

Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios

Ultrastructural evaluation of canine layer intestinal muscle maintained in different conservative solutions

**Francisco Cláudio Dantas MOTA¹, Duvaldo EURIDES¹, Marcelo Emílio BELETTI²,
Patrícia Maria Coletto FREITAS¹, Eneida César MASTRANTONIO¹,
Bianca Jacob SHIMIZU¹, Julio Roquete CARDOSO³, Alan Kardek MARTINS³**

**CORRESPONDÊNCIA PARA:
DUVALDO EURIDES**

Faculdade de Medicina Veterinária/FAMEV
Universidade Federal de Uberlândia/UFU
Av. Pará 1720, Campus Umuarama
38400-902 – Uberlândia - MG
e-mail: duvaldo@ufu.br

1- Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia - MG

2- Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia - MG

3- Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo, São
Paulo - SP

RESUMO

Foram avaliados 25 amostras da camada muscular do intestino delgado de cães, conservados em solução supersaturada de açúcar a 300%, glicerina a 98%, polivinil-pirrolidona a 5% e tintura de tiomersal 1:1000. As amostras foram mantidas conservadas por 45 dias e submetidas a análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão. Os meios não preservaram totalmente a integridade celular, sendo as soluções de açúcar a 300% e glicerina 98% as que melhor mantiveram as ultra-estruturas celulares.

PALAVRAS-CHAVE: Intestino delgado. Cães. Preservação de tecido.

INTRODUÇÃO

Durante muitos séculos, a procura por métodos de conservação para diversos tecidos vem sendo constante, seja para preservação de peças anatômicas ou pelo crescente uso de materiais biológicos nos transplantes homólogos e heterólogos, em cirurgias reconstrutivas e reparadoras de elementos tubulares, valvares e principalmente de sustentação.

Vários estudos tem sido realizados afim de se obter um meio ideal para preservação de tecidos biológicos, meio este que seja de fácil obtenção, transporte e sem custos elevados, facilitando o emprego cirúrgico das membranas biológicas em qualquer situação. A solução preservadora deve possuir um alto poder estabilizador impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos, manter ao máximo a integridade celular, aumentar a resistência à tração dos tecidos e atuar por um período de tempo prolongado¹.

Dentre as várias supostas soluções que podem ser usadas na conservação de tecidos, encontram-se a solução alcoólica de tintura de tiomersal 1:1000 utilizada como agente preservador de membranas biológicas¹ e de ossos^{9,13,29}.

A glicerina a 98% é o meio mais utilizado na conservação de tecidos, destinados às cirurgias reconstrutivas, por apresentar propriedades anti-sépticas, rápida ação desidratante e fixadora, mantendo a integridade celular e a textura original dos tecidos¹. Sendo empregada na conservação da dura máter²³, peritônio de bovino^{6,7}, peritônio de cão⁵, pericárdio de equino²⁷, traquéia de cão⁸,

cápsula renal de coelho¹², ossos^{3,9}, ligamento nugal de bovino²¹, músculo diafragma de cães¹⁵, bexiga urinaria de cão²² e a túnica muscular do intestino delgado de cães¹⁷.

O polivinil-pirrolidona é um anti-séptico não irritante dos tecidos e de baixa toxicidade¹⁸, sendo utilizado na preservação de tecidos biológicos, como o ligamento nugal de bovinos¹⁹ e a camada muscular do intestino delgado de cães¹⁷.

O açúcar granulado foi recomendado no tratamento de feridas contaminadas^{14,24,25,26,30,32}. No entanto, a solução supersaturada foi considerada bactericida em concentrações superiores a 250%²⁰, e empregada na conservação do músculo diafragma¹⁶ e da túnica muscular do intestino delgado¹⁷.

Neste experimento, objetivou-se avaliar em microscopia eletrônica de transmissão, a integridade celular da camada muscular do intestino delgado de cão, conservada em glicerina 98%, tintura de tiomersal 1:1000, polivinil-pirrolidona a 5% e solução de açúcar supersaturada a 300%.

MATERIALE MÉTODO

Foram utilizados cinco cães adultos, três machos e duas fêmeas, sem raça definida, com peso variando de 6 a 10 kg. Após terem sido submetidos a exames clínicos, hemograma completo, vermifugados e observados durante 10 dias. Foram considerados clinicamente sadios.

Os cães foram submetidos a enterectomia do jejuno de aproximadamente 10 cm de comprimento. O segmento intestinal foi evertido e irrigado várias vezes com solução

fisiológica a 0,9%. Introduziu-se um tubo de ensaio no lume do segmento intestinal evertido. O epitélio e lâmina própria da túnica mucosa foram removidos através de fricções por meio de uma compressa cirúrgica umedecida em solução fisiológica a 0,9%¹⁰. Os segmentos foram regados em solução fisiológica 0,9%, cada um dividido em cinco fragmentos de 2,0 cm e colocados individualmente em frascos de vidro estéreis, constituindo-se quatro grupos preservantes e um controle. Cada um com cinco amostras oriunda de cães diferentes.

O grupo controle foi fixado imediatamente após a coleta em glutaraldeído a 4% tamponado com cacodilato de sódio 0,1M em pH 7,4.

Após 48 horas no fixador, os fragmentos foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,4), duas vezes por 10 minutos e fixados durante uma hora em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianeto de potássio a 1,25%. Em seguida foram incluídos em resina Epon, e cortados em ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos². Os cortes obtidos foram contrastados com acetato de uranila³¹ e citrato de chumbo^{28, 2} e examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-109.

Os segmentos do grupo 1 foram conservados em solução supersaturada de açúcar a 300%, os do grupo 2 em solução de glicerina 98%, os do grupo 3 em polivinil-

pirrolidona a 5% e os do grupo 4 em solução alcoólica de tiomersal 1:1000. As frações intestinais permaneceram submersas nas soluções preservadoras em frascos fechados e a temperatura ambiente durante 45 dias.

Decorrido o período pré estabelecido, as amostras foram lavadas e submetidas à imersão por 20 minutos em solução fisiológica 0,9%, para remover a solução conservadora dos tecidos. Os materiais foram fixados e corados para a análise em microscopia eletrônica de transmissão conforme o grupo controle.

RESULTADOS

Nos fragmentos do grupo controle, as células musculares intestinais apresentavam-se com a membrana citoplasmática íntegra (Fig. 1A), citoplasma compacto, raras mitocôndrias, as quais eram alongadas, de matriz clara e com poucas cristas (Fig. 1B). Foram observados ainda manchas alongadas eletrodensas denominadas corpos densos. Os núcleos apresentaram-se com o envoltório íntegro (Fig. 1C), heterocromatina periférica e com eucromatina central, juntamente com o nucléolo. No citoplasma foram encontradas vesículas membranosas sem forma definida, que são componentes do retículo sarcoplasmático. Junto à membrana plasmática foram observados vesículas de

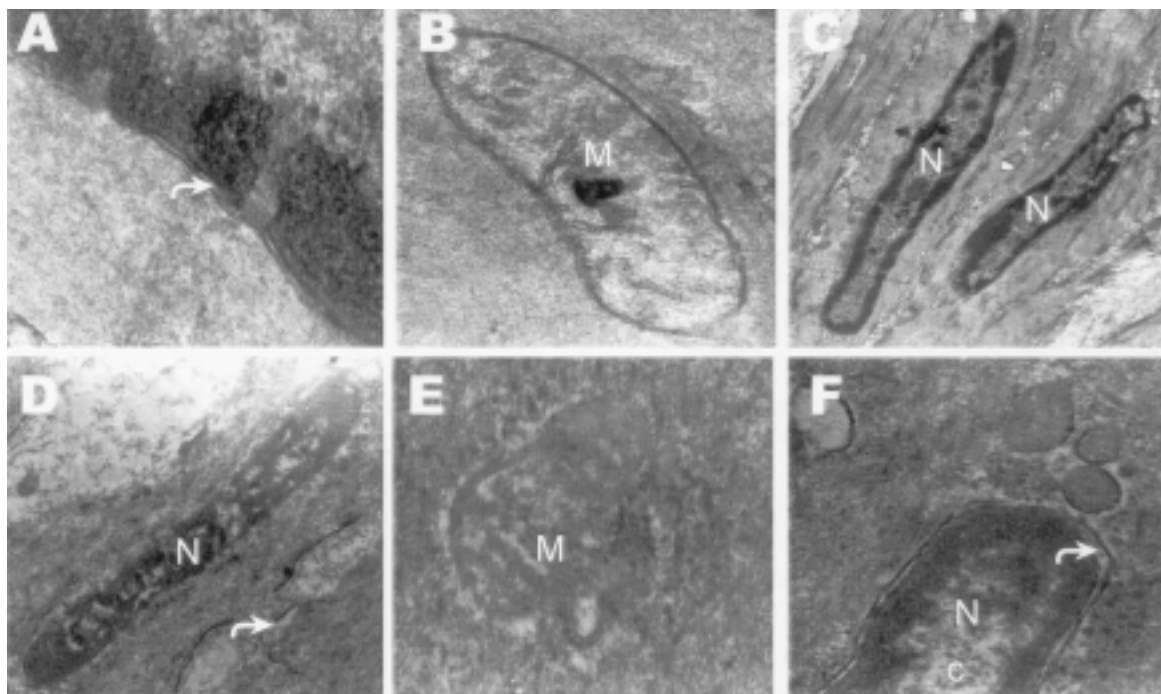


Figura 1

Aspecto ultra-estrutural da musculatura lisa intestinal de cão do grupo controle (A, B, C) e preservada em solução de açúcar a 300% (D, E, F). Observa-se em “A” a integridade da membrana citoplasmática (seta) (50.000X), em “B” da mitocôndria (M) (30.000X) e em “C” do núcleo (N) (3.000X). Observe em “D” o núcleo (N) desorganizado e a membrana citoplasmática com sinais de ruptura (seta) (30.000X), em “E” a mitocôndria degenerada (M) (50.000X) e em “F” o núcleo (N) com a cisterna perinuclear dilatada (seta) e desagregação da cromatina (c) (50.000X).

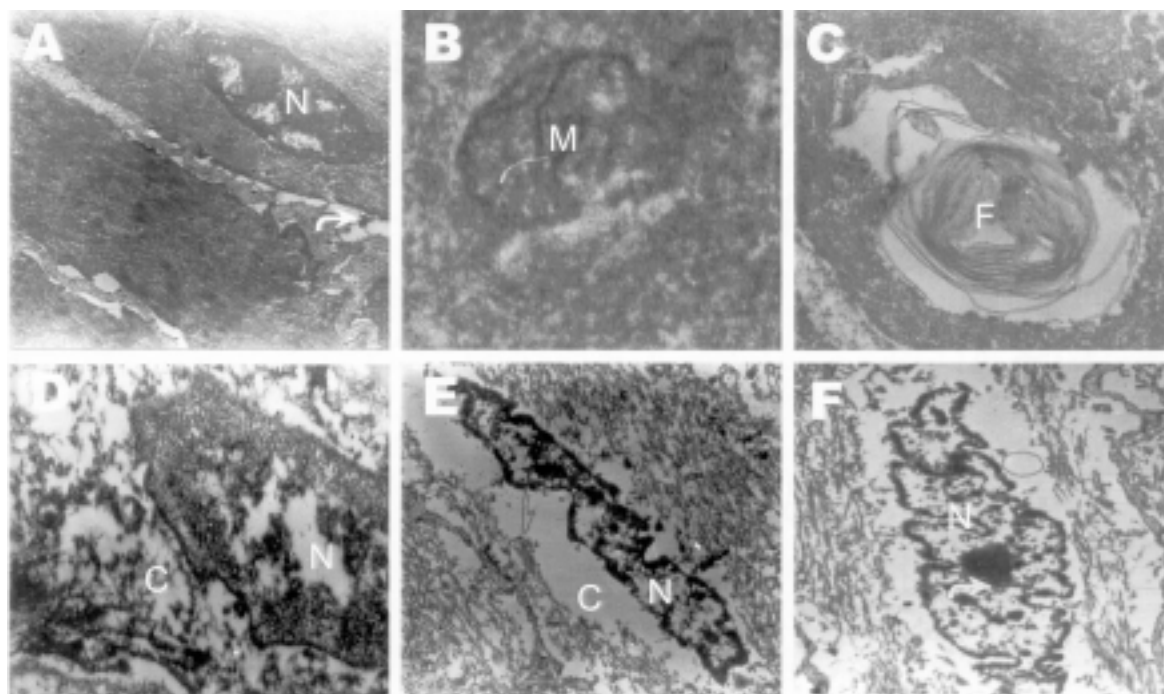


Figura 2

Aspecto ultra-estrutural da musculatura lisa intestinal de cão preservada em glicerina a 98% (A, B, C), em polivinil-pirrolidona 5% (D) e em tintura de tiomersal 1:1000 (E, F). Observa-se em “A” o núcleo dilatado (N) e o envoltório celular rompido em alguns pontos (seta) (7.000X), em “B” a mitocôndria degenerada (M) (30.000X), em “C” figura mielínica (F) (12.000X), em “D” o citoplasma (C) e o núcleo (N) lisados (30.000X), em “E” o núcleo (N) e o citoplasma (C) degenerados (12.000X) e em “F” o núcleo (N) com a cromatina desagregada e presença do nucléolo (seta).

micropinocitose.

As células musculares dos tecidos preservados na solução supersaturada de açúcar, mostravam sinais de ruptura da membrana plasmática (Fig. 1D). Os componentes citoplasmáticos ficavam levemente afastados entre si. As organelas apresentavam-se de maneira geral desestruturadas (Fig. 1E), não sendo possível a identificação de corpos densos. Os núcleos mantiveram sua morfologia normal, mas com desagregação cromatínica (Fig. 1F). O envoltório nuclear, quando íntegro, apresentava a cisterna perinuclear dilatada (Fig. 1F).

A glicerina a 98% causou algumas rupturas na membrana plasmática do músculo liso intestinal nele preservado (Fig. 2A). Os componentes citoplasmáticos ficaram levemente afastados entre si, não sendo possível observar organelas íntegras (Fig. 2B), porém foi possível a identificação de corpos densos. Os núcleos apresentavam-se dilatados com desagregação da cromatina (Fig. 2A). Encontrando-se também a presença de figuras mielínicas (Fig. 2C).

No grupo cuja solução preservadora foi o polivinil-pirrolidona, as células apresentavam-se totalmente destruídas, não sendo possível a identificação de nenhuma estrutura ou organela no citoplasma. Os núcleos mostravam-se rompidos e com a cromatina desagregada (Figura 2D).

As alterações no material conservado em tintura de

tiomersal 1:1000 foram semelhantes ao do grupo conservado em polivinil-pirrolidona. Entretanto, a cromatina das células musculares lisas dos fragmentos intestinais preservados em tintura de tiomersal 1:1000, estavam mais organizadas (Fig. 2E), sendo possível a identificação do nucléolo (Fig. 2F).

DISCUSSÃO

As células musculares, do intestino delgado¹⁷ e do diafragma de cães¹⁶ conservados na solução supersaturada de açúcar, mostravam-se íntegras e com um pequeno aumento do espaço intersticial, quando submetidas a análise em microscopia de luz. Entretanto, a análise ultra-estrutural realizada neste experimento, mostrou que os tecidos conservados nesta solução, apresentavam alterações das organelas, desagregação da cromatina e o rompimento da membrana citoplasmática em algumas células.

O peritônio de cão conservado em glicerina a 98%, durante 30 e 90 dias por Daleck et al.⁵, na avaliação histológica em microscopia de luz, não apresentou alteração em relação ao exame do material recém colhido. As fibras musculares entretanto, mostravam-se mais acidófilas, retraídas e com núcleos mais condensados. Estas alterações também foram relatadas por Daleck et al.⁷, ao examinarem o peritônio de bovino conservado durante 60 dias em glicerina a 98% e por

Daleck et al.⁶, com peritônio de bovino preservado durante 180 dias. Observações semelhantes foram retratadas por Mota et al.¹⁷ na preservação da túnica muscular do intestino delgado de cão por 45 dias e Mazzanti et al.¹⁵ utilizando o músculo diafragma de cão durante 30 dias, diferenciando apenas pela condensação do núcleo. Neto et al.²¹ referiram-se também à integridade celular em microscopia de luz do ligamento nugal de bovinos preservado neste meio. Ranzani et al.²⁷ entretanto, na avaliação histológica do pericárdio de equino conservado na mesma solução, notou a ausência de núcleos e a manutenção das demais estruturas. Já a análise ultra-estrutural da camada muscular do intestino delgado de cão preservado em glicerina a 98% mostrou alterações das organelas, desagregação da cromatina e freqüente presença de figuras mielínicas. Estas figuras são um indicativo de má preservação deste tecido, já que este artefato geralmente aparece por desagregação de estruturas e organelas membranosas^{4,11}.

Apesar de Moura¹⁸ ter afirmado que o polivinil-pirrolidona não afeta a pele, tem baixa toxicidade, e Neto¹⁹ et al. relataram que esta solução não altera as características microscópicas dos tecidos nele preservado. A análise ultra-estrutural deste experimento, mostrou a desagregação e a ruptura generalizada das células, condizendo com os relatos feitos por Mota¹⁷ et al.,

que observaram a destruição dos núcleos celulares e o extravasamento da cromatina, ao conservarem a camada muscular do intestino delgado neste meio.

Alvarenga¹ propôs o uso do tiomersal 1:1000 como agente preservador de tecidos biológicos. Porém os achados ultra-estruturais desta pesquisa mostraram uma completa destruição dos núcleos, desagregação da cromatina e ruptura generalizada das células, correspondendo aos resultados encontrados por Mota¹⁵ et al., que observaram aumento do volume nuclear e cariólise ao conservarem a túnica muscular do intestino delgado de cão nesta solução. Estas alterações provavelmente ocorrem pela hipotonicidade desta solução, bem como a sua toxicidade¹³.

CONCLUSÕES

As soluções de açúcar a 300%, glicerina 98%, polivinil-pirrolidona a 5% e a tintura de tiomersal 1:1000, utilizados como meios de preservação de tecidos biológicos não são capazes de manter a integridade celular.

Dos meios de preservação avaliados, as soluções supersaturada de açúcar e glicerina 98% são as que melhor mantêm as ultra-estruturas celulares.

Devem-se conceber estudos adicionais, afim de se encontrar um meio ideal para conservação de tecidos.

SUMMARY

The present study evaluated twenty-five samples of the muscular layer of the small gut in dogs, which were preserved in a 300% sugar supersaturated solution, 98% glycerin, 5% polyvinil-pirrolidona and tiomersal tincture at 1: 1000. The samples were maintained under conservation for 45 days and further submitted to ultrastructural assay by transmission electron microscopy. The cellular integrity was not entirely preserved when using the media, while the 300% sugar solution and 98% glycerin were the preservation conditions that better maintained the cellular ultrastructure.

KEY-WORDS: Intestine, small. Dogs. Tissue preservation.

REFERÊNCIAS

- 1- 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.
- 2- BOZZOLA, J. J., LONNIE, D. R. **Electron microscopy**. 2 ed. Boston: Jones and Bartlett, 1999. 669 p.
- 3- COSTA, J. L. O. **Reconstrução de grande falha óssea com enxerto cortical alógeno conservado em glicerina, fixado com placa e parafusos de aço inoxidável da série 304**. Estudo experimental em cães (*Canis familiaris*). 1996. 100 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, UNESP, Jaboticabal.
- 4- CHEVILLE, N. F. **Ultrastructural pathology**. Ames: Iowa State University Press, 1994. 946 p.
- 5- DALECK, C. R. et al. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina – estudo experimental. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 1-2, 1988.
- 6- DALECK, C. R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v. 22, n. 2, p. 179-183, 1992.
- 7- DALECK, C. R. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: Estudo experimental. **Ars Veterinaria**, v. 4, n. 1, p. 53-61, 1988.
- 8- DALECK, C. R. et al. Substituição de um segmento da traquéia cervical (4 anéis) em cães por traquéia homóloga conservada em glicerina. Estudo experimental. 1994. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 1994, Curitiba, PR. **Anais...** Curitiba: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1994. p. 63.
- 9- DEL CARLO, R. J. et al. Aloenxerto ósseos caninos diferentemente preservados. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 6, n. 3, p. 121-126, 1999.
- 10- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; BELETTI, M. E. Remoção do epitélio e lâmina própria da túnica mucosa de um segmento intestinal livre de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 3., 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 95.

MOTA, F.C.D.; EURIDES, D.; BELETTI, M.E.; FREITAS, P.M.C.; MASTRANTONIO, E.C.; SHIMIZU, B.J.; CARDOSO, J.R.; MARTINS, A.K. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.39, n.1, p. 13-17, 2002.

- 11- GHADIALLY, F. N. **Ultrastructural pathology of the cell and matrix**. 4. ed. Butterworth Boston: Heinemann, 1997. 1414 p.
- 12- GONÇALVES, G. F.; EURIDES, D.; BELETTI, M. E. Cápsula renal de coelho conservada em glicerina como enxerto. In: SEMANA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, SECA, 3., 1996, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: FAMEV, 1996. p. 26.
- 13- JONCK, L. M. Allogenic bone transplantation: a review of the status of allogenic bank. **South African Medical Journal**, v. 60, n. 11, p. 428-433, 1981.
- 14- MARTINEZ, N. R. et al. O açúcar no tratamento das feridas infectadas. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 76, n. 1, p. 23-26, 1986.
- 15- MAZZANTI, A. et al. Análise do músculo diafragma de cão conservado em glicerina a 98% em temperatura ambiente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000a. p. 99.
- 16- MAZZANTI, A. et al. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para reparação de grande defeito no diafragma de cão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000b. p. 100.
- 17- MOTA, F.C.D. et al. Segmento intestinal de cão livre e desprovido de epitélio e lâmina própria da túnica mucosa preservado em diferentes meios de conservação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000. p. 108.
- 18- MOURA, C. J. **Limpeza e sanitização em pequenas fábricas de laticínios e mini usinas de beneficiamento**. Lavras: UFLA, 1997. 30 p. (Boletim Técnico Série Extensão. UFLA.)
- 19- NETO, J. M. C. et al. Ação antimicrobiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000a. p. 97.
- 20- NETO, A. A. C. et al. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *escherichia coli*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 24, n. 3, p. 151-154, 1997.
- 21- NETO, J. M. C. et al. Ligamento nucal de bovino conservado em glicerina 98%, como biomaterial para enxertos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000b. p. 98.
- 22- OLIVEIRA, O. L. et al. Implante homogêneo de bexiga conservado em glicerina a 98% para reparo da bexiga de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000, Goiânia, GO. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2000. p. 113.
- 23- PIGOSSI, N. et al. Estudo experimental sobre o emprego, como implante, da dura máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971
- 24- PRATA, M. B. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.
- 25- RAHAL, F. et al. O açúcar no tratamento local das infecções das feridas cirúrgicas. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v. 10, n. 4, p. 135-136, 1983.
- 26- RAISER, A. G.; BADKE, M. R. Terapia de infecções cirúrgicas com jatos de solução salina e açúcar granulado. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 6, p. 125-128, 1987.
- 27- RANZANI, J. J. T. et al. Substituição de segmento da porção muscular diafragmática de cão por pericárdio de equino conservado em glicerina: Estudo experimental. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 1, p. 65-73, 1990.
- 28- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high ph as an electron opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biological**. v. 18, p. 208-213, 1963.
- 29- REYNOLDS, F. C., OLIVER, D. R., RAMSEY, R. Clinical evaluation of de merthiolate bone bank and homogenous bone graft. **Journal Bone Joint Surgical**, v.33, n.29, p.873-877, 1951.
- 30- SILVA, S. V. et al. Açúcar na cicatrização de ferida infectada em equino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 84, 1996.
- 31- WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 4, p. 457-478, 1958.
- 32- WEISS, R. G. et al. Tratamento da ferida operatória infestada: açúcar, uma nova opção. **Prática Médica Geral**, v. 28, n. 4, p. 337-342, 1984.

Recebido para publicação: 28/08/2001
Aprovado para publicação: 31/01/2002