MURILLO MARTINEZ MATHEUS

Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos

Pirassununga

2019

MURILLO MARTINEZ MATHEUS

Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Departamento de Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa

Pirassununga

2019

ERRATA

MATHEUS, M. M. Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
FICHA CATALOGRÁFICA	100 p.	99 f.
RESUMO	100 p.	99 f.
ABSTRACT	100 p.	99 f.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3861
FMVZ

Martinez Matheus, Murillo
Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos / Murillo Martinez Matheus. – 2019.
100 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientadora: Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa.

1. Conservação intestinal. 2. Intestino delgado. 3. Criopreservação. 4. Histologia. 5. Ensaio biomecânico I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da degradação e do efeito do congelamento e descongelamento sobre a resistência biomecânica do jejuno de bovinos hípidos", protocolada sob o CEUA nº 1605230818 (ID 005652), sob a responsabilidade de **Rodrigo Romero Corrêa e equipe; Murillo Martinez Matheus** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/10/2018.

We certify that the proposal "Study of degradation and effect of freezing and thawing in the biomechanical resistance of healthy bovine jejunum.", utilizing 22 Bovines (males and females), protocol number CEUA 1605230818 (ID 005652), under the responsibility of **Rodrigo Romero Corrêa and team; Murillo Martinez Matheus** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/17/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [10/2018](#)

Área: [Clínica Cirúrgica Veterinária](#)

Origem: [Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [2 a 3 anos](#)

N: [22](#)

Linhagem: [nelore](#)

Peso: [450 a 550 kg](#)

Local do experimento: As amostras serão coletadas no abatedouro Do Campus Fernando Costa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As amostras serão armazenadas e o experimento se dará no Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa localizado no Campus Fernando Costa Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MATHEUS, Murillo Martinez

Título: Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: 25/11/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Julgamento: _____

Prof. Dr. Roberto Pimenta de Pádua Foz Filho

Instituição: Universidade Anhembi Morumbi

Julgamento: _____

Prof. Dr. Rodrigo Romero Corrêa

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a equipe do Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa que tornou estes dois anos de convivência extremamente prazerosos e enriquecedores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à minha família (Manoel, Marina, Sabrina e Simone) por estarem sempre ao meu lado, independente da distância, apoiando minhas decisões, mesmo que por vezes não concordando com elas, e sempre torcendo para que dê tudo certo. Todos sabemos que a caminhada não tem sido fácil, e justamente por isso, temos a certeza que a direção é a correta, e o destino será alcançado.

Agradeço a minha futura esposa, Natalia, primeiro por me aturar ao longo desses quase dez anos, e especialmente por estar comigo neste período tão complicado. Obrigado por aguentar a saudade, a ausência, o cansaço e o mau humor. Obrigado pelo apoio incondicional, por me tranquilizar nos momentos de desespero, e por me incentivar nos momentos de procrastinação. Obrigado por segurar as pontas, e cuidar de tudo o que eu não tinha tempo ou paciência de resolver, desde nossos projetos particulares até as intermináveis lâminas de histologia deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, Professor Rodrigo Romero, por estes onze anos de convivência. Por todo este tempo sempre foi para mim muito mais do que chefe no estágio, professor ou até mesmo orientador. Sempre foi um grande exemplo, um modelo a ser seguido. Graças a ele, nestes dois anos, aprendi muito mais do que sobre a degradação ou congelamento do intestino. Nestes dois, anos aprendi muito mais sobre ser “um cara da roça” como ele mesmo me disse certa vez. Me ensinou que devo ampliar os horizontes, que o cavalo vai muito além do intestino, e que isso deve ser explorado. Nestes dois anos, aprendi com ele que não importa o quando estudamos, pesquisamos ou descobrimos, porque no final a conclusão é que realmente “a gente não sabe de nada”. E exatamente por isso precisamos continuar nos tornando “um pouquinho melhor a cada dia” todos os dias.

Agradeço a minha grande amiga, Natália Oliveira, por todo o companheirismo durante o mestrado. Ao nos conhecermos, a única coisa que eu pensava era: como eu vou me entender com essa daí? Depois de algum tempo, nossa dúvida era: como a gente consegue ser amigo, sendo tão diferentes? Ao final desta etapa, depois de tudo pelo que passamos juntos a pergunta é: como a gente poderia não ser amigos? Estivemos juntos nas madrugadas de intestino fedorento e nas cervejas para comemorar cada etapa concluída. É, realmente foram dois anos bastante intensos,

em todos os sentidos. Mas lembre-se tudo tem seu propósito, e por mais que tudo pareça uma grande confusão, tudo vai dar certo!

Agradeço ao professor Francisco Blazquez, e toda a equipe do Laboratório e Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica, por ter colocado a disposição sua estrutura e conhecimento possibilitando a realização deste trabalho. Somente dessa forma foi possível que uma pessoa que mal sabia como fixar uma amostra, fosse capaz de desenvolver um trabalho todo baseado em avaliação histológica.

Agradeço ao Professor Luis Cláudio por ter aceitado ser meu orientador no início desta jornada.

Obrigado a toda equipe do Centro de Odontologia Equina (sem citar nomes pra não esquecer de ninguém) por ter feito parte desta fase tão importante da minha vida e fazer com que ela tenha sido tão proveitosa. Mais uma vez, meu muito obrigado a todos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

MATHEUS, M. M. **Influência da degradação tempo-dependente e do processo de congelamento e descongelamento sobre as características histológicas e biomecânicas do jejuno de bovinos hígidos.** 2019. 100 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A degradação do intestino delgado de bovinos sadios, bem como seu efeito sobre a resistência biomecânica, não são descritos na literatura. Trabalhos que envolveram a biomecânica intestinal realizaram os ensaios em poucas horas após o óbito dos doadores, sem avaliação de seu estado de deterioração. O congelamento é eficiente na conservação de vários tecidos, porém, pode provocar danos ao nível celular nos tecidos ricos em água. Este estudo teve por objetivo avaliar a degradação morfológica e biomecânica do jejuno de bovinos em diferentes tempos *post mortem*, bem como o efeito do congelamento e descongelamento sobre estas características. Foram coletados segmentos de jejuno de seis animais, e fragmentos destes segmentos foram fixados em formol em diferentes tempos *post mortem* (0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 horas) para avaliação histológica. Em outra fase, mais 20 segmentos foram coletados e submetidos a teste biomecânico em diferentes tempos *post mortem* (0, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 horas), além do mesmo teste após congelamento e descongelamento. As primeiras alterações macroscópicas foram observadas em oito horas após o óbito. Mesmo momento em que surgiram os primeiros sinais de lesão estrutural ao exame histológico. Este também foi o momento de menor pressão suportada ao teste biomecânico. A partir de 12 horas o tecido sofreu rearranjo estrutural, voltando a suportar maior pressão, seguida de queda gradual após 18 horas. As lesões histológicas se apresentaram de maneira progressiva e gradual. As amostras testadas após descongelamento não apresentaram diferença estatística quanto à resistência mecânica em comparação com os espécimes frescos. Independente do aspecto morfológico, as amostras de todos os tempos, assim como as descongeladas, apresentaram resistência muito superior às consideradas fisiológicas ou patológicas.

Palavras-chave: Conservação intestinal. Criopreservação. Ensaio biomecânico. Histologia. Intestino delgado.

ABSTRACT

MATHEUS, M. M. **Degradation time-dependent, freezing and thawing influence on histological and biomechanical characteristics of healthy cattle jejunum.** 2019. 100 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The degradation of the small intestine of healthy cattle, as well as its effect on biomechanical resistance are not described in the literature. Studies involving intestinal biomechanics perform tests within hours of donor death, without evaluating its deterioration state. Freezing is effective in conserving various tissues, but can cause cellular damage to water-rich tissues. This study aimed to evaluate the morphological and biomechanical degradation of the bovine jejunum at different *post mortem* times, as well as the effect of freezing and thawing on these characteristics. Jejunum segments were collected from six animals, and fragments of these segments were fixed in formaldehyde at different *post mortem* moments (0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 hours) to histologic evaluation. In another phase, 20 other segments were collected and submitted to biomechanical testing at different *post mortem* times (0, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 hours) beyond the same test after freezing and thawing. The first macroscopic changes were observed at eight hours after death. The same time that the first signs of structural damage appeared at the histological examination. This was also the moment of least pressure supported by the biomechanical test. Within 12 hours the tissue was rearranged again to withstand greater pressure, which gradually decreased after 18 hours. The histological lesions were progressive and gradual. Samples tested after thawing showed no statistical difference in mechanical strength compared to fresh specimens. Regardless of the degree of morphological aspect, samples time, as well as thawed ones, all of them presented resistance higher than those considered physiological or pathological.

Keywords: Intestinal conservation. Cryopreservation. Biomechanical essay. Histology. Small intestine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Segmento intestinal imediatamente após a coleta	38
Figura 2 - Condição de armazenagem dos segmentos entre os tempos de coleta	39
Figura 3 - Corte de anel de segmento intestinal	40
Figura 4 - Corte de fragmento para fixação	40
Figura 5 - Fragmento pronto para fixação	41
Figura 6 - Equipamento utilizado para avaliação histológica	42
Figura 7 - Sistema completo responsável pelo teste biomecânico	44
Figura 8 - Desenho esquemático da divisão do segmento intestinal	45
Figura 9 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T0, animal três	46
Figura 10 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T2, animal quatro	47
Figura 11 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T4, animal dois	48
Figura 12 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T6, animal três	49
Figura 13 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T8, animal dois	50
Figura 14 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T12, animal dois	51
Figura 15 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T18, animal um	52
Figura 16 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T24, animal quatro	53
Figura 17 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T36, animal quatro	54
Figura 18 - Fotomicrografia de jejuno bovino, T48, animal seis	55
Figura 19 - Avaliação macroscópica de segmento intestinal após descongelamento	56
Figura 20 - Fragmento intestinal preparado para fixação, após descongelamento	56
Figura 21 - Fotomicrografia de jejuno bovino, animal dois, após descongelamento	58
Figura 22 - Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 18, após descongelamento	59
Figura 23 - Fotomicrografia de jejuno bovino, animal quatro, após descongelamento	60
Figura 24 - Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 12, após descongelamento	61
Figura 25 - Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 16, após descongelamento	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores individuais de pressão máxima	64
Tabela 2 - Ocorrência de falha intestinal	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Variação da pressão X tempo <i>post mortem</i>	63
Gráfico 2 - Animal um, tempo zero	66
Gráfico 3 - Animal um, tempo oito	66
Gráfico 4 - Animal um, tempo 18	66
Gráfico 5 - Animal um, tempo 48	66
Gráfico 6 - Animal dois, tempo zero	66
Gráfico 7 - Animal dois, tempo oito	66
Gráfico 8 - Animal dois, tempo 18	66
Gráfico 9 - Animal dois, tempo 48	66
Gráfico 10 - Animal três, tempo zero	67
Gráfico 11 - Animal três, tempo oito	67
Gráfico 12 - Animal três, tempo 18	67
Gráfico 13 - Animal três, tempo 48	67
Gráfico 14 - Animal quatro, tempo zero	67
Gráfico 15 - Animal quatro, tempo oito	67
Gráfico 16 - Animal quatro, tempo 18	67
Gráfico 17 - Animal quatro, tempo 48	67
Gráfico 18 - Animal cinco, tempo zero	68
Gráfico 19 - Animal cinco, tempo oito	68
Gráfico 20 - Animal cinco, tempo 18	68
Gráfico 21 - Animal cinco, tempo 48	68
Gráfico 22 - Animal seis, tempo zero	68
Gráfico 23 - Animal seis, tempo oito	68
Gráfico 24 - Animal seis, tempo 18	68
Gráfico 25 - Animal seis, tempo 48	68
Gráfico 26 - Animal sete, tempo zero	69
Gráfico 27 - Animal sete, tempo oito	69
Gráfico 28 - Animal sete, tempo 18	69
Gráfico 29 - Animal sete, tempo 48	69
Gráfico 30 - Animal oito, tempo zero	69
Gráfico 31 - Animal oito, tempo oito	69
Gráfico 32 - Animal oito, tempo 18	69

Gráfico 33 -Animal oito, tempo 48.....	69
Gráfico 34 -Animal nove, tempo zero.....	70
Gráfico 35 -Animal nove, tempo 18.....	70
Gráfico 35 -Animal nove, tempo 48.....	70
Gráfico 37 -Animal 10, tempo zero	70
Gráfico 38 -Animal 10, tempo oito.....	70
Gráfico 39 -Animal 10, tempo 18	70
Gráfico 40 -Animal 10, tempo 48	70
Gráfico 41 -Animal 11, tempo zero	71
Gráfico 42 -Animal 11, tempo oito.....	71
Gráfico 43 -Animal 11, tempo 18	71
Gráfico 44 -Animal 11, tempo 48	71
Gráfico 45 -Animal 12, tempo zero	71
Gráfico 46 -Animal 12, tempo oito.....	71
Gráfico 47 -Animal 12, tempo 18	71
Gráfico 48 -Animal 12, tempo 48	71
Gráfico 49 -Animal 13, tempo zero	72
Gráfico 50 -Animal 13, tempo oito.....	72
Gráfico 51 -Animal 13, tempo 18	72
Gráfico 52 -Animal 13, tempo 48	72
Gráfico 53 -Animal 14, tempo zero	72
Gráfico 54 -Animal 14, tempo oito.....	72
Gráfico 55 -Animal 14, tempo 18	72
Gráfico 56 -Animal 14, tempo 48	72
Gráfico 57 -Animal 15, tempo zero	73
Gráfico 58 -Animal 15, tempo oito.....	73
Gráfico 59 -Animal 15, tempo 18	73
Gráfico 60 -Animal 15, tempo 48	73
Gráfico 61 -Animal 16, tempo zero	73
Gráfico 62 -Animal 16, tempo oito.....	73
Gráfico 63 -Animal 16, tempo 18	73
Gráfico 64 -Animal 16, tempo 48	73
Gráfico 65 -Animal 17, tempo zero	74
Gráfico 66 -Animal 17, tempo oito.....	74

Gráfico 67 -Animal 17, tempo 18	74
Gráfico 68 -Animal 17, tempo 48	74
Gráfico 69 -Animal 18, tempo zero	74
Gráfico 70 -Animal 18, tempo oito.....	74
Gráfico 71 -Animal 18, tempo 18	74
Gráfico 72 -Animal 18, tempo 48	74
Gráfico 73 -Índices de ruptura X tempo <i>post mortem</i>	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 HISTOLOGIA INTESTINAL	19
2.1.1 Camada mucosa	19
2.1.2 Camada submucosa	20
2.1.3 Camada muscular	20
2.1.4 Camada serosa	21
2.2 DEGRADAÇÃO INTESTINAL	21
2.3 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO TECIDUAL	23
2.3.1 Criopreservação	24
2.3.1.1 Criopreservação Intestinal	25
2.3.1.2 Criopreservação de outros tecidos	26
2.3.2 Glicerina	26
2.3.3 Solução hipersaturada de sacarose	27
2.3.4 Polivinil-pirrolidona	28
2.3.5 Glutaraldeído	28
2.3.6 Líquidos iônicos	28
2.4 AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA INTESTINAL	29
2.4.1 Tipos de teste	29
2.4.1.1 Teste de distensão	29
2.4.1.2 Teste de tensão	31
2.4.1.3 Teste de compressão	31
2.4.1.4 Testes passivos	31
2.4.2 Coleta e processamento das amostras	32
2.4.3 Parâmetros avaliados	32

2.4.3.1 Pressão intraluminal	33
3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 JUSTIFICATIVA	36
5 HIPÓTESE	37
6 MATERIAL E MÉTODO	38
6.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	38
6.1.1 Fase 1	38
6.1.2 Fase 2	42
6.1.2.1 Teste biomecânico	43
6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
7 RESULTADOS	46
7.1 FASE 1.....	46
7.1.1 Tempo zero	46
7.1.2 Tempos duas e quatro horas	47
7.1.3 Tempo seis horas	48
7.1.4 Tempo oito horas	49
7.1.5 Tempo de 12 horas	50
7.1.6 Tempo de 18 horas	51
7.1.7 Tempo de 24 horas	52
7.1.8 Tempo de 36 horas	53
7.1.9 Tempo de 48 horas	54

7.2 FASE DOIS	55
7.2.1 Avaliação morfológica pós-descongelamento	55
7.2.2 Teste biomecânico	63
7.2.2.1 Pressão máxima	63
7.2.2.2 Curva de pressão	65
7.2.2.3 Local da falha	75
8 DISCUSSÃO	77
8.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	77
8.2 TESTE BIOMECÂNICO	78
8.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS	79
8.4 RELAÇÃO ENTRE HISTOLOGIA E PRESSÃO MÁXIMA	79
8.5 CURVA DE PRESSÃO	81
8.6 CARACTERÍSTICAS DA FALHA	83
8.6.1 Número de segmentos envolvidos nas rupturas	84
8.7 AMOSTRAS DESCONGELADAS	85
8.8 APLICABILIDADE	86
9 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma série de estudos de biomecânica intestinal da espécie equina têm sido desenvolvidos com o objetivo de encontrar as melhores técnicas para procedimentos de sutura intestinal. Estas pesquisas foram realizadas tanto em nível experimental em ensaios *in vitro*, quanto em estudos retrospectivos de casos clínicos. Quando se trata dos ensaios *in vitro*, a totalidade dos trabalhos é realizada com peças a fresco, ou seja, com as técnicas estudadas e o teste biomecânico executados dentro de poucas horas após a morte dos animais dos quais as peças são retiradas.

Apesar do volume de publicações nesta área, nenhum dos trabalhos consultados apresenta razões claras para a determinação do tempo limite de utilização das peças após o óbito dos indivíduos doadores. Desta forma, ainda é desconhecido o limite de tempo que os segmentos intestinais podem ser armazenados para a realização dos ensaios antes que a autólise altere a resistência biomecânica da parede intestinal.

Considerando a combinação entre a pequena quantidade de abatedouros de equinos no país, assim como a dificuldade na obtenção de amostras padronizadas a partir da rotina hospitalar, além de questões de logística, se torna muito difícil a utilização de peças frescas para a realização de estudos biomecânicos. Entretanto, considerando a espécie bovina, há boa disponibilidade de abatedouros, o que permite fácil acesso a grande quantidade de material com alto grau de padronização. O processo de degeneração tecidual do intestino delgado de animais sadios também é um assunto pouco estudado, o que traz à tona a necessidade se explorar o tema visando melhor entendimento dos processos naturais de degradação *post mortem*. Além disso, o efeito da degradação sobre os resultados de estudos biomecânicos intestinais e de enteroanastomoses é desconhecido.

O congelamento é umas das técnicas mais usuais para a conservação tecidual e tem protocolos bem estabelecidos para alguns tipos específicos de tecido. Sabe-se que esta técnica tem o potencial de interromper a proliferação bacteriana e, desta maneira, conservar os materiais por longos períodos. Entretanto, também são raras as pesquisas aplicando esta técnica como forma de conservação intestinal, tornando clara a necessidade de comprovar ou descartar sua eficácia neste caso, e é a isso que se dedica parte deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTOLOGIA INTESTINAL

Todo o trato digestório apresenta características estruturais em comum. Trata-se de um tubo oco composto por um lúmen, circundado por uma parede formada por quatro camadas básicas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.1.1 Camada mucosa

A camada mucosa é composta por revestimento epitelial do tipo colunar simples, lâmina própria e a muscular da mucosa. A lâmina própria é formada de tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos e linfáticos e células musculares lisas, algumas vezes apresentando também glândulas e tecido linfóide. A muscular da mucosa, que separa a camada mucosa da submucosa, consiste em duas subcamadas delgadas de musculatura lisa, uma circular interna e outra longitudinal externa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A mucosa do intestino delgado apresenta várias estruturas que aumentam sua superfície, aumentando assim a área para absorção de nutrientes. Quando observado a olho nu, o revestimento do intestino delgado apresenta uma série de pregas permanentes, *plicae circulares*, em forma semilunar, circular ou espiral, que consistem em dobras da mucosa e submucosa. Já as vilosidades intestinais são projeções alongadas da mucosa (epitélio e lâmina própria) com cerca de 0,5 a 1,5 mm de comprimento, em direção ao lúmen intestinal. Entre os vilos existem pequenas aberturas de glândulas tubulares simples denominadas glândulas intestinais ou criptas. O epitélio de revestimento dos vilos é do tipo colunar simples. É formado principalmente por células absorptivas (enterócitos) e células caliciformes, e se continua com o epitélio das criptas, que por sua vez contém algumas células absorptivas, caliciformes (de Paneth), enteroendócrinas e células-tronco. A cripta tem formato tubular e representa o compartimento proliferativo do intestino (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A lâmina própria do intestino delgado é composta por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e musculares lisas. Ela preenche o centro das vilosidades intestinais, onde as células musculares lisas (dispostas verticalmente entre a muscular da mucosa e a ponta das vilosidades) são

responsáveis pela movimentação rítmica, importante para a absorção dos nutrientes (GARTNER; HIATT, 2010).

2.1.2 Camada submucosa

A camada submucosa é formada por um tecido conjuntivo frouxo, porém mais fibroso, que suporta fisicamente a mucosa e fornece os suprimentos nervoso (plexo submucoso), vascular e linfático para a mucosa (GARTNER; HIATT, 2010).

Segundo Raikevitch (1963), a camada submucosa contribui com 70 a 75% da força da parede intestinal, enquanto a serosa é relatada como responsável por apenas 5 a 10% (apud SHERLOCK et al., 2011). A submucosa provém a estabilidade mecânica, força e resistência a deformações extensas de longa duração no intestino delgado de humanos (EGOROV et al., 2002).

2.1.3 Camada muscular

A camada muscular contém células musculares lisas orientadas em espiral, divididas em duas subcamadas de acordo com o direcionamento principal. Na subcamada mais interna, a orientação é geralmente circular; na camada externa, é majoritariamente longitudinal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A túnica muscular externa atua no revolvimento e na propulsão dos conteúdos luminais ao longo do trato digestório através da ação peristáltica. Deste modo, a medida que a musculatura circular reduz o diâmetro do lúmen, prevenindo a movimentação do conteúdo luminal no sentido oral, a musculatura longitudinal se contrai de tal modo a empurrar o conteúdo luminal em direção aboral (GARTNER; HIATT, 2010).

Entre essas duas subcamadas observam-se o plexo nervoso mioentérico e o tecido conjuntivo contendo vasos sanguíneos e linfáticos. Assim, as contrações da camada muscular, geradas e coordenadas pelos plexos nervosos, impulsionam e misturam o alimento no trato digestório. Esses plexos são compostos principalmente por agregados de células nervosas (neurônios viscerais multipolares) que formam pequenos gânglios parassimpáticos. Uma rede rica em fibras pré e pós-ganglionares do sistema nervoso autônomo e algumas fibras sensoriais viscerais possibilitam comunicação entre esses gânglios (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.1.4 Camada serosa

A serosa é formada por uma camada delgada de tecido conjuntivo frouxo, revestida por um epitélio pavimentoso simples denominado mesotélio, o qual reduz as forças de fricção durante os movimentos digestórios. Na cavidade abdominal, a serosa que reveste os órgãos é denominada peritônio visceral e está em continuidade com o mesentério (membrana delgada revestida por mesotélio nos dois lados) que suporta os intestinos, e com o peritônio parietal, uma membrana serosa que reveste a parede abdominal. Em locais em que o órgão está unido a outros órgãos ou estruturas, no entanto, a serosa é substituída por uma adventícia espessa, que consiste em tecido conjuntivo e adiposo contendo vasos e nervos, sem o mesotélio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

2.2 DEGRADAÇÃO INTESTINAL

Scheifele e colaboradores (1987) realizaram uma pesquisa sobre a velocidade de autólise da mucosa intestinal de ratos, na qual concluíram que o intestino coletado meia hora após o óbito e fixado imediatamente após a coleta demonstrava extensa descamação das vilosidades e perda da arquitetura das mesmas.

O exame *post mortem* que visava encontrar alterações histológicas em cadáveres humanos selecionados de forma aleatória, demonstrou que o tempo entre o óbito e a coleta do intestino resultou em pouca diferença na qualidade do material. Foi relatado que os pacientes com morte súbita, ou seja, sem doença prévia aparente, a mucosa intestinal se apresentava normal. Em contraste, os pacientes que haviam morrido devido à doenças como neoplasias malignas, cirrose e insuficiência cardíaca congestiva apresentavam alterações na mucosa (LOEHRY; CREAMER, 1966).

Um estudo avaliou a velocidade e intensidade da autólise intestinal comparando leitões sadios convencionais, leitões estéreis e monoinfectados com *E. coli*. Seus resultados apontam que os animais com microbiota normal demonstraram degradação intestinal muito mais rápida e intensa do que os animais estéreis. Os indivíduos monoinfectados mostraram resultado intermediário aos outros dois grupos. Apesar de diferentes intensidades e velocidades, o padrão de alterações autolíticas foi o mesmo nos três grupos. A primeira alteração visível foi o aparecimento de espaço preenchido por fluido na junção dos limites das células laterais e da base das células epiteliais que cobriam as vilosidades. Com o aumento deste espaço, o epitélio se separou da lâmina própria e formou uma camada relativamente uniforme que nos

cortes se pareceu como um anel epitelial. Como o espaço subepitelial aumentou, a lâmina própria se tornou mais curta e larga (CROSS; KOHLER, 1969).

Um trabalho buscou determinar a frequência, extensão e possível etiologia de alterações enteropáticas em crianças que foram a óbito entre uma semana e um ano de vida. Dos 78 indivíduos analisados, 18 apresentavam alterações de mucosa, sendo que destes apenas quatro apresentavam sintomas correspondentes ao trato gastrointestinal. As alterações descritas foram o achatamento da superfície epitelial dos vilos, variações na celularidade da lâmina própria e degeneração epitelial com debris celulares no lúmen das criptas (VARIEND; SUNDERLAND, 1984).

Fuller e colaboradores (2013) conseguiram isolar células de epitélio intestinal de ratos 24 horas após o óbito com tecidos refrigerados a 4°C. A lavagem do intestino resultou em recuperação de mais de 50% de células viáveis enquanto tecidos armazenados sem serem lavados apresentaram uma queda importante na taxa de células epiteliais viáveis. Foi ainda observada manutenção da arquitetura das criptas por 30 horas *post mortem*. Após este período as vilosidades passaram a se afastar de seus núcleos laminares e se apresentavam praticamente ausentes até 48 horas. Alguns tecidos mantinham suas criptas conservadas após 48 horas, embora em outras áreas, as mesmas estavam destacadas da submucosa e com considerável retração celular (FULLER et al., 2013).

Um trabalho avaliou o efeito da circulação extracorpórea sobre a apoptose intestinal em leitões. Amostras coletadas após duas horas exibiam condensação da cromatina em diferentes pontos das vilosidades, enquanto as criptas apresentavam fragmentação e picnose, além de condensação da cromatina. Já com oito horas de procedimento, a maioria das vilosidades estava desnuda de epitélio e grande parte das células epiteliais das criptas apresentavam alterações apoptóticas. (MOHANKUMAR et al., 2014).

Quando se trata de preservação por estocagem a frio de órgãos para fins de transplante, o limite máximo tolerável é de quatro horas para coração e pulmão. Este período passa a ser de oito a 12 horas para fígado, intestino e pâncreas, e acima de 36 horas para rins (LEWIS et al., 2016).

2.3 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO TECIDUAL

A conservação tecidual é uma preocupação milenar, realizada primariamente por razões culturais e religiosas, e vem avançando, ao longo dos séculos, com objetivos didáticos e acadêmicos (CURY; CENSONI; AMBRÓSIO, 2013). Tem como objetivo preservar, da maneira mais próxima possível, a morfologia e características das peças como são nos animais vivos, tal como consistência, coloração e flexibilidade. Há alguns anos pode-se contar com grande variedade de técnicas que auxiliam na preservação dos tecidos animais para estudo (KIMURA; CARVALHO, 2010).

Uma das técnicas para conservação tecidual utilizada para fins de estudo é a fixação. Este processo provoca a interrupção da atividade enzimática responsável pela autólise e decomposição (HAMMER et al., 2012).

O grande avanço na conservação tecidual foi a descoberta do formaldeído pelo cientista alemão Willian Hoffman, em 1859. Este é um gás de odor penetrante, solúvel em água, com poderosa ação conservante já que tem um amplo espectro germicida (MUÑETÓN GÓMEZ; ORTIZ, 2013).

O formaldeído possui pH entre 2,8 e 4, sendo líquido em temperatura ambiente, e apresentando propriedades antifúngicas e bactericidas (VERONEZ et. al., 2010). O produto é classificado pela Agência Internacional de Pesquisas em Câncer como cancerígeno (IARC, 1995) e precisa ser substituído para preservar a saúde de todos que frequentam os laboratórios, pois além de ser um produto prejudicial ao meio ambiente, possui vários fatores negativos, como odor desagradável, escurecimento, aumento do peso e rigidez das peças (KRUG et al., 2011).

Segundo estudos citados por Carvalho (2009), o formaldeído apresenta efeitos destrutivos em tecidos do corpo humano e no próprio DNA, sendo assim, o seu uso além de causar lacrimejamento, irritação das mucosas nasais e queimação da garganta, causa sérios riscos à saúde de quem está próximo ao produto químico.

Devido aos riscos à saúde apresentados pelo formol, nas últimas duas décadas, vários estudos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de substituí-lo. As opções mais frequentemente encontradas são a glicerina (CURY; CENSONI; AMBRÓSIO, 2013; KARAM et al., 2016), solução hipersaturada de sacarose, produtos antissépticos e desinfetantes (NOLASKO et al., 2003), líquidos iônicos (MAJEWSKI et al., 2003), além de tratamento térmico (LOBO et al., 2008). Tais meios devem impedir

a decomposição, manter o máximo da integridade celular e atuar por período prolongado (ALVARENGA, 1992).

Segundo Cury (2013), o uso do formaldeído pode ser reduzido, mas não ser completamente descartado, já que as técnicas de glicerinação podem ser executadas tanto em peças frescas quanto em peças já formalizadas a 10%, para serem dissecadas antes do procedimento

2.3.1 Criopreservação

Entender os efeitos de protocolos de estocagem nos mecanismos de ruptura pode ter aplicações clínicas e experimentais. Espécimes experimentais de tecidos moles são comumente obtidas de cadáveres mantidos em estocagem a frio por períodos limitados e depois armazenados em freezers até o momento dos testes. Protocolos de armazenamento específicos podem não ser efetivos em tecidos de degradação lenta, resultando em queda da acurácia com relação às condições do tecido *in vivo* (STEMPER et al., 2007).

Congelação rápida pode provocar um desequilíbrio entre as células e o meio, provocando um super resfriamento e congelamento da água intracelular. Isto pode induzir desequilíbrios osmóticos que podem ser danosos às células. Similarmente, o resfriamento lento pode resultar em exposição das células a soluções eletrolíticas altamente concentradas, provocando desidratação celular extrema (FULLER et al., 2004). Portanto, o resfriamento lento, ou rápido demais, pode causar ruptura da membrana celular (LOBO et al., 2008).

Um conhecido mecanismo de expansão termal é o aumento da distância entre as moléculas com o aumento da temperatura. Outro mecanismo de expansão térmica é o rearranjo molecular durante o processo de cristalização. Expansão semelhante pode ocorrer devido ao rearranjo molecular associado com as alterações sólido-sólido. Embora as alterações da cristalização sejam associadas com mudanças de temperatura muito pequenas, o resultado pode ser catastrófico. Por exemplo, a cristalização da água pura é associada com o aumento de 9% da tensão volumétrica térmica. Se a água for encapsulada em um envoltório de gelo, a tensão térmica toma tamanha magnitude que pode facilmente levar a lesões estruturais na fase sólida, e culminar em pressões hidrostáticas dramáticas na fase líquida (RABIN 1998a,1998b, 2000).

O estresse mecânico é apenas um dos vários mecanismos de crioinjúria. Outro mecanismo de lesão pelo congelamento, muito mais estudado, é a formação de cristais de gelo tanto no espaço intra como extracelular, que desencadeia uma sequência de eventos destrutivos em nível celular (GAGE; BAUST, 1998).

A preservação a longo prazo de tecidos tem aumentado sua utilização, melhorado a funcionalidade a curto e longo prazo de enxertos, o que melhora a sobrevida de pacientes. Muitos sistemas menores, como células, podem ser preservados com sucesso por criopreservação (KARLSSON; TONER, 1996) ou vitrificação, um processo que converte líquido em vidro (JIN; KLEINHANS; MAZUR, 2014). Entretanto, no caso de sistemas maiores, como tecidos, a criopreservação utilizando soluções crioprotetoras de 1 a 4M geralmente falham devido à formação de cristais de gelo (PEGG, 2007). Mesmo assim, com soluções mais concentradas (6 a 8M), tecidos viáveis e órgãos, como rins de coelho, podem ser difundidos ou perfundidos, respectivamente, resfriados, e estabilizados em estado “vítreo” ou “amorfo” sem a formação de cristais em temperatura de vapor de nitrogênio (-160°C) (FAHY et al., 2009; BROCKBANK et al., 2015).

Infelizmente, os avanços em resfriamento e criopreservação não têm sido acompanhados por melhora no reaquecimento. Duas barreiras tecnológicas têm se mostrado muito difíceis de serem superadas. Primeiramente, taxas de aquecimento críticas para evitar devitrificação, o processo de cristalização durante o aquecimento, são tipicamente de magnitude maior do que as taxas de resfriamento correspondentes (ETHERIDGE et al., 2014). Em segundo lugar, essas taxas têm de ser uniformes em todo o tecido, evitando gradientes térmicos que produzem estresse térmico e podem levar a fraturas no tecido caso excedam a resistência do material (STEIF; PALASTRO; RABIN, 2007).

2.3.1.1 Criopreservação Intestinal

Mota e colaboradores (2003) não obtiveram sucesso na conservação da camada muscular intestinal por congelamento, a -16° C, em solução fisiológica a 0,9%. Relatou-se aumento acentuado do espaço intersticial em relação ao grupo controle, analisado logo após o óbito. Entretanto, o método se mostrou eficiente no controle do crescimento de microrganismos (MOTA et al., 2003).

Dois protocolos de congelamento foram utilizados para testar a preservação da integridade de DNA de células de musculatura intestinal. Os resultados apontam que

o congelamento, quando realizado em etapas, de forma a criar uma curva de congelamento lenta, reduz a intensidade dos danos ao DNA (LOBO et al., 2008).

Um estudo com objetivo de avaliar histologicamente a camada de muco do intestino delgado e do cólon de leitões utilizou nitrogênio líquido para o congelamento do material. Apesar de boa preservação do tecido não foi possível avaliar da camada de muco (RÖHE et al., 2018).

2.3.1.2 Criopreservação de outros tecidos

Stemper e colaboradores (2007) realizaram um ensaio comparando a resistência biomecânica arterial utilizando amostras frescas, refrigeradas e congeladas em diferentes temperaturas. Seus resultados apontam que os métodos de conservação não alteraram significativamente a resistência das camadas arteriais internas, entretanto, o resfriamento apresentou um resultado inferior quanto à resistência total da parede arterial.

Shoshani e colaboradores (2001) realizaram um estudo avaliando a viabilidade de enxertos de tecido adiposo após congelamento em freezer doméstico e descongelamento em temperatura ambiente, quando implantados em ratos. Não houve diferença estatística no volume e peso entre os enxertos realizados a partir do tecido congelado, quando comparados aos enxertos de tecido fresco (controle). Também não foram observadas diferenças histológicas entre os dois grupos.

Um estudo avaliou os efeitos do aquecimento e do congelamento a -20°C nas características físicas e histológicas do fígado de suínos. Suas conclusões apontam que a congelação não influenciou as propriedades biomecânicas do parênquima hepático bem como não provocou lesões dos hepatócitos, embora tenha causado dilatação dos canalículos biliares e dos vasos sinusoides (WEX et al., 2014).

O congelamento se mostrou eficiente como método de preservação de tendões bovinos, mantendo suas características histológicas, porém, na microscopia eletrônica, puderam ser observadas rupturas de organelas e da membrana citoplasmática dos fibrócitos (NOLASKO et al., 2003).

2.3.2 Glicerina

O nome glicerina foi dado comercialmente a um produto que diz respeito à substância glicerol, possuindo pureza acima de 95%. O glicerol é um composto

orgânico pertencente à função álcool, de forma líquida a temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado (SILVA, et al. 2008).

A glicerina a 98% apresenta propriedade antisséptica e rápida ação desidratante. Substitui a maior parte da água intracelular sem alterar a concentração iônica das células, protegendo assim a integridade celular. Além de ser de baixo custo, pode ser mantida a temperatura ambiente (ALVARENGA, 1977 e 1992).

Mota e colaboradores (2003), utilizando solução de glicerina a 98%, conservaram a camada muscular intestinal por um período de 45 dias sem que houvesse alterações histológicas, exceto pela condensação no núcleo celular, comparado com o grupo controle.

A conservação de tendões bovinos por período de 70 dias demonstrou retração tecidual, caracterizada pelo distanciamento das fibras colágenas, no entanto, sem aumentar o volume dos fragmentos analisados. Quando observados sob microscopia eletrônica, os fragmentos demonstraram destruição do citoplasma dos fibrócitos, sem desagregação do núcleo (NOLASKO et al., 2003).

O peritônio de cães conservados em glicerina, por variados intervalos de tempo, sofreu queda na sua resistência à tração quando comparado com o tecido a fresco. Os peritônios de bovino e de equino, no entanto, mantiveram suas resistências quando analisados a fresco ou conservados em glicerina. Histologicamente observou-se que o material a fresco tende a se corar melhor pela técnica de HE. Observou-se também que o peritônio a fresco mantém suas fibras e células mais unidas, ao passo que os conservados em glicerina mostram seus componentes mais dissociados, e estes aspectos foram independentes do tempo de conservação. O estudo concluiu que a glicerina pode ser usada eficientemente para preservação de membranas biológicas, visto que as amostras conservadas não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (BATISTA et al., 1996).

2.3.3 Solução hipersaturada de sacarose

A solução de açúcar hipersaturada é considerada bactericida em concentrações superiores a 250% (NETO et al., 1997), e por esta razão, vem sendo testada como método alternativo para preservação tecidual.

A preservação da camada muscular do intestino delgado de cães se mostrou satisfatória quando o material foi mantido em solução glicosada a 300% com e sem antibiótico. A solução foi capaz de impedir a contaminação microbiana e preservou o

tecido em avaliação histológica, sendo notado apenas um pequeno aumento no espaço intersticial (MOTA et al., 2003).

Nolasko e colaboradores (2003) testaram a solução de glicose a 300% na conservação de tendões bovinos e descobriram que a mesma preservou as características histológicas do tecido sob a microscopia óptica, havendo um pequeno e raro afastamento entre as fibrilas e a completa destruição do citoplasma dos fibrócitos, sem desagregação do núcleo, sob microscopia eletrônica.

2.3.4 Polivinil-pirrolidona

Uma pesquisa revelou que apesar de impedir a proliferação de bactérias, a solução a de polivinil-pirrolidona a 50% provocou a destruição dos núcleos celulares e o extravasamento da cromatina da parede intestinal conservada nessa solução (MOTA et al., 2003).

Um estudo revelou que fragmentos de tendões de bovinos preservados em polivinil-pirrolidona, por 70 dias, não apresentaram alterações histológicas à microscopia óptica e demonstraram boa organização das fibras colágenas sob microscopia eletrônica (NOLASKO et al., 2003).

2.3.5 Glutaraldeído

É um agente desinfetante bactericida que apresenta rápida e efetiva ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. É lentamente efetivo contra esporos. Uma solução apresenta atividade ótima em pH entre 7,5 e 8,5, sendo quimicamente estável por 14 dias. Se trata de um dialdeído alifático, de baixo peso molecular, líquido, miscível em água, álcool, solventes orgânicos e ácido (pH de 3 a 4). Em temperatura ambiente é incolor e de odor pungente (DRUGDEX, 2007).

O glutaraldeído se mostrou eficiente na conservação de tendões bovinos, não provocando alterações histológicas e mantendo o bom alinhamento entre as fibras colágenas (NOLASKO et al., 2003).

2.3.6 Líquidos iônicos

São uma classe de sais orgânicos, líquidos em temperatura ambiente em sua forma pura. Alguns deles são compostos por cátions orgânicos como amônia quaternária, imidazólicos, aromáticos heterocíclicos e compostos não aromáticos. Os líquidos iônicos são divididos em duas grandes categorias, consistindo em ânions

simples, como PF_6^- , BF_4^- , AsF_6^- , SbF_6^- , CF_3SO_3^- , $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{C}^-$, CF_3COO^- e $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ e binários. Estes consistem em diversos tipos iônicos com ponto de fusão e acidez de Lewis dependentes do tamanho da fração molar de AlCl_3 ou CuCl em ânions estabelecidos como AlCl_4^- , Al_2Cl_7^- , $\text{Al}_3\text{Cl}_{10}^-$, CuCl_2^- , Cu_2Cl_3^- , Cu_3Cl_4^- . Estes sais binários são sensíveis a água e se decompõe em sua presença. Quando expostos ao ar, liberam grandes quantidades de HCl (MAJEWSKI et al., 2003).

As técnicas utilizando soluções iônicas parecem ser das mais promissoras na busca de alternativas menos prejudiciais, em relação aos compostos orgânicos voláteis utilizados atualmente em grande escala. Os líquidos iônicos possuem alta capacidade de dissolver várias substâncias orgânicas e inorgânicas (MAJEWSKI et al., 2003).

Um estudo avaliou a qualidade da fixação de diversos tipos de tecido utilizando líquidos iônicos e concluiu que os mesmos apresentaram resultados superiores a fixação em formaldeído. Foi apresentado como argumento que os líquidos iônicos não alteraram a coloração e nem provocaram encolhimento do tecido por exposição prolongada. Além disso, a técnica permitiu a análise histológica dos tecidos com maior precisão (MAJEWSKI et al., 2003).

2.4 AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA INTESTINAL

2.4.1 Tipos de teste

Diversos tipos de testes biomecânicos têm sido aplicados para entender as características físicas do intestino. O método mais comumente encontrado nos trabalhos é o de distensão, que pode ser realizado utilizando gás (LEE et al., 2012) ou líquido (BRACAMONTE et al., 2014). Também são desenvolvidos os testes de tração (WU et al., 2003), de compressão (ROSEN et al., 2008) e passivos (SOKOLIS, 2017).

2.4.1.1 Teste de distensão

Esta modalidade vem sendo aplicada com vários propósitos, como mensuração da eficiência de padrões de sutura (GANDINI; IOTTI; GIUSTO, 2013; ROSSER et al., 2012), comparação entre materiais de sutura (NELSON; HASSEL, 2014), e avaliação

de técnicas de instalação de materiais, como sondas para alimentação enteral (RISSELADA et al., 2015).

Neste modelo de ensaio o segmento intestinal é imerso em diferentes tipos de solução, podendo ser cloreto de sódio a 0,9% (NELSON; HASSEL, 2014), ringer com lactato (GANDINI, 2010) ou krebs ringer (NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006; LEE et al., 2012; ROSSER et al., 2012). O objetivo de manter a alça imersa é facilitar a percepção da falha intestinal, ou da sutura, pela visualização de bolhas nos estudos que realizam a distensão por gás (AULETTA et al., 2011; SHERLOCK et al., 2011).

A insuflação foi o modelo mais citado na literatura, sendo descritas taxas de infusão de 0,5 L/min (EGGLESTON et al., 2004) e 1,0 L/min (GANDINI, 2006) para distensão do intestino delgado de equinos. Para a distensão do mesmo órgão em cães foi relatado o uso de líquido na quantidade de 4 ml/min (RISSELADA et al., 2015).

Os estudos que distendem o intestino com líquido (BRACAMONTE et al., 2014; RISSELADA et al., 2015) o fazem com soluções tingidas que também podem ser facilmente identificadas em meio a solução de imersão no momento da falha. A taxa de infusão descrita foi também de 1,0 L/min para distensão do intestino delgado de equinos (BRACAMONTE et al., 2014).

Foi relatado que as medidas de pressão de ruptura podem depender da taxa de distensão intestinal, e que taxas mais altas podem aumentar a pressão de ruptura necessária para a falha (NELSEN e ANDERS, 1966 apud AULETTA et al., 2011).

O método utilizado para o aumento da pressão intraluminal também é variável, se comparados os estudos encontrados. Em trabalhos desenvolvidos com a distensão por gás foram utilizados cilindros de ar (GANDINI, 2006) ou oxigênio comprimidos (EGGLESTON et al., 2004), mas também sistemas manuais, como peras insufladoras como aquelas utilizadas em aparelhos de aferição de pressão arterial (AULETTA et al., 2011; LEE et al., 2012). Já os trabalhos que injetam líquido na alça, geralmente o fazem com bombas de infusão (NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006; RISSELADA et al., 2015).

A técnica utilizada para a aferição da pressão também diferiu entre os estudos pesquisados. Alguns utilizaram equipamentos simples como manômetros (ROSSER et al., 2012) e esfigmomanômetro de mercúrio (AULETTA et al., 2011; GANDINI, 2006, 2010), enquanto outros fizeram uso de transdutores eletrônicos que importavam as informações para um computador em tempo real (BRACAMONTE et al., 2014; NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006).

2.4.1.2 Teste de tensão

Este método já foi aplicado para a avaliação da resistência da cicatrização de enteroanastomoses (WU et al., 2003) bem como na determinação das características elásticas da parede intestinal sadia (WU et al., 2004).

Burin e colaboradores (2009) utilizaram uma técnica semelhante para este tipo de teste. A extremidade proximal foi fixada a um cateter conectado a um sistema de tração, enquanto a extremidade distal foi fixada a outro cateter, sendo este ligado a uma célula de carga de uma balança de precisão, tendo como peça intermediária uma torneira de via tripla. Esta balança foi conectada a um computador para o registro das informações em tempo real. A torneira de via tripla foi utilizada como acesso para preencher o intestino com líquido usando de uma seringa, que por sua vez estava ligada a um polígrafo responsável pela aferição da pressão interna do segmento intestinal durante o teste.

Um sistema mais simples foi aplicado por Massalou e colaboradores (2016) utilizando apenas um dispositivo de tração hidráulico e um sensor de tensão, ligado a um computador. Os testes foram ainda registrados em alta velocidade para avaliação do padrão de ruptura das amostras. Observou-se que a maioria dos espécimes de cólon humano submetidos à tensão uniaxial tem como lesão inicial a ruptura da camada serosa, que se estende para as camadas mais profundas.

2.4.1.3 Teste de compressão

Este tipo de teste foi aplicado no estudo dos efeitos da pressão, por exemplo, dos instrumentais sobre as vísceras durante um procedimento cirúrgico (ROSEN et al., 2008) e para avaliar os efeitos de implantes artificiais sobre os órgãos internos (HIGA et al., 2007).

Para os ensaios de compressão foi utilizada uma pinça de laparoscopia motorizada e um equipamento de compressão hidráulica universal. A pinça laparoscópica foi aplicada em todos os testes *in vivo*, *in situ*, *ex corpus* e *in vitro*, enquanto o equipamento de compressão universal foi usado apenas nos ensaios *ex corpus* e *in vitro* (ROSEN et al., 2008).

2.4.1.4 Testes passivos

Este tipo de estudo foi desenvolvido no intuito de conhecer a biomecânica da parede intestinal sob as condições sem carga e zero estresse, ou seja, quando não

há, respectivamente, forças externa ou interna atuando sobre o tecido (ZHAO, 2002). Para este tipo de ensaio, o intestino foi incisado em anéis medindo 2 mm de espessura e analisados por registro de imagens e medições das dimensões destes anéis realizadas por um software de processamento de imagens. As condições sob carga zero foram obtidas apenas a partir dos anéis íntegros em repouso. Já as informações em zero estresse foram obtidas após realizar uma incisão na borda antimesentérica. Neste caso, as forças intrínsecas da parede intestinal provocam uma abertura do anel e é justamente o ângulo desta abertura um dos parâmetros utilizados para avaliação biomecânica (SOKOLIS et al., 2017).

2.4.2 Coleta e processamento das amostras

Entre os estudos que utilizaram o intestino de equinos, alguns autores coletaram as amostras de animais de abatedouros (AULETTA et al., 2011; GANDINI, 2010), enquanto outros usaram peças oriundas de indivíduos eutanasiados por doenças não relacionadas ao sistema digestório (BRACAMONTE et al., 2014; NELSON; HASSEL, 2014; ROSSER et al., 2012). Eggleston e colaboradores (2004) realizaram uma fase do estudo em animais de experimento vivos e executou o teste biomecânico após a eutanásia dos mesmos.

De acordo com as pesquisas consultadas, a lavagem desses segmentos pode ser realizada com solução salina (NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006) ou água corrente (GANDINI; IOTTI; GIUSTO, 2013). Para o armazenamento foi indicado imergir os espécimes em solução salina até momento dos testes (SHERLOCK et al., 2011).

Segundo os autores, a coleta, transporte, execução das suturas e teste biomecânico devem ocorrer em tempo máximo de duas (RISSELADA et al., 2015), três (BRACAMONTE et al., 2014) e quatro horas (AULETTA et al., 2011; GANDINI, 2006, 2010; GANDINI; IOTTI; GIUSTO, 2013; LEE et al., 2012; SHERLOCK et al., 2011) após o óbito dos animais doadores.

2.4.3 Parâmetros avaliados

O objetivo principal da maioria dos estudos que avaliam a biomecânica intestinal é a comparação da eficiência dos diversos padrões de enteroanastomose. Portanto, as variáveis consideradas como determinantes por estes estudos para

avaliar o sucesso das técnicas são o tempo de realização das mesmas (BRACAMONTE et al., 2014), a capacidade de selamento produzido, ou seja, a eficiência em prevenir o vazamento de conteúdo intestinal (LEE et al., 2012), a pressão intraluminal suportada antes da falha (extravasamento) (BRACAMONTE et al., 2014), redução do lúmen intestinal (NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006) e quantidade de material exposto (FREEMAN, 2003).

A única destas variáveis relevante para o presente estudo é a resistência à pressão intraluminal, e por isso, se apresenta a seguir uma sessão dedicada ao assunto.

2.4.3.1 Pressão intraluminal

A pressão intraluminal de repouso relatada em cães varia de 2 a 6 mmHg (TASAKA; FARRAR, 1976), enquanto a pressão peristáltica fisiológica oscila entre 15 e 25 mmHg. O pico de pressão intraluminal em cães pode chegar a 62,5 mmHg, apesar de pressões superiores a 30 mmHg serem capazes de provocar estase capilar e linfática, e pressões acima de 50 mmHg causarem oclusão venosa completa (SHIKATA et al., 1983). Em equinos foram registradas pressões acima de 15 mmHg em animais que não sobreviveram a processos obstrutivos (ALLEN et al., 1986). Um estudo experimental com obstrução extraluminal aferiu pressões entre 8 e 24 mmHg durante os movimentos peristálticos, e picos de pressão superiores a 60 mmHg (MACHARG et al., 1986).

Risselada (2015) insuflou o intestino delgado canino com pressão de 6 mmHg para a mensuração de seu lúmen por meio de ultrassonografia. Já um estudo com intestino de equinos utilizou o mesmo método para aferição do diâmetro luminal, distendendo o segmento até 20 mmHg (BRACAMONTE et al., 2014). Um trabalho utilizando a flexura pélvica de equinos distendeu a alça utilizando 10 mmHg para a mensuração do lúmen (ROSSER et al., 2012). Outro estudo fazendo uso de radiografias contrastadas para mensuração do lúmen inflou as alças até atingirem 14 mmHg (GANDINI, 2006).

Pressões acima de 58 mmHg são relatadas como causadoras de lesão da parede intestinal em equinos (MATHIS et al., 2006). Nesta espécie, a indução experimental de pressões acima de 13,2 mmHg provocou edema da lâmina própria das vilosidades jejunais. Além disso, a pressão de 18,4 mmHg mantida por 120 minutos causou encurtamento dos vilos, perda de células mesoteliais, infiltração

neutrófila, edema seromuscular e redução no número de vasos da camada seromuscular (FREEMAN, 2002).

A pressão suportada pela sutura intestinal está diretamente ligada à sua resistência. A camada submucosa é considerada a responsável pela força mecânica das suturas no intestino delgado, e a falha em ancorá-la nas mesmas é a principal causa de falha primária nos estudos *in vitro* (GANDINI, 2010). Em um experimento que testava a resistência biomecânica de diferentes técnicas de fixação de sondas de jejunostomia, a incisão acidental da camada submucosa em um dos espécimes testados reduziu drasticamente a pressão suportada no teste biomecânico (RISSELADA et al., 2015). Ainda, a ineficiência em ancorar a anastomose na submucosa utilizando grampeadores automáticos foi responsável por uma redução significativa na resistência da técnica quando comparada com anastomoses realizadas manualmente (BRACAMONTE et al., 2014).

Entretanto, a inclusão da submucosa em todas as passagens da sutura, evitando pontos excessivamente longos e predispondo a invaginação exagerada, pode ser mais desafiadora em cavalos vivos nos quais o intestino fica edemaciado em resposta à manipulação (SHERLOCK et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar a degradação histológica em diferentes tempos *post mortem* do jejuno de bovinos hígidos, bem como os efeitos do congelamento e descongelamento sobre sua resistência biomecânica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Avaliar a degradação intestinal em nível histológico nos diferentes períodos *post mortem*;
- Comparar as alterações macroscópicas e histológicas durante o processo de degeneração e autólise;
- Avaliar a resistência biomecânica do jejuno de bovinos sadios a fresco;
- Documentar a perda da resistência biomecânica do intestino ao longo do tempo *post mortem*
- Correlacionar as alterações macro e microscópicas do intestino durante a degradação com a perda de sua resistência biomecânica;
- Descrever as alterações macro e microscópicas sofridas pelo intestino delgado após congelamento e descongelamento;
- Identificar as alterações biomecânicas sofridas pelo intestino após congelamento e descongelamento.

4 JUSTIFICATIVA

O desconhecimento sobre a durabilidade dos espécimes utilizados após o abate dos animais doadores é importante restrição para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo a biomecânica intestinal. Também não existem estudos sobre a viabilidade do congelamento como método de preservação a longo prazo das amostras. Este trabalho visa embasar cientificamente o processo de coleta, preservação e utilização do intestino em ensaios biomecânicos e desta maneira, aumentar a confiabilidade dos resultados e diminuir as barreiras para a realização de novos estudos com aplicabilidade clínica na área.

5 HIPÓTESE

A manutenção da viabilidade morfológica e funcional do intestino por longos períodos (até 12 horas) para fins de transplante em humanos, nos permite inferir que as características histológicas e biomecânicas intestinais serão preservadas, sob condições controladas, por períodos maiores do que os relatados em estudos prévios que abordaram a resistência mecânica. Acredita-se que por sua alta celularidade e quantidade de água, as camadas mucosa e muscular sofrerão danos intensos devido ao congelamento. Em contrapartida, o fato das camadas submucosa e serosa serem formadas principalmente por fibras colágenas, com baixa celularidade, permite inferir que estas sofrerão menor impacto. Tendo em vista que a camada submucosa é a principal responsável pela força estrutural da parede intestinal, supõe-se que a resistência biomecânica será preservada nas amostras avaliadas após descongelamento.

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

6.1.1 Fase 1

Para o início do experimento, foram coletadas seis amostras de segmento distal de jejuno de seis bovinos adultos, com peso entre 450 e 550 kg, da raça Nelore, abatidos no matadouro do campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo. As amostras foram coletadas imediatamente após o abate, incluindo no estudo apenas alças que não apresentaram nenhuma anormalidade macroscópica ao exame *post mortem*.

Os segmentos, medindo aproximadamente 50 cm, foram lavados com água corrente em baixa pressão, sem a realização de ordenha, evitando assim qualquer alteração devido à manipulação excessiva (figura 1). As amostras foram embaladas individualmente em sacos plásticos preenchidos com solução de ringer lactato e posicionados sobre uma camada de gelo picado para o transporte até o local onde foram armazenadas para a fase de deterioração.

Figura 1: Segmento intestinal imediatamente após a coleta

Segmento intestinal removido do animal número um, após lavagem, pronto para ser embalado. Fonte: MATHEUS, 2019.

Neste período as alças foram mantidas em sacos plásticos, imersas em solução fisiológica em ambiente com temperatura controlada entre 20 e 25°C (figura 2), até o momento da fixação em formol. As amostras correspondentes ao tempo zero, ou seja, fixadas imediatamente após a coleta e lavagem, não passaram pelo procedimento de embalagem e imersão em solução de ringer lactato descrito acima.

Figura 2: Condição de armazenagem dos segmentos entre os tempos de coleta

Segmentos intestinais embalados individualmente em sacos plásticos preenchidos por solução de ringer lactato.

Fonte: MATHEUS, 2019.

Procedeu-se então a fixação de fragmentos destas peças em solução de formalina a 10% em diferentes períodos pós-abate, sendo eles: T0, formolizado imediatamente após o abate, T2, formolizado duas horas após o abate, T4, quatro horas após o abate, T6, após seis horas, T8, após oito horas, T12, após 12 horas, T18, após 18 horas, T24, após 24 horas, T36, após 36 horas e T48, após 48 horas.

Para cada momento de coleta foi descartada uma faixa de tecido medindo aproximadamente 0,5 cm da extremidade do segmento, antes de seccionar a amostra que seria analisada. Foi então retirada uma faixa de tecido medindo aproximadamente 1,5 cm e realizada a excisão do mesentério (figura 3). Estes fragmentos foram ainda incisados de forma a deixar de ter formato tubular para ter forma plana, facilitando o posicionamento para fixação (figura 4). Cada fragmento foi preso a uma placa de

polietileno expandido com o uso de alfinetes de metal (figura 5), visando impedir o enrugamento do material durante o período de fixação.

Figura 3: Corte de anel de segmento intestinal

Fragmento intestinal coletado ainda em formato tubular para posterior fixação em formol. Fonte: MATHEUS, 2019

Figura 4: Corte de fragmento para fixação

Fragmento intestinal coletado para fixação após ser incisado para adquirir formato plano. Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 5: Fragmento pronto para fixação

Fragmento intestinal fixado em placa de polietileno com o uso de alfinetes de metal. Fonte: MATHEUS, 2019.

As amostras foram imersas em formol a 10%, com pH entre 7,2 e 7,4, em temperatura entre 2 e 8°C, por 72 horas. Após este período o formol foi substituído por álcool etílico a 70% por mais 72 horas. O tecido foi removido das placas de polietileno e transferido para cassetes plásticos. A solução de álcool 70 % foi renovada, onde se mantiveram as amostras por mais 48 horas. Terminado o processo de fixação, foi iniciada a fase de desidratação das amostras com a passagem em álcool etílico 80%, por duas horas, e álcool absoluto por 15 horas. Em seguida procedeu-se a fase de diafanização com a manutenção das amostras em solução de álcool absoluto e xilol em partes iguais, por uma hora, seguida pela imersão em xilol puro por mais uma hora, sendo ambas as etapas realizadas sob constante agitação. Por fim, as amostras foram imersas em parafina, em três estágios de uma hora cada para serem emblocadas.

Após o corte dos blocos, utilizando um micrótomo (RM 2265, Leica®), em espessura de 5 μ m, os cortes foram colocados em banho-maria a 37°C, e posicionados em lâminas de vidro contendo de cinco a 10 fragmentos cada. Após o posicionamento dos cortes as lâminas foram mantidas em estufa, a 60°C por uma hora e, por fim, coradas pelo método de hematoxilina-eosina.

Para a avaliação das lâminas utilizou-se um microscópio bifocal (BX – 60, Olympus®) acoplado a uma câmera digital (Axio Cam HRc, Zeiss®). As imagens foram analisadas com a ajuda de um software específico para leitura de imagens de microscopia (Zen Blue, Zeiss®) (figura 6).

Figura 6: Equipamento utilizado para avaliação histológica

Microscópio BX – 60, Olympus®; câmera digital Axio Cam HRc, Zeiss®, e monitor utilizados para execução e registro do exame histológico no Laboratório e Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica – FMVZ – USP. Fonte: MATHEUS, 2019.

6.1.2 Fase 2

Como segunda parte experimental, segmentos do terço aboral de jejuno de 20 bovinos de mesmas características previamente descritas foram coletados imediatamente após o abate, esvaziados, lavados em água corrente e imersos em ringer com lactato. As amostras foram mantidas sobre uma camada de gelo picado, para redução da temperatura e conservação durante o transporte. As peças obtidas de cada um dos 20 animais foram separadas formando dois grupos, sendo um controle e o outro experimental. Os segmentos do grupo controle (T0), medindo aproximadamente 15 cm cada, foram submetidos ao teste biomecânico de distensão

por gás, realizado em um período máximo de duas horas após o abate. As peças do grupo experimental foram divididas em oito segmentos de aproximadamente 15 cm cada e embaladas individualmente em sacos plásticos e mantidas imersas em solução fisiológica. Sete destes segmentos foram mantidos em temperatura ambiente (20 a 25°C) e submetidos ao teste biomecânico nos intervalos de 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36 e 48 horas (T4, T6, T8, T12, T18, T36 E T 48, respectivamente) após o abate. Esta etapa teve o objetivo de traçar um paralelo entre as alterações morfológicas macro e microscópicas observadas em cada período *post mortem* e a perda, ou não, da resistência biomecânica.

O segmento restante de cada animal foi congelado em freezer doméstico (-20°C), e armazenado por no mínimo uma semana. Após este período as peças foram descongeladas para realização de novo teste biomecânico.

Para o descongelamento, as amostras foram imersas em ringer com lactato e expostas a temperatura ambiente (20 a 25°C). A cada hora, a solução foi substituída com objetivo de manter progressivo o descongelamento. As amostras foram testadas quanto às suas características biomecânicas dentro do período máximo de uma hora após descongelamento.

Entre o término do descongelamento e o início do teste biomecânico foram coletados fragmentos dos segmentos do grupo experimental para análise histológica, seguindo o método já descrito, a fim de justificar possíveis diferenças significantes na resistência biomecânica.

6.1.2.1 Teste biomecânico

A avaliação biomecânica foi realizada utilizando uma adaptação da técnica descrita por Egglestone (2004). Cada segmento intestinal teve suas extremidades ligadas a duas mangueiras, fixadas por meio de abraçadeiras de nylon. A primeira mangueira foi responsável pela infusão de ar, e a segunda estava ligada ao sistema de aferição da pressão. As duas mangueiras foram fixadas a uma tampa plástica, que mantinha o sistema fechado durante o teste. Os segmentos foram então posicionados no interior de um recipiente de vidro, preenchido completamente por solução de ringer com lactato e o frasco foi hermeticamente fechado pela tampa já mencionada. Uma terceira mangueira, também fixada à tampa, com as duas extremidades livres, permitiu a saída de líquido do sistema durante os testes. Desta maneira, à medida em

que ocorreu a distensão do segmento, o líquido do frasco foi expulso, não exercendo pressão externa sobre a amostra.

A mangueira responsável pela infusão de ar, fixada na extremidade superior do segmento intestinal, foi ligada a um compressor de ar (Pratic Air, Schulz®). A taxa de infusão foi fixada em 600 ml/min por um fluxômetro acoplado ao compressor.

A pressão intraluminal foi aferida por um sensor eletrônico (MPX5700/D, Motorola®) ligado à extremidade inferior do segmento. O sensor de pressão, por sua vez, foi conectado a um microcontrolador independente (Arduino®) responsável por enviar as informações obtidas pelo sensor para um computador portátil, para que estas fossem armazenadas e processadas. O sistema completo utilizado no teste está demonstrado na figura 7.

Figura 7: Sistema completo responsável pelo teste biomecânico

Recipiente de vidro preenchido por solução de ringer lactato, fechado por tampa possuindo três orifícios. O primeiro ocupado pela mangueira branca foi a via de extravasamento de solução; o segundo ocupado pela mangueira verde, responsável pela infusão de ar; e a terceira, transparente, comunicando o segmento intestinal ao sensor de pressão (seta amarela). O sensor de pressão foi conectado com um microcontrolador (seta vermelha) responsável pela tradução dos valores de pressão do sensor para o computador pessoal, responsável pelo armazenamento dos dados. Fonte: MATHEUS, 2019

O momento da falha foi determinado quando da visualização de bolhas, da ruptura do intestino ou da queda de pressão registrada pelo sistema eletrônico. Os ensaios foram gravados para posterior análise. Após o teste, as peças foram examinadas e seu ponto de falha registrado. Para isto, o segmento intestinal foi virtualmente dividido em três partes no seu eixo longitudinal (superior, médio e inferior), e em dois segmentos no sentido transversal, sendo eles denominados mesentérico e antimesentérico. Esta divisão resultou na formação de seis regiões: mesentérico superior, médio e inferior, e antimesentérico superior, médio e inferior (figura 8).

Figura 8: Desenho esquemático da divisão do segmento intestinal

Esquema ilustrativo da divisão dos quadrantes para registro do ponto de ruptura do segmento intestinal.

Fonte: MATHEUS, 2019

6.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a obtenção dos dados, a análise estatística foi realizada com auxílio do software GraphPad prism 6.01. Os dados foram avaliados quanto à normalidade, utilizando os testes Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson omnibus. A avaliação biomecânica foi analisada utilizando-se medidas repetidas no tempo (ANOVA - análise de variância). Os resultados que apresentaram significância estatística foram submetidos ao teste de TUKEY. A significância estatística foi estabelecida com $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 FASE 1

7.1.1 Tempo zero

No momento da coleta, as amostras se encontravam no padrão esperado de normalidade com relação a odor, textura, consistência, coloração e espessura da parede. O exame histológico mostrou todas as camadas de aspecto normal, com exceção de discreta descamação do epitélio. As glândulas secretoras se apresentavam organizadas, com formato arredondado e lúmen bem definido. As camadas musculares circular interna e longitudinal externa revelavam-se unidas e alinhadas, bem como a camada serosa (figura 9).

Figura 9: Fotomicrografia de jejuno bovino, T0, animal três

7.1.2 Tempos duas e quatro horas

Nos tempos de duas e quatro horas após o óbito não foram observadas alterações macroscópicas. Os segmentos mantinham as características de odor, espessura, consistência e coloração do momento da coleta. À histologia também não foi possível identificar diferenças significativas na morfologia das estruturas. Todas as camadas apareciam justapostas, de espessura normal e organizadas (figuras de 10 e 11).

Figura 10: Fotomicrografia de jejuno bovino, T2, animal quatro

Figura 11: Fotomicrografia de jejuno bovino, T4, animal dois

A: Correta disposição de todas as camadas intestinais; B: Condição de normalidade das glândulas secretoras; C: Áreas de transição entre as camadas musculares circular interna e longitudinal externa e a camada serosa. Fonte: MATHEUS, 2019.

7.1.3 Tempo seis horas

Neste período as alças ainda mantinham suas características macroscópicas, porém, à microscopia já era possível a visualização da formação de vacúolos intracelulares na camada mucosa, principalmente envolvendo as glândulas. A camada submucosa se mantinha compacta. A camada muscular circular interna exibia discreta separação da submucosa, enquanto a muscular longitudinal externa e a camada serosa mantinham-se organizadas e coesas (figura 12).

Figura 12: Fotomicrografia de jejuno bovino, T6, animal três

7.1.4 Tempo oito horas

Passadas oito horas do óbito foi observado discreto amolecimento da camada mucosa, com o preenchimento do lúmen intestinal por material gelatinoso. As demais características de odor e coloração se mantinham inalteradas. Ao exame microscópico visualizaram-se descamação mais intensa do epitélio das vilosidades e a perda do lúmen de algumas glândulas da mucosa, enquanto a presença de vacúolos intracelulares nas mesmas se intensificou. A camada submucosa se apresentou espessada e discretamente afastada da muscular interna. Também foi observado distanciamento entre a camada muscular longitudinal externa e a camada serosa (figura 13).

Figura 13: Fotomicrografia de jejuno bovino, T8, animal dois

7.1.5 Tempo de 12 horas

Ao completar 12 horas em processo de degradação, as alças apresentavam consistência amolecida, com redução da espessura da parede e preenchimento do lúmen com grande quantidade de material gelatinoso. Histologicamente se notou perda expressiva do epitélio das vilosidades e deformação de grande parcela das glândulas secretoras que, em parte, não apresentavam mais lúmen, além da intensa formação de vacúolos. A camada submucosa se encontrava discretamente espessada. A camada muscular circular interna se mantinha organizada enquanto a longitudinal externa exibia espaçamento entre as fibras e feixes, além de discreto afastamento da camada serosa (figura 14).

Figura 14: Fotomicrografia de jejuno bovino, T12, animal dois

7.1.6 Tempo de 18 horas

Contadas 18 horas após o óbito dos animais doadores, os segmentos intestinais se apresentavam friáveis, com odor fétido e coloração discretamente esverdeada. Ao exame histológico a camada mucosa se mostrava degradada, com a maior parte das glândulas secretoras desorganizadas e sem lúmen, além de maior espaço entre as células e destacamento do epitélio. A camada submucosa encontrava-se menos condensada, espessada e afastada da circular interna. A camada muscular circular interna ainda aparentava integridade, já a longitudinal externa intensificou o padrão de afastamento das fibras anteriormente observado. A camada serosa também se mostrava desorganizada e moderadamente afastada da muscular longitudinal externa (figura 15).

Figura 15: Fotomicrografia de jejuno bovino, T18, animal um

7.1.7 Tempo de 24 horas

Ao tempo de 24 horas de deterioração, as amostras mantinham as características macroscópicas de degradação já citadas, redução da definição e flacidez das pregas da mucosa, e grande quantidade de material gelatinoso no lúmen. À histologia agravou-se a condição de rarefação do epitélio, com aumento do espaço intercelular. A submucosa se mostrava mais espessada, afastada da muscular interna e, em alguns pontos, degradada. Esta, por sua vez, apresentava evidente afastamento dos feixes musculares. As camadas muscular externa e serosa mantinham as características já descritas (figura 16).

Figura 16: Fotomicrografia de jejuno bovino, T24, animal quatro

7.1.8 Tempo de 36 horas

Após 36 horas as amostras mantinham as características macroscópicas de degeneração, com significativa redução da espessura da parede intestinal, tecido altamente friável, forte odor de putrefação e coloração esverdeada. À microscopia era possível perceber completa degradação das estruturas da camada mucosa, a manutenção da condição já descrita das camadas submucosa e musculares, e o início da desagregação da camada serosa, com sua separação da muscular externa (figura 17).

Figura 17: Fotomicrografia de jejuno bovino, T36, animal quatro

7.1.9 Tempo de 48 horas

Decorridas 48 horas do óbito, as peças demonstravam avançado estado de decomposição, com todas as características macroscópicas intensamente alteradas. Ao exame histológico, todas as camadas apresentavam alto grau de degeneração. Era clara a degradação das estruturas da mucosa, a descamação do epitélio, o afastamento das fibras musculares, a desestruturação da submucosa e descolamento da serosa (figura 18).

Figura 18: Fotomicrografia de jejuno bovino, T48, animal seis

7.2 FASE DOIS

7.2.1 Avaliação morfológica pós-descongelamento

Após o descongelamento, os segmentos intestinais demonstravam odor, textura e coloração normais, quando comparados com os espécimes frescos (figura 19). Entretanto, a consistência era amolecida e o lúmen encontrava-se preenchido por material gelatinoso. Ao retirar o fragmento para avaliação histológica foi possível perceber a perda de definição das pregas da mucosa, que apresentava consistência friável (figura 20). A espessura da parede intestinal de forma geral estava reduzida.

Figura 19: Avaliação macroscópica de segmento intestinal após descongelamento

Segmento intestinal após descongelamento, apresentando coloração e aspecto normais. Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 20: Fragmento intestinal preparado para fixação, após descongelamento

Fragmento intestinal fixo em placa de polietileno, imediatamente antes da imersão em formol, evidenciando o aspecto gelatinoso e a perda de definição das pregas da mucosa. Fonte: MATHEUS, 2019.

A avaliação histológica destas amostras revelou alterações que variaram de moderada a grande intensidade em todos os segmentos intestinais avaliados. Foram encontradas lesões estruturais em todas as camadas histológicas que compõem a parede intestinal.

A camada mucosa apresentou alterações compatíveis com processo de maceração, como descamação e liquefação do epitélio. Houve perda da definição do formato das glândulas secretoras, ou destruição de sua arquitetura. Também se observaram ruptura das células e perda do citoplasma (Figura 21).

Na submucosa foi observado intenso edema, demonstrado principalmente por espessamento da camada, desorganização e afastamento das fibras colágenas, com grandes áreas de imagem negativa, e descolamento das camadas adjacentes (Figura 22).

A camada muscular circular interna demonstrou ruptura, desalinhamento e desorganização das fibras musculares, espaçamento entre as fibras devido à ruptura celular e retração tecidual, e afastamento entre os feixes musculares. Também houve aumento da distância entre essas camadas e suas adjacentes (Figura 23).

O exame da camada muscular longitudinal externa revelou lesões bastante semelhantes às da muscular circular, não sendo possível visualizar desalinhamento das fibras devido ao eixo de corte transversal ao sentido das fibras (Figura 24).

A túnica serosa também se apresentou irregular, com esgarçamento das fibras colágenas que se encontraram desalinhadas e descondensadas. Observou-se em algumas amostras completo descolamento entre a serosa e muscular longitudinal (Figura 25).

Figura 21: Fotomicrografia de jejuno bovino, animal dois, após descongelamento

A: Imagem da camada mucosa evidenciando descamação epitelial (ponta de seta) e perda da definição do formato das glândulas secretoras (seta); B: Destruição da arquitetura das glândulas (ponta de seta) e células glandulares rompidas apresentando apenas o núcleo (seta). Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 22: Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 18, após descongelamento

A: Imagem da camada submucosa evidenciando afastamento entre as fibras colágenas (pontas de seta); B: Desorganização das fibras (setas) e descolamento em relação à camada muscular circular (ponta de seta). Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 23: Fotomicrografia de jejuno bovino, animal quatro, após descongelamento

A: Imagem da camada muscular circular evidenciando afastamento entre as fibras (setas) e dos feixes musculares (pontas de seta); B: Ruptura e desorganização das fibras musculares (setas). Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 24: Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 12, após descongelamento

A: Imagem da camada muscular longitudinal evidenciando afastamento entre os feixes musculares (setas); B: Afastamento das fibras (setas), dos feixes musculares (pontas de seta) e da camada serosa (ponta de seta vazada). Fonte: MATHEUS, 2019.

Figura 25: Fotomicrografia de jejuno bovino, animal 16, após descongelamento

A: Imagem da túnica serosa evidenciando irregularidade de superfície (setas) e descolamento em relação à camada muscular longitudinal (pontas de seta); B: Desorganização das fibras colágenas (setas). Fonte: MATHEUS, 2019.

7.2.2 Teste biomecânico

7.2.2.1 Pressão máxima

A pressão máxima foi determinada pelo valor mais alto registrado imediatamente antes de abrupta queda, provocada pela falha da parede intestinal. Foi observada uma redução estatisticamente significativa ($p = 0,0049$) entre a pressão máxima suportada no tempo seis ($242,17 \pm 29,81$ mmHg) e oito horas ($203,10 \pm 46,14$ mmHg). Entre os tempos oito ($203,10 \pm 46,14$ mmHg) e 12 horas ($238,43 \pm 31,04$ mmHg) houve um aumento significativo ($p = 0,0178$). A partir de 12 horas foi observada redução gradual na pressão máxima, porém, apenas a comparação entre os tempos oito ($203,10 \pm 46,14$ mmHg) e 18 horas ($235,20 \pm 38,21$) ($p = 0,0479$) apresentaram significância estatística. A variação dos valores médios da pressão máxima suportada em todos os tempos está representada no gráfico 1.

Gráfico 1: Variação da pressão X tempo *Post mortem*

*valor de $p < 0,05$; **valor de $p < 0,01$

A pressão máxima suportada pelas amostras testadas após descongelamento ($230,01 \pm 29,61$ mmHg) não apresentaram diferença estatística quando comparadas as amostras frescas, ou seja, o tempo zero ($224,18 \pm 38,69$ mmHg). Os valores de pressão máxima de todos os animais, em seus respectivos tempos, e amostras descongeladas, estão expressos na tabela 1.

Tabela 1: Valores individuais de pressão máxima

	0	4	6	8	12	18	24	36	48	Descongelado
Animal 1	256,58	244,91	256,58	233,25	244,91	279,90	268,24	244,91	256,58	244,91
Animal 2	221,59	279,90	256,58	209,93	268,24	244,91	268,24	268,24	244,91	244,91
Animal 3	233,25	268,24	291,56	163,28	268,24	268,24	233,25	256,58	244,91	198,26
Animal 4	163,28	198,26	221,59	163,28	233,25	221,59	198,26	268,24	256,58	174,94
Animal 5	268,24	233,25	279,90	209,93	186,60	256,58	268,24	256,58	244,91	256,58
Animal 6	244,91	221,59	242,17	128,29	186,60	221,59	233,25	221,59	233,25	221,59
Animal 7	268,24	233,25	221,59	174,94	221,59	221,59	209,93	186,60	186,60	198,26
Animal 8	256,58	268,24	186,60	151,61	209,93	186,60	151,61	209,93	174,94	198,26
Animal 9	233,25	256,58	244,91	203,70	268,24	209,93	163,28	221,59	198,26	209,93
Animal 10	198,26	209,93	279,90	268,24	244,91	268,24	233,25	233,25	256,58	221,59
Animal 11 [†]	291,56	291,56	326,55	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Animal 12	268,24	174,94	279,90	279,90	303,23	291,56	244,91	268,24	268,24	268,24
Animal 13	151,61	198,26	221,59	221,59	209,93	198,26	198,26	198,26	198,26	233,25
Animal 14	256,58	244,91	221,59	268,24	279,90	314,89	314,89	303,23	244,91	291,56
Animal 15	209,93	221,59	221,59	233,25	233,25	186,60	233,25	198,26	233,25	221,59
Animal 16	233,25	163,28	209,93	163,28	233,25	209,93	186,60	163,28	244,91	221,59
Animal 17	198,26	256,58	209,93	139,95	244,91	244,9	186,60	128,29	198,26	268,24
Animal 18	221,59	209,93	244,91	198,26	221,59	186,60	244,91	221,59	221,59	244,91
Animal 19	221,59	221,59	268,24	244,91	233,25	221,59	256,58	221,59	198,26	221,59
Animal 20 [†]	326,55	268,24	258,04	116,63	326,56	256,58	349,88	221,59	198,26	258,04
Média	224,18	228,07	242,17**	203,10**	238,43*	235,20*	227,42	226,13	227,42	230,01
Desvio padrão	± 38,69	± 32,31	± 29,81	± 46,14	± 31,04	± 38,21	± 41,62	± 42,36	± 28,07	± 29,61

*valor de $p < 0,05$; **valor de $p < 0,01$ / [†]Animais excluídos da análise estatística / NR: teste não realizado

Dois animais foram excluídos e, portanto, seus resultados não fizeram parte do cálculo das médias e nem da análise estatística. Durante o processamento das amostras do animal 11 ocorreu um problema no sistema do teste biomecânico. Até que o problema foi detectado e corrigido, o tempo de oito horas *post mortem* havia sido excedido, e por esta razão a amostra não poderia mais ser analisada. Além disso, até a resolução do problema no sistema, várias tentativas de teste foram executadas, não deixando material suficiente para execução de todos os testes, até o tempo 48 horas. Já o animal número 20, apresentou resultados muito discrepantes com o restante da população estudada, sendo considerado pelo software estatístico como um ponto fora da curva e, portanto, precisou ser excluído.

7.2.2.2 Curva de pressão

O registro em tempo real do valor de pressão durante os testes permitiu a produção de gráficos, representando o comportamento da pressão em todos os ensaios. Estão dispostos a seguir os gráficos correspondentes aos ensaios dos tempos zero, oito, 18 e 48 horas de todos os animais (gráficos 2 a 72), de forma a possibilitar avaliação da mudança de comportamento das amostras ao longo do tempo. O grande número de medições realizada pelo sistema de aquisição de dados dificultava a clara interpretação dos gráficos. Visando melhorar o aspecto e facilitar a interpretação das curvas, foi aplicada uma linha de tendência, na qual cada ponto do gráfico corresponde ao valor médio de 10 medições. O resultado obtido é o exposto nos gráficos a seguir.

Gráfico 2: Animal um, T0 **Gráfico 3: Animal um, T8** **Gráfico 4: Animal um, T18** **Gráfico 5: Animal um, T48** **Gráfico 6: Animal dois, T0** **Gráfico 7: Animal dois, T8** **Gráfico 8: Animal dois, T18** **Gráfico 9: Animal dois, T48**

Gráfico 10: Animal três, tempo zero **Gráfico 11: Animal três, tempo oito** **Gráfico 12: Animal três, tempo 18** **Gráfico 13: Animal três, tempo 48** **Gráfico 14: Animal quatro, T0** **Gráfico 15: Animal quatro, T8** **Gráfico 16: Animal quatro, T18** **Gráfico 17: Animal quatro, T48**

Gráfico 18: Animal cinco, T0 **Gráfico 19: Animal cinco, T8** **Gráfico 20: Animal cinco, T18** **Gráfico 21: Animal cinco, T48** **Gráfico 22: Animal seis, T0** **Gráfico 23: Animal seis, T8** **Gráfico 24: Animal seis, T18** **Gráfico 25: Animal seis, T48**

Gráfico 26: Animal sete, T0 **Gráfico 27: Animal sete, T8** **Gráfico 28: Animal sete, T18** **Gráfico 29: Animal sete, T48** **Gráfico 30: Animal oito, T0** **Gráfico 31: Animal oito, T8** **Gráfico 32: Animal oito, T18** **Gráfico 33: Animal oito, T48**

Gráfico 34: Animal nove, T0 **Gráfico 35: Animal nove, T18** **Gráfico 36: Animal nove, T48** **Gráfico 37: Animal dez, T0** **Gráfico 38: Animal dez, T8** **Gráfico 39: Animal dez, T18** **Gráfico 40: Animal dez, T48**

Gráfico 41: Animal 12, T0 **Gráfico 42: Animal 12, T8** **Gráfico 43: Animal 12, T18** **Gráfico 44: Animal 12, T48** **Gráfico 45: Animal 13, T0** **Gráfico 46: Animal 13, T8** **Gráfico 47: Animal 13, T18** **Gráfico 48: Animal 13, T48**

Gráfico 49: Animal 14, T0 **Gráfico 50: Animal 14, T8** **Gráfico 51: Animal 14, T18** **Gráfico 52: Animal 14, T48** **Gráfico 53: Animal 15, T0** **Gráfico 54: Animal 15, T8** **Gráfico 55: Animal 15, T18** **Gráfico 56: Animal 15, T48**

Gráfico 57: Animal 16, T0 **Gráfico 58: Animal 16, T8** **Gráfico 59: Animal 16, T18** **Gráfico 60: Animal 16, T48** **Gráfico 61: Animal 17, T0** **Gráfico 62: Animal 17, T8** **Gráfico 63: Animal 17, T18** **Gráfico 64: Animal 17, T48**

Gráfico 65: Animal 18, T0 **Gráfico 66: Animal 18, T8** **Gráfico 67: Animal 18, T18** **Gráfico 68: Animal 18, T48** **Gráfico 69: Animal 19, T0** **Gráfico 70: Animal 19, T8** **Gráfico 71: Animal 19, T18** **Gráfico 72: Animal 19, T48**

7.2.2.3 Local da falha

Quando considerado o sentido longitudinal, a ruptura ocorreu de forma muito mais frequente no segmento mesentérico (178 vezes) do que no antimesentérico (2 vezes). Quanto ao sentido longitudinal, o segmento superior (este é o termo no material e método) foi a principal sede de falha, seguindo pelo médio e deixando por último o segmento inferior. Grandes rupturas, envolvendo mais de um segmento, também foram comuns. A frequência de ruptura de cada um dos segmentos está discriminada na tabela 2.

A partir desses dados se buscou uma correlação entre o tempo *post mortem* e o tamanho da falha, ou seja, a quantidade de segmentos envolvidos. Foi observado um aumento na ocorrência da falha envolvendo dois segmentos entre o tempo zero e seis horas, seguido de uma queda deste índice entre os tempos seis e oito. Após o tempo oito, o índice de rupturas envolvendo mais de um segmento voltou a aumentar gradativamente. Os índices de ruptura envolvendo um ou mais segmentos está expresso no gráfico 73.

Tabela 2: Ocorrência de falha intestinal

Local da falha	Número de ocorrências
Superior	66
Médio	46
Inferior	27
Superior e médio	28
Médio e inferior	10
Superior, médio e inferior	3
Total	180

Gráfico 73: Índices de ruptura X tempo *post mortem*

8 DISCUSSÃO

8.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Quando se tem como objetivo realizar avaliação morfológica e biomecânica intestinal, alguns fatores devem ser considerados na obtenção e processamento de amostras. A depender da origem destas peças, tem-se baixo grau de padronização, o que pode trazer inúmeras variáveis às características estudadas. A obtenção de peças oriundas de rotina hospitalar dificulta a padronização, por exemplo, de idade (ZHAO E GREGERSEN, 2015; CHANTEREAU et al., 2014), doença pré-existente (LOEHRY; CREAMER, 1966) e dieta (NAKAJIMA et al., 2008, LIU et al., 2016; LIU et al., 2017), que conhecidamente provocam alteração das características intestinais.

Devido às condições logísticas, animais provenientes de rotina clínica podem ser necropsiados várias horas após o óbito permitindo que a degradação intestinal ocorra rapidamente pela proliferação bacteriana. Esta demora na evisceração e lavagem das peças certamente é deletéria às características a serem estudadas e também provocam desuniformidade dos espécimes. A imediata evisceração do doador e lavagem do segmento intestinal também é fundamental para manutenção das características histológicas, como foi descrito por Fuller e colaboradores (2013). Por esta razão, é importante o acesso imediato aos espécimes, garantindo a manutenção das características a serem estudadas.

Nelson e associados (2014) se utilizaram de animais eutanasiados por causas não relacionadas ao trato digestório para avaliação biomecânica de enteroanastomoses, porém, já foi relatado há muito tempo que a ausência de sinais ligados a este sistema não é garantia da ausência de alterações morfológicas intestinais (VARIEND; SUNDERLAND, 1984). Desta forma, a presença de doenças envolvendo outros sistemas pode alterar as propriedades intestinais, e consequentemente, fornecer resultados pouco fidedignos na avaliação morfológica e biomecânica.

Considerando estes fatores, se torna fortemente recomendada a utilização de espécimes oriundos de abatedouros, pois estes apresentam bom grau de padronização com relação a idade e dieta; são, a princípio, livres de doenças e têm sua evisceração realizada em poucos minutos após o óbito, facilitando sua coleta e lavagem em tempo bastante reduzido e diminuindo os efeitos deletérios da microbiota sobre o tecido.

A realização deste estudo teve como principal motivação o embasamento científico de estudos biomecânicos realizados com peças a fresco, mesmo que decorrido longo período após o óbito. Diversos estudos se utilizaram da refrigeração para aumentar a durabilidade das amostras com variadas finalidades (STEMPER et al., 2007, SOKOLIS, 2017; BRACAMONTE et al., 2018). Massalou e colaboradores (2016) obtiveram amostras de cólon de humanos a partir de cadáveres mantidos a 1°C por um período médio de 21 dias (com desvio padrão de 9 dias), para utilização em ensaios biomecânicos. No presente estudo, buscou-se mimetizar situações onde há dificuldades logísticas, como a grande distância entre o local de coleta das peças e as instalações onde se aplicam os testes. Por esta razão, optou-se pelo resfriamento inicial das peças, com gelo picado, e posterior manutenção das amostras em temperatura ambiente. Este método é bastante prático e de baixo custo, e pode facilmente ser aplicado a amostras submetidas a um longo tempo de transporte, sem a necessidade de equipamentos de refrigeração.

8.2 TESTE BIOMECÂNICO

A maior parte dos estudos que avaliaram as características biomecânicas de tecidos moles, o fazem utilizando testes de tensão uni (WALSH et al., 2014; MASSALOU et al., 2016) ou biaxiais (KHOIY et al, 2018) e testes passivos (SOKOLIS, 2017). Entretanto, já foi comprovado que a parede intestinal possui característica anisotrópica (FUNG, 1993), ou seja, tem comportamento diferente quando tracionada em seu sentido circular ou longitudinal. Desta maneira julgou-se mais adequada aplicação do teste de distensão, por sua capacidade de produzir tensão em várias direções simultaneamente. Além disso, este trabalho busca, em última instância, embasar estudos biomecânicos que possam ser aplicados na avaliação da resistência das técnicas de sutura intestinal. Estas pesquisas, por sua vez, têm por objetivo reproduzir em seus ensaios os desafios aos quais as alças intestinais seriam submetidas *in vivo* e, neste caso, o teste de distensão é o mais aplicado (EGGLESTON et al., 2004; GANDINI, 2006; RISSELADA et al., 2015).

Este modelo fornece informações sobre a pressão máxima suportada, curva de aumento de pressão e até padrão da falha, mas não é capaz de produzir dados a respeito das características de rigidez tecidual e das forças intrínsecas da parede intestinal, como é possível nos métodos citados anteriormente. Novamente, buscou-se neste estudo reproduzir o método mais utilizado nas pesquisas envolvendo sutura

intestinal, isto é, um teste com elevação da pressão até o momento de falha que, neste caso, se caracterizava pela ruptura da parede intestinal. Outro aspecto significativo foi o uso de um sensor eletrônico para a aferição da pressão intraluminal. Esta tecnologia já havia sido utilizado por outros autores (BRACAMONTE et al., 2014; NIETO; DECHANT; SNYDER, 2006) e apresenta algumas vantagens em relação ao uso de manômetros de mercúrio (AULETTA et al., 2011; GANDINI, 2006, 2010), ou até mesmo manômetros eletrônicos (ROSSER et al., 2012). A principal delas é a possibilidade do registro, em tempo real, do aumento da pressão e não apenas o registro da pressão máxima. Desta maneira pode-se avaliar o comportamento das amostras durante todo o teste, o que permite uma avaliação muito mais detalhada.

8.3 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS E HISTOLÓGICAS

Nos tempos iniciais (duas, quatro e seis horas) não foi possível notar nenhuma alteração no aspecto macroscópico, o que se confirmava pela boa condição estrutural dos tecidos ao exame histológico. Porém, ao tempo oito horas, notava-se apenas o amolecimento da camada mucosa, sem demais alterações macroscópicas, enquanto a histologia revelou alterações estruturais na camada submucosa e muscular que representaram prejuízo biomecânico, como será discutido na sessão a seguir.

A partir do tempo 12 horas já foi possível perceber alterações de consistência e na espessura da parede intestinal como reflexo da degradação tecidual que se agravava ao nível histológico. Nos tempos subsequentes (18, 24, 36 e 48 horas) as amostras se apresentavam claramente degradadas, no entanto, era difícil elencar alterações macroscopicamente marcantes que as diferenciasses. Entretanto, ao exame histológico, o agravamento das lesões era evidente, tornando simples a diferenciação visual entre cada um dos tempos.

Mostrou-se que o aspecto macroscópico, a princípio considerado pouco sensível, pode e deve ser levado em consideração na avaliação da viabilidade tecidual, principalmente nas primeiras horas *post mortem*.

8.4 RELAÇÃO ENTRE HISTOLOGIA E PRESSÃO MÁXIMA

Como esperado, não foram encontradas alterações histológicas importantes nos tempos de zero, duas e quatro horas, bem como não houve diferença estatística nos valores de pressão máxima suportada neste mesmo período. Por esta razão é possível assumir como fidedignos os resultados de ensaios biomecânicos de

amostras testadas no período de quatro horas (SHERLOCK et al., 2011; LEE et al., 2012; GANDINI, IOTTI, GIUSTO, 2013), ou menos (BRACAMONTE et al., 2014) após o óbito de animais doadores.

A ausência de diferença estatística na pressão suportada pelas amostras testadas seis horas após o óbito, apesar da presença de discretas alterações na camada mucosa, estão em consonância com os dados obtidos por Chen e colaboradores (2008). Seu estudo revelou que a ausência das vilosidades da mucosa não representou diferença significativa sobre o comportamento do segmento quando submetido ao teste de distensão. Logo, pode-se dizer que a integridade, ou até mesmo a presença dos vilos, não influencia o desempenho biomecânico intestinal.

Decorridas oito horas do óbito, o exame histológico revelou não só o agravamento da degradação mucosa, como também o espessamento da camada submucosa e o afastamento entre esta e a camada muscular interna. Tendo em vista que a submucosa é a principal responsável pela resistência mecânica da parede intestinal (EGOROV et al., 2002; GANDINI, 2010), a desorganização de suas fibras colágenas pode ter sido responsável pela queda dos valores de pressão máxima suportada neste período.

Outra hipótese associada à redução na pressão suportada, ocorrida no tempo oito horas, foi a possível ocorrência de *rigor mortis*. Esta alteração *post mortem* ocorre pela depleção de glicogênio e ATP (necessários para o relaxamento muscular) tornando a contração muscular irreversível (MYERS; McGAVIN, 2009) o que pode ter provocado aumento da rigidez da parede intestinal. Seu início se dá entre duas a quatro horas após a morte e se desenvolve por completo entre seis a 12 horas. Já foi demonstrado, que existe uma correlação inversamente proporcional entre o grau de rigidez da parede intestinal e a capacidade de estiramento do tecido (SOKOLIS, 2017). Portanto, este enrijecimento pode ter prejudicado capacidade de deformação elástica e resultado em menor capacidade de distensão, com consequente menor resistência.

Já no período de 12 horas notou-se aumento significativo da pressão suportada, enquanto o exame histológico revelou intensificação da degradação tecidual. Pode-se atribuir a esse resultado o fato de o *rigor mortis* se dissipar gradualmente com a ocorrência da autólise, à medida que as proteínas musculares sofrem desnaturação e as fibras perdem sua capacidade de contração (VLEET, 2000). A partir desta informação, e tendo visto que este período foi marcado pelos primeiros

sinais de degradação da camada muscular, é possível sugerir que a variação na pressão máxima se deve novamente à evolução do processo de *rigor mortis*.

Não foram encontrados estudos investigando a ocorrência, o efeito ou até mesmo a duração do rigor mortis na musculatura lisa. Entretanto, considerando que as bases fisiológicas para a contração muscular são semelhantes à musculatura estriada, é plausível inferir que este fenômeno de fato aconteça e provoque alterações na rigidez da parede intestinal e, por consequência, em sua resistência biomecânica.

No tempo 18 horas foi constatada intensificação das alterações encontradas no período anterior, ou seja, maior degradação da camada muscular. Esta desorganização das fibras foi novamente acompanhada por aumento na resistência mecânica. O fato desse aumento ser significativo quando comparado ao tempo oito, porém não estatístico em relação ao tempo 12, indica que se tratava de um processo de rearranjo tecidual progressivo, em fase final. Quando associado à musculatura esquelética, o *rigor mortis* pode persistir por 24 a 48 horas, porém, sua duração é influenciada por fatores como a depleção de glicogênio, a quantidade de massa muscular e a velocidade da autólise (MYERS; McGAVIN, 2009).

A partir deste ponto, até o fim do período avaliado (48 horas), foi observada uma redução gradual, sem relevância estatística, nos valores de pressão máxima suportada, embora a perda das características histológicas tenha sido muito importante. Acredita-se que a desorganização do tecido tenha sido responsável pela flacidez, observada na macroscopia, e por consequência, aumentado a capacidade de distensão das amostras, o que se refletiu no aumento da pressão suportada.

8.5 CURVA DE PRESSÃO

A produção de gráficos, a partir dos valores de pressão capturados pelo sistema eletrônico, ajuda a entender o comportamento das amostras durante o teste de distensão e ajuda o melhor entendimento dos resultados de pressão máxima suportada.

Antes de abordar o comportamento dos segmentos intestinais durante o ensaio é importante citar que foram realizados cortes nos valores iniciais de cada teste, por duas razões. Em primeiro lugar, o princípio da aferição da pressão (comandado pelo computador, por um clique) não era perfeitamente sincronizado com o início da infusão de ar (pelo acionamento manual de uma válvula do compressor). Desta forma, um atraso de poucos segundos no acionamento da válvula, após o início da aferição,

já resultava em um número muito grande de medições com resultado zero, que alteraria a apresentação do gráfico sem trazer nenhuma informação. Outra razão para este corte foi a grande variação da pressão no momento de acomodação do sistema, que também aumentaria muito o número de medições, e conseqüentemente, o comprimento do eixo horizontal do gráfico, sem trazer nenhum esclarecimento. Por estes motivos, foram excluídos dos gráficos todos os valores abaixo de 23 mmHg. A falha intestinal ocorreu em praticamente todos os casos como um pico de pressão, seguido imediatamente por uma queda abrupta. Levando isto em consideração, e também no sentido de otimizar a apresentação dos dados e ocultar aferições posteriores à ruptura que não trariam informações, foram eliminados todos os valores de pressão abaixo de 128 mmHg, considerando que esta foi a pressão de ruptura da amostra que suportou a menor pressão entre todos os testes.

De maneira geral, nos tempos zero e oito foi possível observar um período curto de acomodação do sistema, com um pequeno platô ou uma elevação sutil entre 25 e 50 mmHg. Logo se iniciava elevação mais rápida e constante da pressão até sua queda abrupta, quando da ruptura do segmento.

Uma exceção a esse padrão ocorreu com o animal 12, no tempo oito horas. A revisão da gravação do teste permitiu perceber que o segmento intestinal foi mal posicionado no interior do recipiente de vidro e, desta forma, ao iniciar sua distensão, a amostra foi pressionada contra a parede do frasco, tendo sua dilatação prejudicada. Diante desta dificuldade de distensão, o valor da pressão subiu abruptamente, seguido de um platô onde sofreu a ruptura e queda progressiva da pressão em decorrência do escape do ar.

Outra anomalia encontrada se deu com o animal oito, no tempo zero. Neste caso, durante a fase de aumento da pressão ocorreu uma ligeira queda, seguida de novo aumento que prosseguiu até o momento da ruptura. Na recuperação das imagens foi observado que o segmento era mais comprido do que os demais, e durante sua distensão sofreu uma dobra, que ao se desfazer, ocasionou a reacomodação do sistema e a queda no valor de pressão observada no gráfico.

Houve também um problema técnico no armazenamento dos dados do teste do animal nove, tempo oito horas, não havendo, portanto, registro da pressão. A fim de evitar o descarte de todos os dados deste animal, foi atribuído a este teste o valor de pressão máxima equivalente à média das pressões dos animais restantes.

Nos tempos 18 e 48 horas foi observado um padrão diferente de aumento da pressão. Nestes períodos, notou-se uma fase de acomodação muito mais longa, formado por longos platôs, em sua maioria situados entre 50 e 75 mmHg. Em seguida ocorreu um aumento mais rápido do que o observado nos tempos iniciais, seguido da ruptura e abrupta queda.

A partir desta análise é possível afirmar que, nos períodos iniciais, a parede intestinal mais firme e resistente permitiu que a distensão se desse de forma lenta e gradual até o momento da ruptura. Já nos tempos mais avançados a flacidez e desestruturação da parede não ofereceu resistência à distensão. Desta forma, o rápido aumento do volume interno do segmento mantinha a pressão constante até o limite de estiramento do tecido. Alcançado este limite, a pressão subiu rapidamente provocando a ruptura.

Não foram encontrados estudos que tenham analisado a curva de aumento de pressão em testes de distensão, não sendo possível confrontar estes achados. De qualquer forma, é curioso que apesar da diferença significativa entre os valores de pressão máxima, o comportamento do tecido durante a curva de aumento da pressão foi bastante semelhante. Certamente a explicação para este fato se dá pela modificação das características elásticas da parede intestinal, que não puderam ser avaliadas por conta do modelo experimental escolhido.

8.6 CARACTERÍSTICAS DA FALHA

Com relação ao local da falha intestinal, foi observada uma enorme predominância de rupturas na face mesentérica. Khoiy e colaboradores (2017), estudando as características biomecânicas do mesentério de suínos, relataram que a região distal do mesentério, ou seja, a porção mais próxima da sua inserção à parede intestinal, é a mais rígida e menos extensível, e por consequência mais suscetível ao esgarçamento quando submetido à tensão. Foi descrito ainda o aumento da rigidez tecidual em áreas de maior tensão, o que facilita o colapso. Visto isso, acredita-se que a forte ligação do mesentério com a parede da alça intestinal, observada na espécie bovina, associada à alta rigidez do mesentério em sua porção distal, tenha influenciado as rupturas a ocorrerem, quase que em sua totalidade, na face mesentérica. A baixa flexibilidade do tecido mesentérico impediu que o ponto de inserção do mesentério aumentasse de comprimento em função da distensão,

diferentemente do que ocorreu na face antimesentérica. Esta incapacidade de acomodação da parede ao aumento da pressão luminal provavelmente foi decisiva para o índice, quase absoluto, de falhas na face mesentérica.

No sentido longitudinal, considerando a ruptura envolvendo apenas um segmento, a região de maior ocorrência de rupturas foi a superior, bem como quando envolvendo mais de um segmento, a maior frequência de ruptura acometeu as porções superior e média. Por conta da não fixação do segmento intestinal em relação ao recipiente de vidro, durante a distensão, frequentemente ocorriam dobras na amostra que podem ter influenciado a distribuição desuniforme ao longo do segmento. Além disso, é possível que o fato da mangueira responsável pela infusão de ar estar fixada à extremidade superior do segmento pode ter gerado uma maior pressão nessa região.

Os estudos que realizaram distensão até o ponto de falha crítica, avaliando diferentes técnicas de sutura, tiveram a falha situada exatamente no local da sutura, por ser este o ponto mais frágil do sistema (GANDINI, 2006; BRACAMONTE et al., 2012; RISSELADA et al., 2015). Neste trabalho não foi produzido nenhum ponto de fraqueza nas amostras, fazendo com que o ponto de falha fosse caracterizado pela região de menor tolerância à distensão, que pode ser interpretado como o ponto mais rígido

8.6.1 Número de segmentos envolvidos nas rupturas

Baseado no conceito de que o aumento da rigidez da parede está ligado à menor capacidade da parede se adaptar à distensão, se pode inferir que esta redução na flexibilidade provavelmente é capaz de aumentar a ocorrência de rupturas maiores. Por esta razão se buscou traçar um paralelo entre a pressão máxima suportada e o número de segmentos envolvidos nas rupturas.

Nos tempos iniciais, até seis horas, houve aumento constante na taxa de rupturas envolvendo dois ou três segmentos, o que corrobora com a ideia de que a eventual ocorrência do *rigor mortis* resultou em enrijecimento da parede intestinal, e por consequência, aumentou o índice de grandes falhas.

Já no tempo oito horas, apesar de se acreditar ter atingido o ponto máximo de rigidez tecidual e, com isso, redução capacidade de distensão, houve também o aparecimento de alterações histológicas na camada submucosa, o que certamente reduziu a resistência da parede intestinal. Desta maneira, apesar da alta rigidez

tecidual, a fragilidade da submucosa predispôs a ocorrência de pequenas falhas, com menores valores de pressão máxima.

A partir do tempo 12 horas, houve novo aumento do índice de grandes rupturas, muito sutil em relação ao período inicial. Devido ao elevado nível de degradação tecidual documentado nesta fase, a parede intestinal se tornou complacente, justificando inclusive os altos valores de pressão máxima nestes momentos. Em contrapartida, isso possivelmente resultou em mais estiramento do tecido, provocando rupturas maiores.

8.7 AMOSTRAS DESCONGELADAS

A opção por conservar as peças por congelamento em freezer doméstico se deu pela praticidade e baixo custo da técnica, visando viabilizar a reprodução deste modelo experimental em futuros estudos de biomecânica intestinal. A imersão das alças em solução de ringer lactato foi aplicada na tentativa de reduzir os danos teciduais por desidratação, que pode levar à ruptura celular (FULLER et al., 2004).

Por se tratar de um tecido abundante em água e com alta celularidade, era esperado que houvesse um elevado grau de lesão ao nível histológico, principalmente pela formação de cristais de gelo (GAGE e BAUST, 1998). Porém, até onde se sabe, o congelamento ainda não havia sido testado como método de conservação intestinal para utilização em teste biomecânicos, e os resultados positivos obtidos em outros tecidos (STEMPER et al., 2006; Wex et al., 2004) encorajou sua aplicação neste estudo.

Apesar das alterações teciduais encontradas tanto no exame macroscópico como na avaliação histológica, o resultado de pressão máxima não apresentou diferença estatística em relação às amostras do tempo zero. Isto confirmou a expectativa de que os processos de congelamento e descongelamento, dentro do método proposto, não alteraram a resistência biomecânica, pelo menos com relação a pressão máxima suportada.

Já foram aplicados protocolos com uso de crioprotetores e congelamento em vapor de nitrogênio para conservação de outros órgãos (FAHY et al., 2009; BROCKBANK et al., 2015). Este tipo de técnica exige equipamentos específicos, e até certo ponto, oferece riscos de utilização, o que limita sua aplicação por conta dos custos gerados e da necessidade de capacitação prévia. Além disso, o volume

ocupado pelas amostras envolvendo o intestino de grandes animais é outro fator limitante para utilização destes métodos.

8.8 APLICABILIDADE

Este estudo teve como motivação compreender melhor a degradação intestinal de animais sadios visando a execução de ensaios biomecânicos com amostras frescas em maior período *post mortem*. Outro ponto importante foi determinar se as amostras podem ou não ser congeladas com este mesmo intuito. Visto isso, seguem algumas considerações sobre a aplicabilidade dos achados deste estudo para o desenvolvimento de novas pesquisas.

Os resultados dos ensaios mecânicos permitem afirmar que a durabilidade intestinal é maior do que o tempo de uso relatado na totalidade dos estudos consultados, considerando as características macroscópicas, histológicas e biomecânicas. Ainda que tenha havido uma queda significativa no valor de pressão máxima no tempo oito horas, o valor suportado foi muito superior àqueles relatados em condições fisiológicas ou até mesmo patológicas (SHIKATA et al., 1983; ALLEN et al., 1986; MACHARG et al., 1986). Desta forma, mesmo no momento de menor resistência (considerando a pressão máxima), as amostras seriam capazes de mimetizar o comportamento mecânico *in vivo*. Ainda, considerando trabalhos que avaliaram diferentes técnicas de sutura intestinal (AULETTA et al., 2011; GANDINI et al., 2013; NELSON et al., 2014), a falha da sutura ocorreu em valores de pressão inferiores ao suportado pelas amostras no tempo oito horas. Portanto, mesmo na pior condição de pressão máxima, esta não seria fator limitante para avaliação do tema estudado.

Entretanto, a execução de ensaios envolvendo suturas intestinais não depende apenas da capacidade mecânica da alça em suportar pressão de distensão. É também necessária integridade da parede para que se possa executar de forma correta as técnicas avaliadas e condições mínimas de preservação tecidual para garantir suporte mecânico. É possível afirmar, frente aos resultados obtidos, que este tipo de experimento deve ser feito dentro de um período inferior a oito horas *post mortem*. Foi neste período que o exame macroscópico mostrou as primeiras alterações na camada mucosa, e o exame histológico evidenciou o início da degradação da camada submucosa. A integridade desta é indispensável para a força mecânica das suturas (BRACAMONTE et al., 2014).

Da mesma forma, os processos de congelamento e descongelamento também não representaram perda significativa do valor de pressão suportada, o que sob esse aspecto, valida o uso deste método para a utilização em testes biomecânicos. No entanto, é necessário avaliar até que ponto seus efeitos deletérios sobre o ponto de vista macroscópico e histológico pode ser prejudicial à qualidade da aplicação e ao desempenho de suturais intestinais.

Várias outras técnicas de conservação ainda não tiveram sua eficácia testada na manutenção das características estruturais e biomecânicas do intestino. Neste sentido, há uma série de protocolos de conservação a serem aplicados até que se chegue a uma técnica ideal.

Por fim, existe um longo caminho a ser percorrido para entender mais a fundo as características do intestino delgado bovino. De qualquer maneira, este estudo forneceu informações básicas importantes, e abre caminho para a realização de diversos outros, sejam eles sobre aspectos morfológicos e biomecânicos, ou até mesmo aplicados à rotina clínico-cirúrgica.

9 CONCLUSÃO

As primeiras alterações histológicas surgiram decorridas seis horas do óbito dos doadores. Ao tempo de oito horas se deu início às alterações estruturais. A partir de então o grau de degradação se intensificou fortemente a cada período estudado.

O início das lesões macroscópicas se deu de forma simultânea ao aparecimento das alterações estruturais ao nível histológico. A partir de 12 horas foi difícil apontar diferenças marcantes quanto ao aspecto macroscópico, enquanto o agravamento gradual das características histológicas foi evidente.

A resistência biomecânica do jejuno bovino a fresco se mostrou muito superior àquelas descritas como fisiológicas ou patológicas.

O tempo de oito horas também foi caracterizado por importante perda de resistência mecânica, devida principalmente à desorganização da camada submucosa. Posteriormente, a resistência voltou a aumentar devido ao rearranjo tecidual.

O processo de congelamento e descongelamento gerou intensas alterações macroscópicas e histológicas, entretanto, não foi observada perda significativa da resistência biomecânica a partir do método utilizado.

REFERÊNCIAS

ALLEN, D.A., WHITE, N.A., TYLER, D.E. Factors for prognostic use in equine obstructive small intestinal disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Illinois, v. 189, n. 7, p. 777-780, outubro, 1986.

ALVARENGA, J. **Substituição de segmento de colédoco de cão por preparado de pericárdio homólogo conservado em glicerina**. São Paulo, SP. 1977. 108 p. Tese (Livre Docência) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de 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, FUNESP-UNESP, 1992. Cap.2. p.33-42.

AULETTA, L., LAMAGNA, F., UCCELLO, V., LAMAGNA, B., PASOLINI, M.P. *In vitro* comparison of three suture techniques for anastomosis of the equine small intestine. **Equine Veterinary Journal**, Cingapura, v. 43, n. 40, p. 46–50, novembro, 2011.

BATISTA, L.C., DALECK, C.R., SHIMANO, A.C., ALESSI, A.C., ABRAHÃO, M.S. Comparative study of resistance to tension of the peritoneus (equine, swine, bovine, and canine) fresh and conserved in glicerol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 305–312, janeiro, 1996.

BRACAMONTE, J. L., ANDERSON, S. L., HENDRICK, S., BARBER, S. M., DEUTSCHER, D., SUMNER, D. *Ex vivo* comparison of the biomechanical properties of hand-sewn and stapled jejunoileal anastomoses in horses. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 43, n. 4, p. 451–458, maio, 2014.

BRACAMONTE, J. L., DEVICK, I., THOMAS, K. L., HENDRICK, S. Comparison of hand-sewn and oversewn stapled jejunojejunal anastomoses in horses. **The Canadian Veterinary Journal**, Toronto, v. 59, n. 1, p. 67-73, janeiro, 2018

BROCKBANK, K. G., CHEN, Z., GREENE, E. D., CAMPBELL, L. H. Vitrification of heart valve tissues. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1257, p. 399-421, janeiro, 2015.

BURIN, E. L. K., LEE, H. D., NIZ, M. A. K., SHIKI, S. B., COY, C. S. R., FAGUNDES, J. J., MACHADO, R. B., WU, F. C. Avaliação da dispersão de curvas força x alongação de segmentos de cólon descendente de ratos por meio do modelo sigmoidal de Boltzmann. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, março, 2009.

CARVALHO K.S. **Influência do formol utilizado para conservação de cadáveres na obtenção de DNA nuclear em tecido muscular**. 66p. Dissertação de Mestrado em Odontologia Legal e Deontologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, SP. 17 de fevereiro de 2009.

CHANTEREAU, P., BRIEU, M., KAMMAL, M., FARTHMANN, J., GABRIEL, B., COSSON, M. Mechanical properties of pelvic soft tissue of Young women and impact of aging. **International Urogynecology Journal**, Nova Iorque, v. 25, n. 11, p.1547–1553, novembro, 2014

CHEN, X., ZHAO, J., GREGERSEN, H. The villi contribute to the mechanics in the guinea pig small intestine. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 41, n.4, p. 806-812, abril, 2008.

LOEHRY C. A., CREAMER, C. A. Post mortem study of small intestine mucosa . **British Medical Journal**, Londres, v. 1, p. 827–829, junho, 1966.

CROSS, R. F.; KOHLER, E. M. Autolytic changes in the digestive system of germfree, *Escherichia coli* monocontaminated and conventional baby pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v. 33, n. 2, p. 108–112, abril, 1969.

CURY, F. S.; CENSONI, J. B.; AMBRÓSIO, C. E. Técnicas Anatômicas no ensino da prática de anatomia animal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, p. 688–696, maio, 2013.

DRUGDEX. **Ficha informacional do produto químico** – Glutaraldeído. 2007.

EGGLESTON, R. B., MUELLER, P. E., PARVIAINEN, A. K., GROOVER, E. S. Effect of carboxymethylcellulose and hyaluronate solutions on jejunal healing in horses. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 65, n. 5, p. 637–643, maio, 2004.

EGOROV, V. I., SCHASTLIVTSEV, I. V., PRUT, E. V., BARANOV, A. O., TURUSOV, R. A. Mechanical properties of the human gastrointestinal tract. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 35, n.10, p. 1417-1425, outubro, 2002.

ETHERIDGE, M. L., XU, Y., ROTT, L., CHOI, J., GLASMACHER, B., BISCHOF, J. C. Heating of magnetic nanoparticles improves the thawing of cryopreserved biomaterials. **Technology**, Cingapura, v. 2, n. 3, 229-242, setembro, 2014.

FAHY, G. M., WOWK, B., PAGOTAN, R., CHANG, A., PHAN, J., THOMSON, B., PHAN, L. Physical and biological aspects of renal vitrification. **Organogenesis**, Massachusetts, v.5, n. 3, 167-175, julho, 2009.

FREEMAN D. E. Abdominal Surgery: Summary Procedure and Principles. In: 8th Congress on Equine Medicine And Surgery. 2003, Berlin. **Proceedings...** Ithaca, 2003. p. 1-9.

FREEMAN, D.E. Pathophysiology of intestinal obstruction. In: **Manual of Equine Gastroenterology**. MAIR, T.S., DIVERS, T., DUCHARME, N.G., Ed: Filadélfia, Saunders, 2002, p. 103-106.

FULLER, B. J., LANE, N., BENSON, E. E. **Life in frozen state**, Ed. Florida: CRC Press, 2004, pp. 4-9.

FULLER, M. K., FAULK, D. M., SUNDARAM, N., MAHE, M. M., STOUT, K. M., VON FURSTENBERG, R. J., HENNING, S. J. Intestinal stem cells remain viable after prolonged tissue storage. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 354, n. 2, p. 441–450, novembro, 2013.

FUNG, Y.C. Smooth Muscles. In: **Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues**. FUNG, Y.C. Ed: Nova Iorque, Springer, 1993. p. 466-499.

GAGE, A. A.; BAUST, J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology**, Bedfordshire, v. 37, n. 3, p. 171-186, novembro, 1998.

GANDINI, M. *In vitro* evaluation of a closed-bowel technique for one-layer hand-sewn inverting end-to-end jejunojejunostomy in the horse. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 35, n. 7, p. 683–688, outubro, 2006.

GANDINI, M. Handsewn semiclosed single-layer jejunocecal side-to-side anastomosis in the horse. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 39, n. 6, p. 771–775, agosto, 2010.

GANDINI, M.; IOTTI, B. N.; GIUSTO, G. Biomechanical comparison of four techniques for pelvic flexure enterotomy closure in horses. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 42, n. 7, p. 892–897, setembro, 2013.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Atlas Colorido de Histologia**. 5 Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010, p. 291-298.

JIN, B; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P. Survival of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. **Cryobiology**, Bedfordshire, v. 68, n. 3, p. 419-430, março, 2014.

HIGA, M., LUO, Y., OKUYAMA, T., TAKAGI, T., SHIRAISHI, Y., YAMBE, T. Passive mechanical properties of large intestine under *in vivo* and *in vitro* compression. **Medical Engineering & Physics**, Nova Iorque, v. 29, n.8, p. 840-844, outubro, 2007

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 279-310.

KARAM, R. G., CURY, F. S., AMBROSIO, C. E., MANÇANARES, C. A. F. Uso da glicerina para a substituição do formaldeído na conservação de peças anatômicas. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 7, p. 671–675, julho, 2016.

KARLSSON, J.O.M; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, Nova Iorque, v. 17, n. 3, p. 243-256, fevereiro, 1996.

KHOIY, K. A., ABDULHAI, S., GLENN, I. C., PONSKY, T. A., AMINI, R. Anisotropic and nonlinear biaxial mechanical response of porcine small bowel mesentery. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Nova Iorque, v. 78, p. 154-163, fevereiro, 2018.

KRUG, L., PAPPEN, F., ZIMMERMANN, F., DEZEN, D., RAUBER, L., SEMMELMANN, C., ROMAN, L. I., BARRETA, M. H. Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira. In: I Mostra de Iniciação Científica – I MIC. 2011, Concórdia. **Anais...** Concórdia, SC, 2011, p.1-6.

LEE, W. L., EPSTEIN, K. L., SHERLOCK, C. E., MUELLER, P. E., EGGLESTON, R. B. *In vitro* comparison of a single-layer (continuous lembert) versus two-layer (simple continuous/cushing) hand-sewn end-to-end jejunoileal anastomosis in normal equine small intestine. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 41, n. 5, p. 589–593, junho, 2012.

LEWIS, J. K., BISCHOF, J. C., BRASLAVSKY, I., BROCKBANK, K. G., FAHY, G. M., FULLER, B. J., ACKER, J. P. The Grand Challenges of Organ Banking: Proceedings from the first global summit on complex tissue cryopreservation. **Cryobiology**, Bedfordshire, v.72, n. 2, p. 169-182, abril, 2016.

LIU, Y., ZHAO, J., LIAO, D., BAO, L., GREGERSEN, H. Low-residue diet fed to rabbits induces histomorphological and biomechanical remodeling of small intestine. **Neurogastroenterology & Motility**, Cingapura, v.29, n.4, e12983??, abril, 2017a.

LIU, Y., ZHAO, J., LIAO, D., WANG, G., GREGERSEN, H. Intestinal mechanomorphological remodeling induced by long-term low-fiber diet in rabbits. **Annals of Biomedical Engineering**, Nova lorque, v.45, n.12, p. 2867-2878, dezembro, 2017b.

Lu, X., Zhao, J., Gregersen, H. Small intestinal morphometric and biomechanical changes during physiological growth in rats. **Journal of biomechanics**, Nova lorque, v. 38, n. 3, 417-426, março, 2005.

LOBO S.B., DENYER, M., GOPALAN, R.C., JAVID, F.A. Technique for cryopreservation of intestinal smooth muscle cells. **Cryobiology**, Bedfordshire, v. 57, n. 2, p. 186–189, agosto, 2008.

MACHARG, M. A., ADAMS, S. B., LAMAR, C. H. BECHT, J. L. Electromyographic, myomechanical, and luminal pressure changes associated with acute extraluminal obstruction of jejunum in conscious ponies. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 47, n. 1, p. 7-11, janeiro, 1986.

MAJEWSKI, P., PERNAK, A., GRZYMISLAWSKI, M., IWANIK, K., PERNAK, J. Ionic liquids in embalming and tissue preservation: Can traditional formalin-fixation be replaced safely? **Acta Histochemica**, Califórnia, v. 105, n. 2, p. 135–142, março, 2003.

MASSALOU, D., MASSON, C., FOTI, P., AFQUIR, S., BAQUÉ, P., BERDAH, S. V., BÈGE, T. Dynamic biomechanical characterization of colon tissue according to anatomical factors. **Journal of Biomechanics**, Nova lorque, v. 49, n. 16, 3861-3867, dezembro, 2016.

MATHIS, S. C., SLONE, D. E., LYNCH, T. M., HUGHES, F. E., CLARK, C. K. Use of colonic luminal pressure to predict outcome after surgical treatment of strangulating large colon volvulus in horses. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 35, n. 4, p. 356-360, junho, 2006.

MOHANKUMAR, K., KILLINGSWORTH, C. R., MCILWAIN, R. B., TIMPA, J. G., JAGADEESWARAN, R., NAMACHIVAYAM, K., MAHESHWARI, A. Intestinal epithelial apoptosis initiates gut mucosal injury during extracorporeal membrane oxygenation in the newborn piglet. **Laboratory Investigation**, Geórgia, v. 94, n. 2, p. 150–160, fevereiro, 2014.

MOTA, F. C. D., EURIDES, D., FREITAS, P. M. C., BELETTI, M. E., MASTRANTONIO, E. C., SHIMIZU, B. J., MARTINS, A. K. Análise morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada. **Ciência Animal Brasileira**, Goiás, v. 4, n. 2, p. 117–123, dezembro, 2003.

MUÑETÓN GÓMEZ, C. A., ORTIZ, J. A. Preparation in glycerin: a technique for prolonged preservation of bodies in veterinary anatomy. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, n. 26, p. 115–122, dezembro, 2013.

MYERS, R. K., McGAVIN, M. D. Respostas celulares e teciduais a lesão. In: McGAVIN, M. D., ZACHARY, J. F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 26

NAKAJIMAI, V., KOBAYASIII, S., NARESSEIII, L. E., DE SOUZA LEITEIII, C. V., CURIIV, P. R., CORTEZ, J. Alterations in the intestinal wall due to protein malnutrition in rats. Evaluation of the rupture strength and the tissue's collagen1. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 23, n. 5, 435-440, setembro, 2008.

NELSEN, T. S., ANDERS, C. J. Dynamic aspects of small intestinal rupture with special consideration of anastomotic strength. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 93, n. 2, 309-314, agosto, 1966.

NELSON, B. B.; HASSEL, D. M. *In vitro* comparison of V-Loc versus Biosyn in a one-layer end-to-end anastomosis of equine jejunum. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 43, n. 1, p. 80–84, janeiro, 2014.

NETO, A. A. C.; PAES, J. L. L.; CARVALHO, R. G. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *Escherichia coli*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 151-154, outubro, 1997.

NIETO, J. E.; DECHANT, J. E.; SNYDER, J. R. Comparison of one-layer (continuous Lembert) versus two-layer (simple continuous/Cushing) hand-sewn end-to-end anastomosis in equine jejunum. **Veterinary Surgery**, Massachusetts, v. 35, n. 7, p. 669–673, outubro, 2006.

NOLASKO, R. M., BELETTI, M. E., EURIDES, D., SILVA, F. O. C., DALECK, C. R., SILVA, L. A. F. D. Avaliação histológica e ultra-estrutural de tendões em diferentes produtos. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 210–215, novembro, 2003.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 368, p. 39, março, 2007.

RABIN, Y.; STEIF, P. S. Thermal stresses in a freezing sphere and its application to cryobiology. **Journal of Applied Mechanics**, Nova Iorque, v. 65, n. 2, p. 328-333, junho, 1998a.

RABIN, Y.; TAYLOR, M. J.; WOLMARK, N. Thermal expansion measurements of frozen biological tissues at cryogenic temperatures. **Journal of Biomechanical Engineering**, Nova Iorque, v. 120, n. 2, p. 259-266, abril, 1998b.

RABIN, Y.; STEIF, P. S. Thermal stress modeling in cryosurgery. **International Journal of Solids and Structures**, Nova Iorque, v. 37, n. 17, p. 2363-2375, abril, 2000.

RAIKEVITCH, N. P. About the mechanical strength of the different layers of the gastrointestinal tract and its changing in intestinal obstruction. **Chirurgia**, Moscou, v.3, p. 30-34, 1963.

RISSELADA, M., ELLISON, G. W., WINTER, M. D., GIGLIO, R. F., SHIS, A., HERNANDEZ, J. A., GRIFFITH, E. *In vitro* evaluation of bursting pressure and intestinal luminal area of three jejunostomy tube placement techniques in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 76, n. 5, p. 467–474, maio, 2015.

RÖHE, I., HÜTTNER, F. J., PLENDL, J., DREWES, B., ZENTEK, J. Comparison of different histological protocols for the preservation and quantification of the intestinal mucus layer in pigs. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 62, n. 1, p. 63–70, fevereiro, 2018.

ROSEN, J., BROWN, J. D., DE, S., SINANAM, M., HANNAFORD, B. Biomechanical properties of abdominal organs *in vivo* and postmortem under compression loads. **Journal of Biomechanical Engineering**, Nova Iorque v. 130, n. 2, p. 021020, abril, 2008.

ROSSER, J. M., BROUNTS, S., LIVESEY, M., WIEDMEYER, K. Comparison of single layer staple closure versus double layer hand-sewn closure for equine pelvic flexure enterotomy. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 53, n. 6, p. 665–669, junho, 2012.

SCHEIFELE, D.; BJORNSON, G.; DIMMICK, J. Rapid *post mortem* gut autolysis in infant rats: a potential problem for investigators. **Canadian journal of veterinary research**, Ottawa, v. 51, n. 3, p. 404–406, julho, 1987.

SHERLOCK, C., LEE, W., MULLER, P. O. E., EGGLESTON, R., EPSTIN, K. *Ex vivo* comparison of three hand sewn end-to-end anastomoses in normal equine jejunum. **Equine Veterinary Journal**, Cingapura, v. 43, n. 39, p. 76–80, agosto, 2011.

SHIKATA, J., SHIDA, T., AMINO, K., ISHIOKA, K. Experimental studies on the hemodynamics of the small intestine following increased intraluminal pressure. **Surgery, gynecology & obstetrics**, Chicago, v. 156, n. 2, p. 155-160, fevereiro, 1983.

SHOSHANI, O., ULLMANN, Y., SHUPAK, A., RAMON, Y., GILHAR, A., KEHAT, I., PELED, I. J. The role of frozen storage in preserving adipose tissue obtained by suction-assisted lipectomy for repeated fat injection procedures. **Dermatologic Surgery**, Massachusetts, v. 27, n. 7, p. 645–647, julho, 2001.

SILVA E.M., DIAS G., TAVARES M., MARQUES T., FURTADO J.M. Estudo analítico da técnica de glicerinação empregada para conservação de peças anatômicas: experiência da disciplina de Anatomia Humana do Departamento de Morfologia da UniFOA. **Cadernos UniFOA**, v. 3, p. 66-69, agosto, 2008.

SOKOLIS, D. P. Experimental study and biomechanical characterization for the passive small intestine: Identification of regional differences. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Nova Iorque, v.74, p. 93-105, outubro, 2017.

STEMPER, B. D., YOGANANDAN, N., STINEMAN, M. R., GENNARELLI, T. A., BAISDEN, J. L., PINTAR, F. A. Mechanics of fresh, refrigerated, and frozen arterial tissue. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 139, n. 2, p. 236–242, maio, 2007.

STEIF, P. S., PALASTRO, M. C., RABIN, Y. The effect of temperature gradients on stress development during cryopreservation via vitrification. **Cell Preservation Technology**, New Rochelle, v. 5, n. 2, p. 104-115, fevereiro, 2007.

TAKEICHI S, TOKUNAGA I, YOSHIMA K, MAEIWA M, BANDO Y, KOMINAMI E, KATUNUMA N. Mechanism of postmortem autolysis of skeletal muscle. **Biochemical Medicine**, Nova Iorque, v. 32, n. 3, p. 341-348, dezembro, 1984.

TASAKA, K.; FARRAR, J. T. Intraluminal pressure of the small intestine of the unanesthetized dog. **European Journal of Physiology**, Heidelberg, v. 364, p. 35–44, junho, 1976.

VARIEND, S.; SUNDERLAND, R. Small intestinal mucosal abnormalities in post-perinatal. **Journal of Clinical Pathology**, Londres, v. 37, n. 3, p. 283–287, março, 1984.

VERONEZ, D. A. FARIAS, E. L. P., DE FRAGA, R., FREITAS, R. S. D., PETERSEN, M. L., SILVEIRA, J. R. D. P. Potencial de risco para a saúde ocupacional de docentes,

pesquisadores e técnicos de anatomia expostos ao formaldeído. **InterfacEHS**, São Paulo, v. 5, n. 2, agosto, 2010.

VLEET, J. F. V. Músculo esquelético. In: JONES, T. C., HUNT, R. D., KING N. W. **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 890

WALSH, M. T., CUNNANE, E. M., MULVIHILL, J. J., AKYILDIZ, A. C., GIJSEN, F. J. H., HOLZAPFEL, G. A. Uniaxial tensile testing approaches for characterisation of atherosclerotic plaques. **Journal of Biomechanics**, Nova Iorque, v. 47, n. 4, p. 793-804, fevereiro, 2014.

WEX, C., STOLL, A., FRÖHLICH, M., ARNDT, S., LIPPERT, H. Mechanics of fresh, frozen-thawed and heated porcine liver tissue. **International Journal of Hyperthermia**, Oxfordshire, v. 30, n. 4, p. 271–283, junho, 2014.

WU, F. C., AYRIZONO, M. D. L. S., FAGUNDES, J. J., COY, C. S. R., GOES, J. R. N., LEONARDI, L. S. Estudos biomecânicos da ação de aderências sobre anastomose cólica: trabalho experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 216–223, junho, 2003.

WU, F. C., LEE, H. D., MACHADO, R. B., DALMAS, S., COY, C. S. R., GOES, J. R. N., FAGUNDES, J. J. Energia total de ruptura: um teste biomecânico para avaliação de material biológico com propriedade viscoelástica não linear. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 609–616, dezembro, 2004.

ZENG, Y. J., QIAO, A. K., YU, J. D., ZHAO, J. B., LIAO, D. H., XU, X. H., HANS, G. Collagen fiber angle in the submucosa of small intestine and its application in gastroenterology. **World Journal of Gastroenterology**, Pequim, v. 9, n. 4, p. 804-807, abril, 2003

Zhao, J., Sha, H., Zhuang, F., Gregersen, H. Morphological properties and residual strain along the small intestine in rats. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 8, n. 2, p. 312–317, abril, 2002.