bancos de Pele, devido à necessidade de iniciar os processos de conservação dos tecidos em glicerol ou criopreservação até no máximo 24 horas após sua captação, a quarentena do tecido é realizada após o processamento e antes de sua liberação para uso clínico.

Freqüentemente os resultados dos exames microbiológicos da captação não serão determinantes para o início do processamento da pele devido à demora na obtenção dos resultados conclusivos. No entanto, deverão ser considerados posteriormente tanto para a decisão de descarte do tecido (ex.: contaminação por bactérias gram -) como para inclusão de processo de esterilização complementar do lote. Esta decisão deverá estar embasada em protocolos de microbiologia existentes no Banco.

Portanto, com a maior brevidade possível e exceto em situações de improbidade clara dos materiais que levam ao seu descarte, o processamento tem início o mais precocemente possível após a captação.

Processamento

A grande preocupação deverá ser sempre assegurar que os materiais manipulados não se contaminem durante o processamento. O lote de tecido de cada doador deverá ser processado isoladamente, com limpezas terminais da sala e equipamentos entre cada doador.

A sala de processamento deverá ser um ambiente que preencha os requisitos de "sala limpa", i.e., com ar-condicionado e classificado (número de partículas em suspensão) (classe B) ou em sala cirúrgica com acabamentos adequados e mínimo de classificação de ar (classe C). Em ambas situações, o trabalho propriamente dito deverá ser realizado dentro de área com

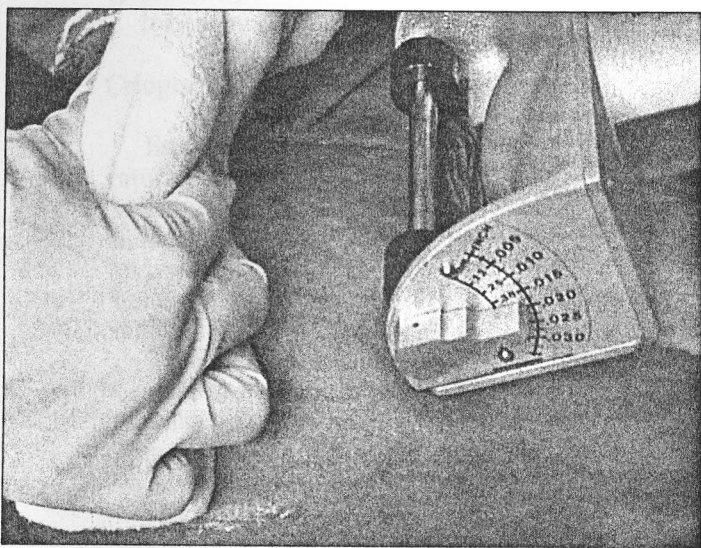


Fig. 2 – Retirada dos enxertos de pele com dermatômo elétrico.

validade e esterilidade dos insumos utilizados, quebras eventuais do protocolo e acidentes. Este documento, contendo a identificação do doador será anexado ao prontuário do doador.

classificação classe A, situação esta que pode ser gerada pelo trabalho sob filtros adicionais ou em capela de fluxo laminar colocada no interior da sala de processamento. Deverá existir uma antecâmara de acesso (classe C) para a sala de processamento, a fim de garantir a classificação de ar desta última¹⁰.

Todas as etapas de processamento deverão ser realizadas com técnica estéril e por pessoal tecnicamente habilitado. Os detalhes do tratamento dado ao tecido, inclusive de insumos utilizados, deverão ser anotados em formulário próprio, identificado com o número doador e que será posteriormente anexado ao "prontuário do doador".

Algumas possibilidades de conservação de enxertos de pele para uso como transplantes alógenos são factíveis: a refrigeração, a criopreservação e a exposição ao glicerol em altas concentrações.

Refrigeração

A conservação dos enxertos em solução salina com antibióticos a 4°C certamente é o método mais simples e por consequência economicamente vantajoso de conservação. Seu grande demérito é o prazo de apenas 14 a 21 dias em que os tecidos podem ser conservados devido à gradual perda de viabilidade celular e degeneração das características biológicas dos materiais. Resumidamente, o processamento consistiria em:

- 1) Remoção da solução de transporte e banho em solução salina 0,9% estéril para remoção de resíduos de lubrificante, pequenos fragmentos, etc.
- 2) Exame de cada lâmina de tecido, com descarte dos fragmentos fora do padrão tamanho/espessura.
- 3) Aparar de bordas irregulares e medidas de área.
- 4) Embalagem e coleta de material para análise microbiológica pós-processamento.

Criopreservação

Este método consiste na manutenção dos tecidos a temperaturas de -80°C (ultracongelador elétrico) ou -180°C (congelador com nitrogênio líquido), prolongando o período de viabilidade para seu uso. Os tecidos a serem criopreservados devem ser resfriados a 4°C preferencialmente até no máximo seis horas depois de parada cardíaca do doador em temperatura ambiente (ou até 12 horas após a parada, se o corpo foi colocado em refrigeração por sua vez, até seis horas pós parada).

O desafio na criopreservação é evitar-se ou diminuir a formação de cristais de gelo no interior celular, que seriam responsáveis pela ruptura de membranas celulares (lise celular e perda de viabilidade) e a desorganização da matriz extracelular. Assim, o tecido pode ser protegido dos efeitos do congelamento (crioprotetido) pela exposição ao dimetilsulfóxido (DMSO) ou ao glicerol em concentrações de 10% a 15% em meio de cultura de células (ex.: Dulbecco). Estas substâncias diminuem a formação dos cristais de gelo; por sua vez, são citotóxicas à temperatura ambiente e por isso, o procedimento de exposição deve ser ágil e a redução da temperatura tecidual iniciada o mais breve possível.

O congelamento pode ser feito de forma "artesanal" ou com o emprego de uma câmara de congelamento progressivo. No

primeiro caso, o procedimento é iniciado utilizando-se todos os líquidos a 4°C, e o congelamento propriamente dito, pela colocação do material por cerca de duas horas em congeladora comum (-20°C) e a seguir no ultracongelador (-80°C ou -180°C). O inconveniente neste método "artesanal" é o controle reduzido sobre o processo de formação de cristais de gelo.

Esta dificuldade é normalmente superada em bancos de qualidade, pelo uso de uma câmara de congelamento progressiva. Nestes equipamentos, a temperatura no interior de uma câmara de congelamento onde é o colocado o tecido já embalado, é reduzida pela injeção controlada de nitrogênio líquido no interior da mesma. O fluxo de nitrogênio por sua vez é determinado por um computador acoplado ao sistema e que recebe informação acerca da temperatura no interior câmara através de um monitor de temperatura colocado no interior de uma embalagem "boneco" e que mimetiza as condições do tecido nas demais embalagens. Procura-se estabelecer curva de resfriamento de -1°C/minuto até a temperatura de -20°C e a partir de então, mais rapidamente, até -40°C. O tecido é então armazenado em ultracongeladores (-80°C ou -180°C) até sua distribuição.

Aparentemente simples, o processo, no entanto exige mão-de-obra afeita ao aparelho e capacitada para adequar as curvas de congelamento segundo as condições do material (ex.: embalagens utilizadas, quantidade de tecido por envelope etc.), além de um suprimento de nitrogênio líquido. Estes aspectos, somados ao custo de aquisição e manutenção do aparelho de congelamento progressivo, tornam o método dispendioso. Sua grande vantagem é a preservação das estruturas com manutenção da viabilidade celular em torno de 80% quando bem conduzido.

Resumidamente, o processo seria:

- 1) Retirada da solução de transporte e banho em solução salina 0,9% estéril para remoção de resíduos de lubrificante, pequenos fragmentos, etc.
- 2) Exame de cada lâmina de tecido, com descarte dos fragmentos fora do padrão tamanho/espessura.
- 3) Aparar de bordas irregulares e medidas de área.
- 4) Exposição a solução de criopreservação (Meio de cultura + DMSO ou glicerol + antibióticos).
- 5) Embalagem em envases validados para criopreservação.
- 6) Confecção de "boneco" para monitoração do congelamento no interior da câmara.
- 7) Coleta de material para análise microbiológica pós-embalagem.
- 8) Congelamento + armazenagem em ultracongelador.

Conservação em Glicerol em Altas Concentrações

A conservação de tecidos em glicerol em altas concentrações (acima de 85%) teve início com os trabalhos de Pigossi¹¹ na conservação de dura-máter canina em glicerol a 98%. Basile¹² conservou pele porcina em glicerol 98% obtendo resultados clínicos em muito semelhantes ao uso de pele porcina liofilizada. Kreiss e Hoekstra detêm o mérito de haver adaptado o método para o processamento de enxertos de pele humana em 1983¹³. Este trabalho originou um dos maiores bancos mundiais de enxertos de pele, o Euro Skin Bank, estabelecido na Holanda.

A conservação em glicerol deve ter início até 24 horas da retirada do tecido e sua refrigeração. Com a exposição ao glicerol em altas concentrações, ocorre a morte celular, mas existe a manutenção da integridade anatômica dos tecidos. Em linhas gerais, segue o protocolo ora adotado pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas que preconiza a conservação de enxertos em glicerol na concentração de 85%:

- 1) Retirada da solução de transporte e banho em solução salina 0,9% estéril para remoção de resíduos de lubrificante, pequenos fragmentos, etc.
- 2) Exame de cada lâmina de tecido, com descarte dos fragmentos fora do padrão tamanho/espessura.
- 3) Colocação do material em glicerol 85% estéril, em agitação, a 37°C, por três horas.
- 4) Inspeção das lâminas e colocação do material em solução fresca de glicerol estéril 85%, com duração e características semelhantes ao anterior.
- 5) Aparar de bordas irregulares e endurecidas e medidas de área.
- 6) Embalagem em envases validados para conservação em glicerol.
- 7) Coleta de material para análise microbiológica pós-embalagem.
- 8) Quarentena de 21 dias em refrigerador a 4°C.

Armazenamento

Como já comentado, a maior desvantagem do método de refrigeração de enxertos de pele é o curto prazo em que os tecidos podem ser conservados, resultando freqüentemente na falta de receptor ou no descarte de materiais por vencimento do prazo de validade. Conseqüentemente é quase impossível a existência de um "estoque" para emergências.

Outros métodos como a criopreservação, já permite a armazenagem dos materiais em ultracongeladores por até dois anos⁵. O protocolo original do Euro Skin Bank para a conservação de pele em glicerol em altas concentrações previa seu armazenamento em refrigeração a 4°C por dois anos¹³. Mas, segundo Pigossi¹¹ e Van Baare e cols.¹⁴, os tecidos não apenas poderiam ser armazenados à temperatura ambiente, como também nesta situação ocorreria uma potencialização de efeito virucida atribuído ao glicerol. O Banco de Tecidos do ICHC respeita a conservação em refrigeração por até dois anos¹⁵.

Esterilização

A baixa tolerância da pele aos métodos de esterilização tradicionais, químicos (óxido de etileno, formalina) ou físicos (calor), tornam sua esterilização de difícil execução, aumentando o valor das técnicas assépticas de coleta e processamento dos tecidos.

Ainda que não um consenso quanto a sua eficiência, o glicerol em altas concentrações contribui para a esterilização dos materiais nele conservados. Acima da concentração de 85%, a alta osmolaridade do glicerol impede a proliferação bacteriana, resultando em uma curva decrescente de população bacteriana até sua poten-

cial eliminação do tecido em 21 dias, exceto para formas esporuladas¹¹. Apesar de não totalmente comprovado, existem também indícios de que o glicerol em altas concentrações possui ainda, ação virucida^{11,14}.

No entanto, a eficácia desta capacidade "esterilizante" do glicerol relaciona-se proporcionalmente a carga biológica inicial, levando as boas práticas de laboratório a sugerir a triagem sorológica cuidadosa do doador, a busca por processos de esterilização complementares e o descarte de materiais altamente contaminados ou contaminados com bactérias gram devido ao potencial de geração de resíduos pirogênicos.

Um dos processos complementares em investigação no momento seria a radioesterilização dos tecidos previamente conservados em glicerol. Este é um projeto que vem sendo desenvolvido pelo Banco de Tecidos do ICHC em parceria com o IPEN – São Paulo e a Agência Internacional de Energia Atômica. Os resultados preliminares tanto quanto às alterações estruturais dos materiais como dos resultados em sua aplicação clínica têm sido bastante animadores e serão fruto de publicação específica.

Em próxima oportunidade, serão descritos os critérios de distribuição e administração de estoques, usos clínicos e aplicações futuras para enxertos de pele e seus derivados provenientes de Bancos de Tecidos.

Bibliografia

1. Lei Federal nº 9.434 – 04 de fevereiro de 1997.
2. Decreto Federal nº 2.268 – 30 de junho de 1997.
3. Portaria Federal nº 901 – 16 de agosto de 2000 (SNT).
4. Proyecto INT /6/049 – Agência Internacional de Energia Atômica – "Normas Generales para la Operación de Banco de Tejidos en la Region de America Latina".
5. Standards for Tissue Banking – American Association of Tissue Banks.
6. European Association of Tissue Banks – General Standards for Tissue Banking.
7. British Association of Tissue Banks – Technical guidelines for processing of tissues aseptically or with terminal sterilisation.
8. Portaria Federal nº 904 – 16 de agosto de 2000.
9. Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo – funcionamento da central de transplantes – www.saude.sp.gov.br/Transp.
10. Herson M, Mathor MB, Ferreira MCF. Bancos de Pele I – aspectos gerais e administrativos, planta física e controles de qualidade. *Rev Bras Queim*, 1:35-40, 2001.
11. Pigossi N, Raia A, Lex A, Habr Gama A, Simonsen O, Haddad J, Stolf NAG, Zerbini EJ, Miniti A, Tenuto R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da duramáter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. *Rev Assoc Med Bras*; 17, 263-78, 1971.
12. Basile ARD. A comparative study of glycerinated and lyophilized porcine skin dressings for third degree burns. *Plast Reconstr Surg*; 69:969-72, 1982.
13. Hoekstra MJ, Kreis RW, Dupont JS. History of the euro skin bank: the innovation of preservation techniques. *Burns*, (suppl 1);20:543-7, 1994.
14. Van Baare J, Buitenwerf J, Hoekstra MJ, Dupont JS. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns*, (suppl 1);20:77-80, 1994.
15. Protocolos de captação e conservação de enxertos de pele do Banco de Tecidos do Instituto Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.