

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSÍOMÉTRICAS
COMPARADAS DE CENTRO TENDÍNEO, PERICÁRDIO E
PERITÔNIO DE BOVINOS A FRESCO E CONSERVADOS
EM GLICERINA**

Gregório Corrêa Guimarães

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2006

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSIOMÉTRICAS
COMPARADAS DE CENTRO TENDÍNEO, PERICÁRDIO E
PERITÔNIO DE BOVINOS A FRESCO E CONSERVADOS
EM GLICERINA**

Gregório Corrêa Guimarães

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária (Cirurgia Veterinária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2006

Guimarães, Gregório Corrêa
G963p Propriedades morfológicas e tensiométricas comparadas de
centro tendíneo, pericárdio e peritônio de bovinos a fresco e
conservados em glicerina / Gregório Corrêa Guimarães. –
Jaboticabal, 2006
x, 57 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2006
Orientadora: Márcia Rita Fernandes Machado
Banca examinadora: André Luiz Quagliatto Santos, Antônio
Carlos Marconi Stipp, Carlos Roberto Daleck, Maria Rita Pacheco.
Bibliografia

1. Bovinos. 2. Centro tendíneo. 3. Ensaio mecânicos. 4.
Pericárdio. 5. Peritônio. 6. Histologia. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:611.38:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GREGÓRIO CORRÊA GUIMARÃES – nascido em Fernandópolis/SP, no dia 04 de abril de 1978. Graduado em Medicina Veterinária, no ano de 2001 pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia/MG. Iniciou a Pós-graduação no curso de Mestrado em março do ano de 2002, em Cirurgia Veterinária na UNESP, Câmpus de Jaboticabal/SP, concluindo-o em fevereiro do ano 2004. Ingressou no curso de Doutorado, em março do ano 2004, no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária desta mesma instituição e o concluiu em novembro de 2006. Ministra as disciplinas de Anatomia dos Animais Domésticos e Anatomia Topográfica Animal, na Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO Câmpus Fernandópolis/SP, Centro Universitário Barão de Mauá Ribeirão Preto/SP e Universidade Paulista – UNIP Câmpus Bauru/SP.

“O amor vence, sempre vencerá”

Ramatis

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista primeiramente a Deus e à minha família, em especial aos meus pais, Antônio e Luzia, que em todas as ocasiões de minha vida sempre foram meus alicerces e que são os responsáveis por este dia e pela pessoa que sou, por terem me ensinado o verdadeiro valor da vida, o amor e o respeito ao próximo.

À minha esposa Camila, pelo seu amor, companheirismo, compreensão, paciência, dedicação e cumplicidade, que muito suportou a distância, as noites mal dormidas, os finais de semana sem paciência e cheio de afazeres escolares, mas que sempre se colocou ao meu lado e disposta a me ajudar e a me acalmar, você é sem dúvida a minha razão de viver, minha companheira e minha amante.

Aos meus irmãos Antônio e Fernanda que amo de paixão, aos meus sobrinhos Bárbara e “nenê” que está para chegar em nossas vidas, e aos cunhados Osvaldo, Estela e Rafael.

Ao meu tio Sebastião, primeiro doutor de minha família e que sempre me apoiou em minhas empreitadas, pela pessoa generosa que é e pelo grande coração que possui.

Aos meus sogros João e Elisa, saibam que hoje compreendo o verdadeiro significado da frase “quando nossos filhos se casam, ganhamos novos filhos”. Realmente tenho quatro pais em minha vida...

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Especial à minha orientadora Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado, mulher guerreira, de fibra, que enfrentou com coragem muitos obstáculos em sua vida e que mesmo assim nunca deixou de ajudar ao próximo. Professora, agradeço a Deus por tê-la colocado em minha vida. Só uma mãe de verdade e extremamente generosa faria o que a senhora fez por mim nesses cinco anos de convivência, que por sinal foram sempre harmoniosos. Aprendi que ser orientador não é ser duro e cobrador, mas sim uma pessoa solidária, presente, amiga, que estende a mão em todos os momentos, que dá o ombro para chorar e que ensina os caminhos a serem trilhados. Não só este trabalho mas minha carreira acadêmica só foram possíveis pela sua insistência e dedicação. Obrigado por acreditar em mim, pelo carinho, amizade, orientação e paciência dedicada.

Ao prof. Dr. Antônio Carlos Shimano pela participação direta na elaboração deste trabalho, pela paciência, pelos ensinamentos e dedicação.

Aos amigos Claudinei da Cruz, Aretuza Capalbo e Alessandra Scavone, que me ajudaram diretamente na elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. David George Francis, meu eterno mestre, que desde cedo me deu a oportunidade de ingressar no meio científico, proporcionando ensinamentos durante minha vida acadêmica e a quem nunca deixarei de agradecer.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck, grande idealizador deste trabalho, sem suas idéias jamais teria tirado este trabalho do papel, e que além de tudo é um “São-Paulino Campeão”.

Ao prof. Stipp e à sua esposa Elami, pela amizade, carinho e consideração.

Ao Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos, pela amizade, dedicação e participação direta em minha formação acadêmica e pós-graduação.

Aos Professores Júlio Carlos Canola, Paulo Francheschini, Gilson Toniolo e Maria Rita Pacheco, pela participação em minhas bancas de qualificação e defesa, pela correção de minha tese com dedicação e boa vontade.

Ao seu Manoel e à dona Marlene, aos seus filhos Fabrício, Diego e Mateus, pelo carinho, pela paciência e por terem me acolhido como um filho. Sem vocês não teria chegado até aqui.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Iara, Marilda e Nilton, pelo tempo e amizade dedicados.

À Rosângela, ao Dr. André e a todos os funcionários e responsáveis pelo serviço de inspeção do Frigorífico Barra Mansa por terem cedido o material utilizado neste experimento.

Aos colegas e funcionários do Centro Universitário Barão de Mauá, Universidade Paulista e Universidade Camilo Castelo Branco.

Ao Prof. Dr. José Batista Volpon, Maria Teresa e a todos os professores e funcionários do Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Em memória ao meu grande amigo José Luis Tucci Turco que elaborou este trabalho ao meu lado e que hoje infelizmente não se encontra junto a nós.

Ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade oferecida.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração desta tese.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	iii
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1 Introdução.....	01
2 Revisão da Literatura.....	03
2.1 Aplicabilidade das Biomembranas.....	03
2.2 Meios de Conservação.....	05
2.3 Ensaio Mecânicos.....	09
2.4 Anatomia (s) Macro e Microscópica.....	12
3 Material e Métodos.....	14
3.1 Ensaio Mecânico de Tração.....	14
3.2 Estudo Histológico.....	17
3.2.1 Microscopia de Luz.....	17
3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	18
3.3 Estatística.....	19
4 Resultados.....	20
4.1 Ensaio Mecânicos de Tração.....	20
4.2 Microscopia.....	26
5 Discussão.....	36
6 Conclusões.....	41
7 Referências.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FDA		Food and Drug Administration
Kg		Quilograma (s)
min		Minuto (s)
mm		Milímetro (s)
mm ²		Milímetro (s) quadrado (s)
N		Newton (s)
P		Nível de significância
°C		Graus Celsius
%		Porcentagem
®		Marca registrada
µm		Micrômetro (s)
M		Mol, Molar
pH		Ponto hidrogeniônico
Kev		10 ³ elétrons-volt

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Valores referentes à avaliação do centro tendíneo bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.....	21
Tabela 2 Valores referentes à avaliação do pericárdio bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.....	22
Tabela 3 Valores referentes à avaliação do peritônio bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.....	23
Tabela 4 Valores referentes à tensão sofrida pelo centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovino, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina durante 30, 60 e 90 dias, média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação.....	24
Tabela 5 Valores referentes ao alongamento apresentado pelo centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovino, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina 98% durante 30, 60 e 90 dias, média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação.....	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Fotografia do instrumento de corte desenvolvido para obtenção dos corpos de prova.....	15
Figura 2 Fotografias dos corpos de prova de centro tendíneo (A) e peritônio (B) bovino, ambos durante a realização dos testes na máquina universal de ensaio de tração.....	15
Figura 3 Representação gráfica dos valores da tensão média e erro padrão dos corpos de prova de centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos ao ensaio mecânico de tração a fresco (dia 0) e conservados em glicerina a 98%, durante 30, 60 e 90 dias.....	24
Figura 4 Representação gráfica dos valores de alongamento médio e erro padrão dos corpos de prova de centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina a 98%, durante 30, 60 e 90 dias	25
Figura 5 Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo bovino a fresco (A, 200X) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B, 100X), verificando sua constituição, mediante a presença de mesotélio (seta), em ambas as margens, revestindo tecido conjuntivo frouxo (CF) com vasos sangüíneos (V), e que se continuam em tecido conjuntivo denso modelado (CD) disposto longitudinalmente, além de tecido adiposo (AD) em posição média com vasos (V). HE.....	27
Figura 6 Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo bovino	

- conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF); tecido conjuntivo denso modelado (CD); tecido adiposo (AD). Notar a diferenciação na organização tecidual (seta vasada), 100X. HE..... 28
- Figura 7** Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino a fresco (A) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B), na qual se observa o mesotélio (seta), tecido conjuntivo frouxo (CF), conjuntivo denso não modelado (DN), com fibras dispostas irregularmente (∇), vasos sangüíneos (V), e núcleos acentuadamente basófilos ($\bullet$), 200X. HE..... 29
- Figura 8** Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF); conjuntivo denso não modelado (DN), com fibras dispostas irregularmente (∇); vasos sangüíneos (V). Notar a diferenciação na organização tecidual (seta vasada), 200X. HE..... 30
- Figura 9** Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino a fresco (A, 100X) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B, 200X), onde se observa tecido conjuntivo denso modelado (CD), com fibras acidófilas e condensadas ($\ddot{A}$), dispostas longitudinalmente, com fibroblastos exibindo núcleos levemente basófilos ($\bullet \bullet$), e mesotélio (seta) apoiado sobre tecido conjuntivo frouxo (CF), compondo a extremidade desta serosa, além de vasos sangüíneos (V). HE..... 31

- Figura 10** Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): tecido conjuntivo denso modelado (CD), com fibras acidófilas e condensadas (Ä), dispostos longitudinalmente; mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF). Notar leve diferenciação na organização (seta vasada), 100X. HE..... 32
- Figura 11** Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo (A), pericárdio (B) e peritônio (C) bovino a fresco, nas quais se observa a diferenciação entre fibras elásticas, evidenciadas pela cor negra (setas) e fibras colágenas em verde (seta vasada), 100X. VH..... 33
- Figura 12** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura do centro tendíneo bovino, em A) material a fresco, evidenciando-se disposição longitudinal das fibras colágenas, 750X; em B) membrana conservada em glicerina durante 60 dias, exibindo fibras colágenas desorganizadas, 750X; em C) corte transversal aos 60 dias, notando-se boa preservação das fibras colágenas (seta), 150X; em D) corte transversal aos 90 dias evidenciando-se retração tecidual (seta vasada), 150X..... 34
- Figura 13** Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de pericárdio bovino, em A) material conservado durante 30 dias, evidenciando-se leve desassociação das fibras colágenas (Ä) e seu desprendimento (seta), 150X; em B) detalhe das fibras colágenas aos 30 dias, exibindo desorganização em sua disposição, 750X; em C) tecido conservado durante 90 dias, notando-se boa preservação

das fibras colágenas (seta) com leve desprendimento na
extremidade do pericárdio fibroso (seta vasada), 150X..... 35

Figura 14 Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura
de peritônio bovino, em A) material conservado por
período de 30 dias em glicerina, notar retração das fibras
colágenas (seta vasada); em B) aos 90 dias de
preservação, evidenciando-se também desassociação
das fibras colágenas (seta), 150X..... 35

PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS E TENSIONOMÉTRICAS COMPARADAS DE CENTRO TENDÍNEO, PERICÁRDIO E PERITÔNIO DE BOVINOS A FRESCO E CONSERVADOS EM GLICERINA

RESUMO – com este trabalho objetivou-se descrever o comportamento do centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos a ensaios mecânicos de tração a fresco e conservados em glicerina a 98% durante 30, 60 e 90 dias, bem como, analisar suas características histológicas, utilizando técnicas de microscopia de luz e ultraestrutural. Utilizou-se para tanto dez bovinos com idade entre 30 e 36 meses, mestiços, machos e fêmeas, coletando-se de cada animal fragmentos dessas membranas. Não se observou diferenças marcantes quanto à integridade estrutural e ultraestrutural dos elementos que constituem tanto as amostras do material a fresco quanto àqueles conservados em glicerina a 98%, que exibiram células mesoteliais e fibras conjuntivas sem alterações intensas. O centro tendíneo e o peritônio não sofreram alteração significativa ($p > 0,05$) para os valores de tensão quando comparados os testes de resistência à tração do material a fresco com os conservados em glicerina. Entretanto, todos os tecidos avaliados exibiram aumento significativo ($p \leq 0,05$) para os valores de alongamento quando conservados em glicerina 98% por até 90 dias. Verificou-se que o pericárdio é a membrana que suporta as maiores tensões, ou seja, maior força de tração por área de secção. Assim, conclui-se que a glicerina é eficaz para conservação de membranas biológicas, além de alterar suas propriedades mecânicas.

Palavras-Chave: Bovinos, Centro tendíneo, Ensaio mecânico, Pericárdio, Peritônio, Histologia.

COMPARED MORPHOLOGICAL AND TENSIOMETRICAL PROPERTIES OF FRESH AND GLYCERIN CONSERVED BOVINES TENDINOUS CENTER, PERICARDIUM AND PERITONEUM

ABSTRACT – with this study, it was objectified to describe the comportment of fresh and 98% glycerin conserved for periods of 30, 60 and 90 days tendinous center, pericardium and peritoneum of bovines submitted to mechanical tests of traction as well as to analyze the histological characteristics, utilizing optical microscopy and ultrastructural techniques. It was utilized ten bovines between 30 and 36 months of age, crossbreeds, males and females, collecting fragments of this membranes in each animal. There was no significant difference as for structural and ultrastructural integrity of the elements that constitutes the samples of fresh and 98% glycerin conserved material, evidencing mesothelial cells and connective tissue without intense alterations. The tendinous center and peritoneum didn't suffered significant modification ($p > 0.05$) in the values of tension when compared the resistance tests to traction in fresh with 98% glycerin conserved membranes. However, all the evaluated tissues showed significant increase ($p \leq 0.05$) for the elongation values when conserved in 98% glycerin for until 90 days. It was observed that pericardium is the one which supports greater tensions. So, it can be concluded, that glycerin is efficient to the conservation of biological membranes besides to modify its mechanical properties.

Keywords: Bovines, Tendinous center, Mechanical tests, Pericardium, Peritoneum, Histology.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de membranas biológicas como material de implante para a reparação de órgãos e tecidos, vem sendo praticada no Brasil desde a década de 1960, e o trabalho pioneiro foi realizado por PIGOSSI (1964), ao utilizar dura-máter canina, conservada em glicerina. O emprego de membranas biológicas deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, baixo custo, preparo simples, esterilização viável, facilidade na estocagem além de pouca ou nenhuma reação tecidual quando utilizada (ALVARENGA, 1992).

Grande parte dos trabalhos envolvendo membranas biológicas, obtidas de diferentes espécies animais, busca avaliar a viabilidade desta estrutura em diversos procedimentos cirúrgicos. Suas funções principais são fornecer arcabouço para a orientação e para o desenvolvimento de novos tecidos, mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e a função do órgão afetado (BATISTA et al. 1996).

Dentre as membranas biológicas mais estudadas destacam-se: centro tendíneo, dura-máter, fáscia lata, pericárdio e peritônio, que possuem como característica principal, constituição quase que exclusivamente de colágeno (ALVARENGA, 1992).

Para que percam a capacidade de rejeição, estas membranas devem permanecer preservadas, por período mínimo de 30 dias, em glicerina (COSTA NETO et al. 1999; DALECK et al. 1992; PIGOSSI, 1964, 1967; PIGOSSI et al. 1971; SARTORI FILHO et al. 1997), embora possam ser conservadas neste mesmo meio, por período de até seis meses ou mais (PIGOSSI, 1967).

A substância de conservação mais utilizada para essas membranas é a glicerina a 98%, mantida em temperatura ambiente, pois apresenta as seguintes vantagens: baixo custo e propriedade anti-séptica (ALVARENGA, 1992; WELLS et al. 2006); capacidade de reduzir a antigenicidade, preservar a textura do tecido e aumentar a resistência à tração, sem alterar o grau de elasticidade (PIGOSSI, 1967); é biologicamente inerte e aprovada pelo FDA na composição de cosméticos e medicamentos de uso tópico (WELLS et al. 2006).

Desde os primeiros estudos realizados sobre a viabilidade do uso de membranas biológicas como agentes reparadores de órgãos e tecidos, poucos foram os trabalhos que enfocaram ensaios biomecânicos dessas membranas, no intuito de conhecer sua resistência à tração, bem como, a capacidade de distensão de suas fibras (BATISTA et al. 1996).

Os estudos biomecânicos têm por objetivo determinar as propriedades mecânicas de um material e dependendo de suas características físicas, pode-se submetê-lo aos ensaios de tração, torção, compressão e flexão (BATISTA et al. 1996).

Assim, com o presente trabalho objetivou-se descrever o comportamento do centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos a ensaios mecânicos de tração a fresco e conservados em glicerina a 98% durante 30, 60 e 90 dias, bem como, analisar suas características histológicas, utilizando técnicas de microscopia de luz e ultraestrutural.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aplicabilidade das Biomembranas

Os tecidos ou membranas biológicas têm sido pesquisados com o objetivo de verificar a eficácia de sua utilização no reparo de alterações anatômicas congênitas e/ou adquiridas, visando propor soluções para afecções que acometam tanto o homem quanto os animais (ALVARENGA, 1992).

Entre as principais causas de comprometimento orgânico animal cita-se: traumatismos, nódulos parasitários, neoplasias e abscessos. Muitas vezes o restabelecimento das funções normais é realizado por meio do tratamento cirúrgico, onde, em virtude do tempo de duração da afecção, pode ocasionar perda tecidual, retração muscular e fibrose, dificultando a aproximação das margens da ferida (ABRAHÃO et al. 1992).

Assim, CARPENTIER (1969) citado por POMERANTZEFF et al. (1997) propôs a designação “biomateriais”, para descrever as válvulas manufaturadas com tecidos biológicos modificados pelo glutaraldeído. As membranas podem ser de natureza orgânica ou inorgânica (PIGOSSI et al. 1971), absorvíveis ou não, de origem sintética ou biológica, apresentando como principal característica a capacidade de se incorporar ao tecido receptor, e aí permanecendo temporária ou permanentemente, sem causar reações que promovam sua rejeição e conseqüente eliminação (ALVARENGA, 1992; BASTOS et al. 2005).

Desse modo, os implantes biológicos podem ser classificados em quatro tipos: autógeno, homogêneo, isógeno e xenógeno, segundo a relação doador-receptor. Por

autógeno, entende-se que o receptor é, ao mesmo tempo, o doador. Em implantes homogêneos, o receptor e o doador são da mesma espécie, porém não compartilham antígenos de histocompatibilidade. Os casos de isogênia ocorrem quando doador e receptor possuem antígenos de histocompatibilidade, já implantes classificados como xenógenos, ocorrem quando o receptor e o doador pertencem a diferentes espécies (ALVARENGA, 1992).

Qualquer enxerto não autógeno deve satisfazer alguns critérios tais como não ser antigênico ou carcinogênico, ser facilmente incorporado pelo hospedeiro e funcionar por toda a vida do receptor. Também deve estimular as propriedades mecânicas do segmento original e ser facilmente armazenado e implantável (VÁMHIDY et al.1990).

A busca por implantes que possuam ao mesmo tempo baixa antigenicidade e alta resistência é constante e membranas biológicas de caninos, bovinos, eqüinos e suínos, preservadas em diferentes meios, são estudadas aproximadamente a quatro décadas (ALVARENGA, 1992; BATISTA et al. 1996; COSTA NETO et al. 1999; DALECK et al. 1987; DALECK et al. 1988; DALECK et al. 1992; INATOMI et al. 1980; MOTA et al. 2002; NOLASCO et al. 2003; PIGOSSI, 1964; REYES, 1993; SARTORI FILHO et al. 1997; VÁMHIDY et al. 1990).

Membranas biológicas provenientes de bovinos têm sido utilizadas em estudos experimentais, apresentando resultados satisfatórios. Assim, em cães, empregou-se dura-máter conservada em glicerina por período maior que seis meses, na reparação da bainha do músculo reto do abdome (INATOMI et al. 1980). Utilizou-se peritônio conservado em glicerina na substituição de retalho diafragmático (DALECK et al. 1988), na reparação de hérnia perineal (DALECK et al. 1992), na tenoplastia do tendão

calcanear comum (COSTA NETO et al. 1999) e na esfínteroplastia do músculo esfíncter anal externo (RODASKI et al. 2000). Além de se empregar pericárdio conservado em glicerina na artroplastia acetábulo-femoral (RODASKI et al. 2002).

Em ratos testou-se a viabilidade do peritônio bovino como alternativa para tela cirúrgica implantada na parede abdominal, visto que ele pode ser captado e submetido à mesma técnica de preparo consagrada para o pericárdio bovino, além de fornecer uma área maior de tecido aproveitável e adaptável às diversas situações da prática cirúrgica (BASTOS et al. 2005).

Embora o pericárdio bovino seja utilizado como prótese biológica, apresenta certa limitação em sua extensão (BASTOS et al. 2005). Entretanto, é amplamente utilizado para confecção de biopróteses valvares humanas, resultando em baixa incidência de tromboembolismo na ausência de anticoagulantes (COSTA et al. 2005; FORTI et al. 2006; POMERANTZEFF et al. 1997).

2.2 Meios de Conservação

Durante muitos séculos vem se procurando o melhor método para conservação de materiais biológicos, seja pelo crescente uso dos transplantes homólogos e xenólogos em cirurgia restauradora, ou por suas vantagens sobre os demais (LEITE et al. 1979).

A preservação dos implantes não pressupõe a manutenção da viabilidade celular e, a eficiência da cirurgia reparadora, geralmente, está associada à reação biológica de reparação e não à sobrevivência dos elementos celulares presentes no implante, uma vez que este funciona como um arcabouço ou suporte temporário à migração de

fibroblastos. Além disso, os agentes conservantes são substâncias dotadas de ação germicida ou germiostática, as quais se destinam a evitar as alterações provenientes de proliferação microbiana, que possam ocorrer em qualquer material conservado (PRISTA et al. 1990).

Como características principais, os meios de preservação utilizados para manter as membranas biológicas devem possuir um alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos, preservar ao máximo a integridade celular, aumentar a resistência à tração e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA, 1992; MOTA et al. 2002). Assim, os métodos de conservação para os diferentes tecidos animais podem ser classificados em duas grandes categorias: os que mantêm a vitalidade celular e os que não mantêm (LEITE et al. 1979). Neste último grupo, encontra-se a glicerina a 98%, que atualmente, é um dos meios mais utilizados, tanto em casos clínicos, quanto em estudos experimentais (COSTA NETO et al. 1999; DALECK et al. 1992).

Uma das principais características da glicerina é a capacidade de desidratação celular (ALVARENGA, 1992; DALECK et al. 1987; PIGOSSI, 1964, 1967) a qual se atribui à sua ação anti-séptica, atuando contra fungos e bactérias gran-negativas e gran-positivas, com exceção para as formas esporuladas (PIGOSSI, 1967). Cabe ressaltar que a desidratação obtida com a glicerina não altera a concentração iônica das células, fator que mantém a integridade celular (PIGOSSI, 1964).

A glicerina também reduz a antigenicidade dos tecidos conservados, dispensando a necessidade de utilização de fármacos imunossupressores durante os períodos trans e pós-operatórios. Após a implantação, os materiais biológicos mantidos

em glicerina atuam como uma estrutura de sustentação temporária e orientam o crescimento do tecido vivo no leito receptor (PIGOSSI, 1964, 1967).

As observações, provenientes dos estudos que vem sendo realizados, ainda não esclareceram suficientemente os aspectos inerentes à reversibilidade da glicerina, ou seja, de seu mecanismo de ação junto aos tecidos. No entanto, sabe-se que esta estabiliza os monômeros de colágeno, mas desestabiliza as fibrilas colágenas precipitadas. Assim, quando um tecido é imerso nesta substância, a água é osmoticamente retirada em proporção que depende da densidade da fibra, da concentração da glicerina e da temperatura. Após a reidratação, as membranas recuperam suas pontes de água e se comportam como tecidos naturais, sugerindo que esse meio não é reativo com a matriz extracelular, sendo um agente químico mecanicamente seguro para a redução da degeneração tecidual (WELLS et al. 2006).

Os tecidos preservados devem ser reidratados antes da realização dos enxertos (ALVARENGA, 1992). O tempo de reidratação pode variar de acordo com a forma, espessura e tamanho do material, podendo chegar a 24 horas. Segundo as indicações de SARTORI FILHO et al. (1997), a hidratação deve ser de pelo menos 15 min para tecidos conservados em glicerina.

Trabalhos foram desenvolvidos em busca de um meio alternativo de conservação que apresentasse características desidratantes, anti-sépticas e anti-imunogênicas semelhantes ou superiores à glicerina. Para isso testaram-se solução hipersaturada de açúcar (MOTA et al. 2002), álcool absoluto, vaselina (ALVARENGA, 1992), glutaraldeído (ALVARENGA, 1992; POMERANTZEFF et al. 1997; RABELO et al. 2004), solução alcoólica de timerosal (1:1000), polivinil pirrolidona a 5% (ALVARENGA, 1992;

MOTA et al. 2002; NOLASCO et al. 2003), além do processo de congelamento (REYES, 1993).

Recentemente, o 1,4 dioxano foi utilizado para preservar pericárdio bovino, resultando no aumento de sua biocompatibilidade e de suas propriedades mecânicas, tais como melhor estabilidade térmica e diminuição na biodegradabilidade. No entanto, as reações cruzadas promovidas pelo dioxano reduziram as propriedades naturais do colágeno, diminuíram a resposta imune, a toxicidade, assim como a habilidade de promover a ligação e o crescimento celular (FORTI et al. 2006).

DALECK et al. (1988), ao analisarem histologicamente o tecido proveniente de implantes de peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias, observaram semelhança às amostras do peritônio a fresco. Somente algumas fibras apareceram mais acidófilas, retraídas e com núcleos condensados. Também foi observado por DALECK et al. (1992), que o peritônio bovino, sob as mesmas condições de conservação exibia, após 180 dias, células mesoteliais e fibras conjuntivas semelhantes ao material processado a fresco. No entanto, apresentavam células mesoteliais com núcleos ligeiramente retraídos e mais basófilos em relação ao peritônio fresco.

MOTA et al. (2002) analisaram a ultraestrutura da túnica muscular do intestino delgado de cães preservados em diferentes meios (solução supersaturada de açúcar a 300%, glicerina a 98%, polivinil pirrolidona a 5% e solução alcoólica de timerosal 1:1000). Os autores concluíram que nenhuma das soluções estudadas foi capaz de manter a integridade celular; porém, dos meios avaliados, tanto a solução supersaturada de açúcar a 300% quanto a glicerina a 98%, foram as que melhor apresentaram resultados.

2.3 Ensaios Mecânicos

A mensuração da resistência do material implantado em animais de laboratório avalia a capacidade desses implantes em suportar tensão caso venham a ser utilizados clinicamente (BASTOS et al. 2005).

Experimentos têm sido realizados com intuito de se testar a resistência de materiais implantados, e esta avaliação consiste na aplicação de ensaios uniaxiais como pressão de explosão, força de ruptura à tração e tensão de ruptura. Estes modelos analisam um ou dois atributos no momento crítico de ruptura e, apesar de serem muito empregados, os resultados obtidos por meio desses testes biomecânicos representam, apenas parcialmente, o comportamento do tecido biológico sob imposição de uma força externa e variável com o tempo (WU et al. 2004).

São raros os estudos que avaliaram a resistência dessas membranas. PIGOSSI (1964) analisou a resistência à tração e o alongamento, até a ruptura, da dura-máter canina conservada em glicerina, constatando aumento da resistência à tração, sem alteração no grau de elasticidade.

ABRAHÃO et al. (1992) analisaram a influência da glicerina nas propriedades mecânicas do peritônio bovino. As dimensões dos corpos de prova foram assim padronizadas: largura de 20 mm; comprimento de 125 mm; espessura média de 0,4 mm; área de secção de 8 mm². A velocidade da carga foi de 6 mm/min, com a aplicação de pré-carga de 5 N. Os exemplares foram submetidos aos ensaios sem que fossem reidratados. Segundo estes autores, o aumento do tempo de conservação em glicerina promove a diminuição da rigidez do material, aumentando sua elasticidade.

REYES (1993) realizou testes físicos comparativos entre membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco. Conclui que o pericárdio eqüino, conservado em glicerina a 98% e à temperatura ambiente, por 30 ou 40 dias, apresentava aumento significativo para os valores dos alongamentos até a ruptura, ao comparar estes resultados com as preparações não preservadas. Os mesmos achados foram verificados na fâscia lata de eqüino conservada em glicerina a 98% e congeladas ($- 16^{\circ} \text{C}$), durante o período de 30 e 40 dias.

BATISTA et al. (1996), ao compararem a resistência à tração, entre peritônio canino, bovino, eqüino e suíno a fresco e conservados em glicerina a 98%, padronizaram as dimensões dos corpos de prova em 6 mm para largura e 50 mm para comprimento. Quando analisados os alongamentos do material a fresco em função das cargas aplicadas, observaram comportamento heterogêneo e o ponto de ruptura das membranas diferiu entre as espécies, demonstrando ser o peritônio bovino o mais resistente entre os espécimes analisados. Também foi constatada alteração da resistência, das membranas conservadas, durante período de até 60 dias.

RABELO et al. (2004) testaram a resistência à tração e o alongamento até a ruptura do centro tendíneo bovino a fresco, conservado em glicerina a 98% e em glutaraldeído a 4%, por 30 dias. Os autores encontraram os seguintes valores médios para a força máxima de tração das amostras: a fresco ($4,61 \pm 0,97 \text{ N}$), em glicerina ($4,28 \pm 0,79 \text{ N}$) e em glutaraldeído ($5,58 \pm 1,25 \text{ N}$), indicando que o material conservado em glutaraldeído apresenta incremento significativo em sua resistência quando comparado ao material preservado em glicerina a 98%.

COSTA et al. (2005) utilizaram amostras de pericárdio bovino convencional com parâmetros de aprovação para confecção de bioprótese (grupo 1) e pericárdio bovino descelularizado (grupo 2). Os corpos de prova foram padronizados em 6 x 20 mm. Não observaram diferenças significativas, entre os grupos, quanto às variáveis espessura e alongamento ($20,0 \pm 5\%$ para o grupo 1 e $22,0 \pm 7\%$ para o grupo 2). Entretanto, as amostras de pericárdio convencional apresentaram os seguintes valores médios: $3,0 \pm 0,6 \text{ Kg/mm}^2$ para tensão de ruptura e $28 \pm 6 \text{ N}$ para o índice de tenacidade (energia necessária para romper o tecido), valores estes, significativamente maiores, do que àqueles observados para o pericárdio descelularizado ($1,0 \pm 0,3 \text{ Kg/mm}^2$ e $10 \pm 6 \text{ N}$).

FORTI et al. (2006) avaliaram as propriedades mecânicas do pericárdio bovino a fresco. Os corpos de prova foram padronizados em 6 mm para a largura e 30 mm para o comprimento, espessura média de $0,41 \pm 0,04 \text{ mm}$, sendo submetidos à velocidade de 50 mm/min. Assim, verificaram média de $0,84 \pm 0,21 \text{ Kg/mm}^2$, para força de tensão e de $23,52 \text{ mm} \pm 1,7\%$, para o alongamento.

NOORTH et al. (1981) citados por WELLS et al. (2006) constataram que a propriedade mecânica da dura-máter humana não se modificou após sua imersão em glicerina e, subsequente reidratação.

Independentemente do método aplicado, todos os testes são passíveis de erros. Sendo assim, uma das características primordiais durante o desenvolvimento de um modelo experimental é tentar minimizar as variáveis que possam interferir na obtenção de resultados mais precisos e completos (WU et al. 2004).

A unidade de expressão da resistência tênsil é variável na literatura biomédica. A forma de expressão mais fidedigna é o valor da força de carga aplicada sobre um valor

de área. Contudo, para que esta unidade expresse a real força tênsil, há necessidade do estabelecimento das seguintes condições: o formato dos corpos de prova deve direcionar o centro da força aplicada e, sua área, neste centro, deve ser conhecida e/ou padronizada (BASTOS et al. 2005).

2.4 Anatomia (s) Macro e Microscópica

Descrições detalhadas desses tecidos em livros, tratados ou atlas de anatomia e histologia não são comuns. Entretanto, estes são considerados membranas serosas, formadas por uma camada de mesotélio (epitélio simples pavimentoso) com tecido conjuntivo frouxo associado. Elas revestem as cavidades celômicas e são umedecidas pelos fluidos contidos nestas cavidades (FRANDSON et al. 2005; KÖNIG & LIEBICH, 2004).

A túnica serosa se apóia sobre uma camada de tecido conjuntivo frouxo, a tela subserosa. Esta inclui vasos sangüíneos e linfáticos, bem como tecido adiposo. Uma fina rede subepitelial de plexos nervosos sensoriais contribui, decididamente, na percepção de estímulos táteis, mecânicos, térmicos e químicos (KÖNIG & LIEBICH, 2004).

Quanto à localização, o pericárdio é encontrado na cavidade torácica revestindo o coração, e o peritônio na cavidade abdominal, revestindo sua parede, bem como grande parte dos órgãos nela alojados. Entre essas duas cavidades e separando-as, está o músculo diafragma, constituído por músculo estriado esquelético (periférico) e uma porção tendínea (central), denominada de centro tendíneo (FRANDSON et al. 2005; KÖNIG & LIEBICH, 2004).

O pericárdio é formado por duas camadas distintas. A lâmina interna está intimamente aderida à superfície externa do coração, sendo denominada lâmina visceral do pericárdio seroso ou epicárdio. A lâmina externa ou lâmina parietal do pericárdio seroso é contínua com a lâmina visceral na base do coração e é reforçada por uma lâmina fibrosa superficial, o pericárdio fibroso, que é revestido por uma lâmina de pleura mediastínica, a pleura pericárdica, formando juntos o saco pericárdico (FRANDSON et al. 2005; KÖNIG & LIEBICH, 2004).

O peritônio, assim como o pericárdio, diferencia-se em visceral e parietal, o primeiro relaciona-se diretamente com os órgãos e o segundo, reveste a parede da cavidade abdominal. Os dois são contínuos por meio de reflexões da serosa que fixam os órgãos às paredes da cavidade abdominal, os mesos e os ligamentos (FRANDSON et al. 2005).

O peritônio é formado por uma camada superficial de mesotélio e uma camada mais profunda de tecido conjuntivo frouxo, que contém fibras elásticas e colágenas, células adiposas, células reticulares e macrófagos (CRUZ, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se dez bovinos com idade entre 30 e 36 meses, mestiços, machos e fêmeas, obtendo-se, de cada um, três membranas, quais sejam, centro tendíneo, pericárdio e peritônio, colhidos após abate, no Frigorífico Barra Mansa Comércio de Carnes e Derivados Ltda., Sertãozinho - SP.

A colheita foi realizada retirando-se fragmentos de cada membrana, sempre de uma mesma região anatômica na carcaça de cada animal, procurando-se manter a homogeneidade entre as amostras.

As amostras foram devidamente lavadas em água corrente para retirada de resíduos e acondicionadas em recipientes plásticos contendo solução fisiológica de NaCl 0,9%.

3.1 Ensaio Mecânico de Tração

Realizado no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. O material foi novamente lavado e imerso em solução fisiológica de NaCl 0,9%, retirando-se toda a gordura e aderências. Em seguida colocado sob guilhotina (Figura 1), obtendo-se quatro corpos de prova em série. A guilhotina foi desenvolvida tentando-se obter amostras padronizadas nas dimensões de 20 mm de largura por 200 mm de comprimento.

Após o corte do material, cada corpo de prova foi devidamente enumerado para sua correta identificação e comparação.

Dez corpos de prova a fresco de cada membrana foram avaliados (Figura 2A e B). Os demais foram acondicionados em recipientes contendo glicerina a 98% numa

proporção de 20:1 (glicerina/membrana), mantidos em temperatura ambiente e identificados (nome do material, data de colheita e meio de preservação).

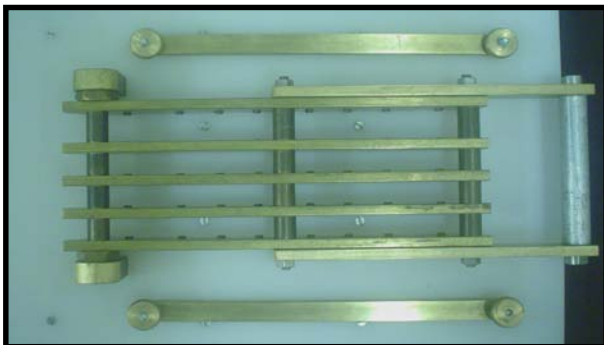


Figura 1. Fotografia do instrumento de corte desenvolvido para obtenção dos corpos de prova.

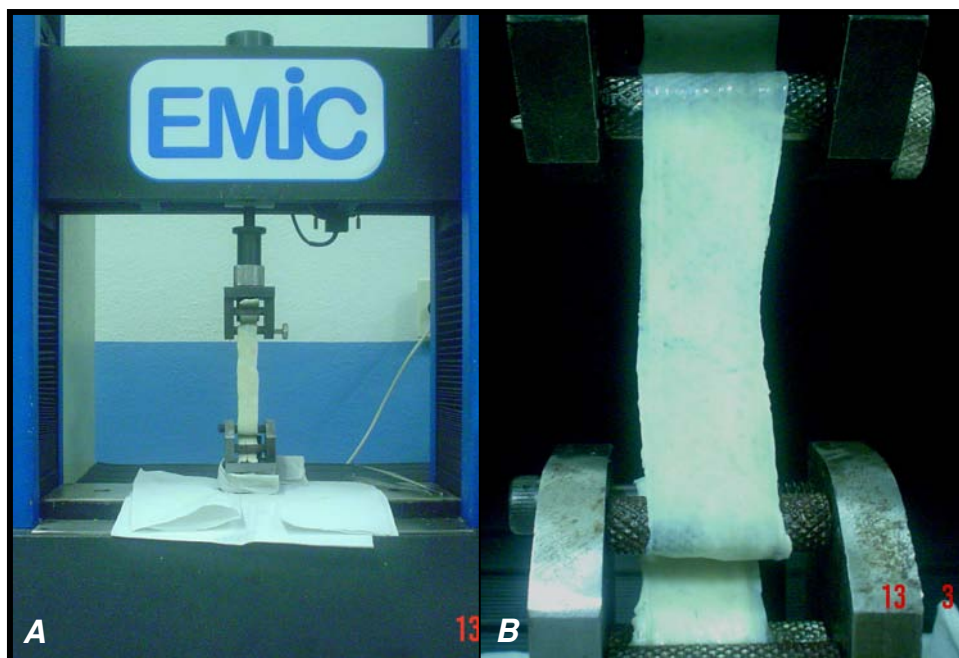


Figura 2. Fotografias dos corpos de prova de centro tendíneo (A) e peritônio (B) bovino a fresco, durante a realização dos testes na máquina universal de ensaio de tração.

Os ensaios de tração, subseqüentes ao do material a fresco, foram realizados nos dias 30, 60 e 90 pós-colheita, totalizando 120 testes, 40 avaliações para cada membrana.

Anteriormente a realização dos ensaios mecânicos, os corpos de prova foram reidratados em solução fisiológica de NaCl 0,9%, por pelo menos 20 min, não

excedendo os 90 min, para representar as condições que são submetidos nos períodos pré e trans-operatório.

Os testes foram realizados em máquina universal de ensaio EMIC[®] (modelo DL 10000). A máquina possui interface direta a um microcomputador, com o *software Tesc[®]*, capaz de gerar gráficos da carga *versus* alongamento para cada ensaio.

Para fixação dos corpos de prova na máquina, foi utilizado acessório que contém ranhuras em sua superfície, as quais auxiliam nesse processo, mediante compressão realizada pelo ajuste de um parafuso, evitando o escorregamento do material durante o ensaio.

No momento dos ensaios, os corpos de prova foram acoplados à máquina e, conforme metodologia estabelecida pelo Laboratório de Bioengenharia, ou seja, foi aplicada pré-carga de 200 gramas (2 N) durante 30 segundos, com intuito de promover acomodação do sistema, evitando-se possíveis folgas no conjunto máquina, acessório e modelo ensaiado. Todo material foi mensurado com paquímetro Mytutoyo[®], anteriormente à realização dos testes, aferindo-se suas medidas de largura e espessura.

Após a pré-carga o ensaio prosseguiu, em média, por 5 min, com velocidade pré-estabelecida em 10 mm/min. A carga aplicada foi registrada pelo *software* em intervalos regulares de alongamento até o momento da ruptura das membranas.

A partir dos gráficos carga “*versus*” alongamento de cada ensaio, foram obtidas e analisadas as seguintes propriedades mecânicas: força máxima, tensão máxima e alongamento.

A força máxima é definida como aquela suportada antes do início da ruptura completa de um tecido ou parede, sem considerar suas dimensões, calculadas em N. A tensão é medida em termos de quantidade de força suportada por unidade de área de secção, ou seja, é dependente das dimensões do tecido, sendo calculada em N/mm^2 . Ela permite comparações mais adequadas entre corpos de prova de diferentes membranas. Assim, faz-se necessário o cálculo da área de secção transversal inicial da estrutura avaliada, e qualquer que seja a área inicial, o valor da tensão não se altera. O alongamento é calculado em mm e é dado pela distensão do material registrado no ponto de aplicação da carga máxima (SCHAUM & VAN DER MERWE, 1973).

3.2 Estudo Histológico

3.2.1 Microscopia de Luz

Em seguida à lavagem do material em água corrente para retirada de resíduos, ainda no frigorífico, foram coletados fragmentos de cada membrana, fixados em solução de Bouin, sendo encaminhados ao Setor de Técnicas Morfológicas do Laboratório de Anatomia da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para processamento e análise.

Das amostras imersas em recipientes contendo glicerina a 98% também foram retirados fragmentos antes da realização dos ensaios mecânicos, os quais foram processados para o estudo histológico aos 30, 60 e 90 dias pós-coleta.

Os tecidos conservados em glicerina a 98% foram reidratados em solução fisiológica de NaCl 0,9% antes de entrarem na rotina histológica por pelo menos 20 min e fixados em solução de Bouin.

O material permaneceu em solução de Bouin por 24 horas. Após esse período, este foi lavado em álcool a 70% para retirada do excesso de fixador. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação, em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), durante quatro horas. A seguir, realizou-se a diafanização com xilol, por aproximadamente 90 min, e após este procedimento, embebeu-se o material em Histosec[®] por 90 min, na temperatura entre 60 e 70°C para o procedimento da inclusão.

A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 5 µm com auxílio de navalhas descartáveis, os quais foram submetidos à coloração por hematoxilina-eosina (HE) além do Verhoeff (VH), de acordo com as técnicas descritas por FREITAS NETO et al. (2003). Algumas preparações foram fotodocumentadas em microscópio de luz BX-50 (Olympus[®]).

3.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

Seguindo metodologia estabelecida pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, as amostras colhidas dos corpos de prova foram fixadas em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) por 48 horas, lavadas em tampão fosfato, tratadas com ósmio a 1%, lavadas novamente em tampão fosfato, desidratadas em série crescente de álcoois (30 a 100%), durante pelo menos 20 min cada etapa, secas ao ponto crítico no aparelho EMS 850[®], metalizadas com átomos de ouro em um aparelho DESK II[®] (DETON VACUUM) e examinadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL[®] (JSM 5410), operando com feixe de elétrons de 15 keV.

3.3 Estatística

Os dados foram agrupados e descritos pela estatística descritiva por meio de valores médios, erro padrão e desvio padrão. Os grupos de centro tendíneo, pericárdio e peritônio foram comparados pela análise de variância e as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey, com nível de significância igual a 0,05, adotado em todas as comparações (TRIOLA, 2005).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios Mecânicos de Tração

As rupturas dos corpos de prova ocorreram, quase que na sua totalidade, em região central, embora em alguns exemplares de centro tendíneo, estas ocorreram junto à sua intersecção com a pleura mediastínica, deslocando o ponto de ruptura para as extremidades do segmento avaliado.

Analisando-se o gráfico referente à força “*versus*” alongamento, obtidos por meio do *software Tesc®*, foi possível determinar algumas propriedades mecânicas dos corpos de prova estudados. Essas propriedades incluem mensurações da força de tração, tensão e alongamento, que foram agrupadas e expressas nas Tabelas de 1 a 5.

Das observações referentes aos testes físicos realizados com o centro tendíneo (Tabela 1), constatou-se que tanto nas amostras a fresco ($6,5 \text{ N/mm}^2$) quanto naquelas conservadas em glicerina a 98%, durante 30 ($6,1 \text{ N/mm}^2$), 60 ($5,7 \text{ N/mm}^2$) e 90 dias ($6,0 \text{ N/mm}^2$), não houve alteração significativa na tensão ($p>0,05$). Entretanto, no material conservado em glicerina a 98% por 30 (33,22 mm), 60 (34,48 mm) e 90 dias (37,00 mm), verificou-se aumento significativo para os valores de alongamento ($p\leq 0,05$), quando comparou-se os dados com o do material a fresco (26,38 mm).

Verificou-se discreto aumento da força máxima aplicada nos grupos conservados em glicerina, durante 30 (220,80 N) e 90 dias (203,91 N) em relação aos grupos a fresco (191,9 N) e conservado por 60 dias (181,65 N), valores estes, não significativos ($p>0,05$).

Tabela 1. Valores referentes à avaliação do centro tendíneo bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

<i>Dias</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Largura (mm)</i>	<i>Área (mm²)</i>	<i>Força Máxima (N)</i>	<i>Tensão (N/mm²)</i>	<i>Alongamento (mm)</i>
0	1,65 $\pm$ 0,38 ^a	18,64 $\pm$ 0,55 ^a	30,77 $\pm$ 7,44 ^a	191,94 $\pm$ 45,46 ^a	6,56 $\pm$ 2,24 ^a	26,38 $\pm$ 4,11 ^a
30	2,28 $\pm$ 0,74 ^b	18,1 $\pm$ 1,51 ^a	41,34 $\pm$ 14,2 ^a	220,8 $\pm$ 71,87 ^a	6,14 $\pm$ 3,17 ^a	33,22 $\pm$ 6,93 ^b
60	1,71 $\pm$ 0,30 ^a	18,9 $\pm$ 1,13 ^{a,b}	32,24 $\pm$ 5,98 ^a	181,65 $\pm$ 52,83 ^a	5,73 $\pm$ 1,73 ^a	34,48 $\pm$ 7,37 ^b
90	1,69 $\pm$ 0,42 ^a	19,35 $\pm$ 0,81 ^b	32,49 $\pm$ 7,83 ^a	203,92 $\pm$ 86,55 ^a	6,04 $\pm$ 1,83 ^a	36,99 $\pm$ 8,86 ^b

Valores na mesma coluna seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Mediante os valores para a tensão, obtidos da análise das amostras de pericárdio (Tabela 2), observou-se que tanto no material a fresco (10,15 N/mm²), quanto naquele conservado em glicerina a 98%, durante 30 (14,31 N/mm²) e 60 dias (12,95 N/mm²) não houve alteração significativa ($p > 0,05$), entretanto, os valores obtidos sobre os espécimes a fresco diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) daqueles observados sobre os preservados por 90 dias (16,55 N/mm²).

Quanto ao alongamento, os valores referentes ao material a fresco (16,43 mm) e ao conservado em glicerina a 98% por 30 dias (17,65 mm) foram significativamente ($p \leq 0,05$), inferiores ao preservado por período de 60 (19,69 mm) e 90 dias (20,78 mm). Verificou-se leve tendência à diminuição da força máxima aplicada nos grupos conservados em glicerina a 98% quando comparado ao valor encontrado para o material a fresco.

Tabela 2. Valores referentes à avaliação do pericárdio bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

<i>Dias</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Largura (mm)</i>	<i>Área (mm²)</i>	<i>Força Máxima (N)</i>	<i>Tensão (N/mm²)</i>	<i>Alongamento (mm)</i>
0	0,72 $\pm$ 0,08 ^a	17,65 $\pm$ 0,39 ^a	12,68 $\pm$ 1,44 ^a	123,85 $\pm$ 30,42 ^a	10,15 $\pm$ 4,14 ^a	16,43 $\pm$ 1,33 ^a
30	0,52 $\pm$ 0,10 ^b	17,3 $\pm$ 1,30 ^a	8,99 $\pm$ 1,90 ^b	124,15 $\pm$ 33,86 ^a	14,31 $\pm$ 4,80 ^{ab}	17,65 $\pm$ 1,78 ^a
60	0,52 $\pm$ 0,11 ^b	17,82 $\pm$ 0,94 ^a	9,25 $\pm$ 1,97 ^b	113,83 $\pm$ 30,42 ^a	12,95 $\pm$ 4,75 ^{ab}	19,69 $\pm$ 2,13 ^b
90	0,4 $\pm$ 0,08 ^c	17,72 $\pm$ 1,05 ^a	7,07 $\pm$ 1,39 ^c	113,5 $\pm$ 34,66 ^a	16,55 $\pm$ 5,76 ^b	20,78 $\pm$ 2,75 ^b

Valores na mesma coluna seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

No atinente a avaliação dos valores referentes as amostras de peritônio testadas (Tabela 3), observou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a tensão do material avaliado, a fresco (3,73 N/mm²), e preservado em glicerina a 98%, nos períodos de 30 (5,61 N/mm²), 60 (4,21 N/mm²) e 90 dias (4,93 N/mm²).

Com relação ao alongamento, notou-se tendência de aumento nos valores relativos aos materiais conservados em glicerina, verificando-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores das amostras a fresco (18,43 mm) e os das preservadas por período de 30 (25,03 mm) e 60 dias (26,49 mm). Entretanto, não se observou diferença quanto aos valores daquelas acondicionadas por 90 dias (24,3 mm), indicando que a glicerina aumenta a elasticidade desta membrana. Comparando-se a força máxima aplicada ao peritônio, evidenciou-se discreto aumento nos valores para o material conservado em glicerina a 98%, porém estes não eram significativos ($p > 0,05$).

Tabela 3. Valores referentes à avaliação do peritônio bovino, submetido ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservado em glicerina 98%, nos períodos de 30, 60 e 90 dias, expressos pela média $\pm$ desvio padrão.

<i>Dias</i>	<i>Espessura (mm)</i>	<i>Largura (mm)</i>	<i>Área (mm²)</i>	<i>Força Máxima (N)</i>	<i>Tensão (N/mm²)</i>	<i>Alongamento (mm)</i>
0	0,61 $\pm$ 0,16 ^a	17,71 $\pm$ 0,91 ^a	10,74 $\pm$ 2,9 ^a	38,17 $\pm$ 12,07 ^a	3,73 $\pm$ 1,24 ^a	18,43 $\pm$ 3,66 ^a
30	0,49 $\pm$ 0,24 ^{a,b}	19,27 $\pm$ 1,19 ^b	9,53 $\pm$ 5,04 ^a	44,94 $\pm$ 13,30 ^a	5,61 $\pm$ 3,10 ^a	25,03 $\pm$ 4,90 ^b
60	0,53 $\pm$ 0,13 ^{a,b}	19,73 $\pm$ 1,39 ^b	10,5 $\pm$ 3,17 ^a	41,95 $\pm$ 6,35 ^a	4,21 $\pm$ 1,06 ^a	26,49 $\pm$ 6,26 ^b
90	0,46 $\pm$ 0,07 ^b	20,22 $\pm$ 1,08 ^b	9,27 $\pm$ 1,25 ^a	44,68 $\pm$ 12,17 ^a	4,93 $\pm$ 1,54 ^a	24,3 $\pm$ 8,86 ^{a,b}

Valores na mesma coluna seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

No estudo comparativo das membranas, constatou-se que o pericárdio, tanto a fresco quanto conservado em glicerina, suporta as maiores tensões, independentemente do período avaliado. Nas comparações realizadas entre os valores observados para o centro tendíneo e o peritônio, não houve diferença significativa para os dias 30 e 60. No entanto, o centro tendíneo se apresentou mais resistente quando avaliado a fresco e conservado por 90 dias (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4. Valores referentes à tensão sofrida pelo centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovino, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina 98% durante 30, 60 e 90 dias, média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação.

<i>Dias</i>	<i>Tensão (N/mm²)</i>					
	<i>Centro Tendíneo</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Pericárdio</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Peritônio</i>	<i>CV (%)</i>
0	6,56 $\pm$ 2,24 ^a	0,34	10,15 $\pm$ 4,14 ^b	0,41	3,73 $\pm$ 1,24 ^c	0,33
30	6,14 $\pm$ 3,17 ^a	0,52	14,31 $\pm$ 4,80 ^b	0,34	5,61 $\pm$ 3,10 ^a	0,55
60	5,73 $\pm$ 1,73 ^a	0,30	12,95 $\pm$ 4,75 ^b	0,37	4,21 $\pm$ 1,06 ^c	0,25
90	6,04 $\pm$ 1,83 ^a	0,30	16,55 $\pm$ 5,76 ^b	0,35	4,93 $\pm$ 1,54 ^a	0,31

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

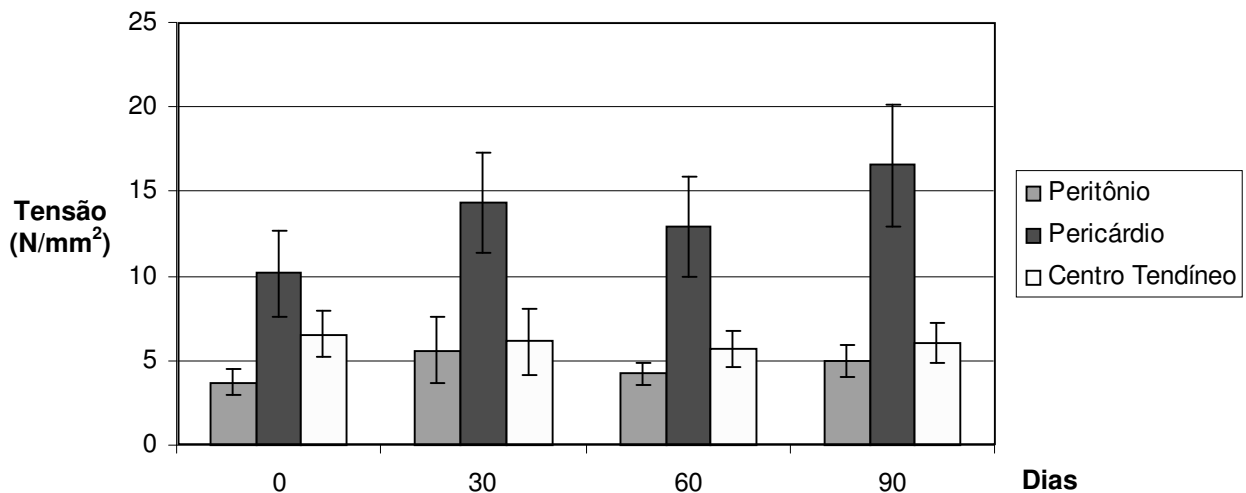


Figura 3. Representação gráfica dos valores da tensão média e erro padrão dos corpos de prova de centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos ao ensaio mecânico de tração a fresco (dia 0) e conservados em glicerina a 98%, durante 30, 60 e 90 dias.

Quando confrontados os valores referentes aos alongamentos verificados nos tecidos em estudo, evidenciou-se que o centro tendíneo, diferentemente das

observações atinentes à tensão, apresentava-se como o material mais elástico, independentemente do período avaliado, seguido pelo peritônio e pericárdio (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5. Valores referentes ao alongamento apresentado pelo centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovino, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina 98% durante 30, 60 e 90 dias, média $\pm$ desvio padrão e coeficiente de variação.

<i>Dias</i>	<i>Alongamento (mm)</i>					
	<i>Centro Tendíneo</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Pericárdio</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Peritônio</i>	<i>CV (%)</i>
0	26,38 $\pm$ 4,11 ^a	0,16	16,43 $\pm$ 1,33 ^b	0,08	18,43 $\pm$ 3,66 ^b	0,20
30	33,22 $\pm$ 6,93 ^a	0,21	17,65 $\pm$ 1,78 ^b	0,10	25,03 $\pm$ 4,90 ^c	0,20
60	34,48 $\pm$ 7,37 ^a	0,21	19,69 $\pm$ 2,13 ^b	0,11	26,49 $\pm$ 6,26 ^c	0,24
90	36,99 $\pm$ 8,86 ^a	0,24	20,78 $\pm$ 2,75 ^b	0,13	24,3 $\pm$ 8,86 ^b	0,36

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

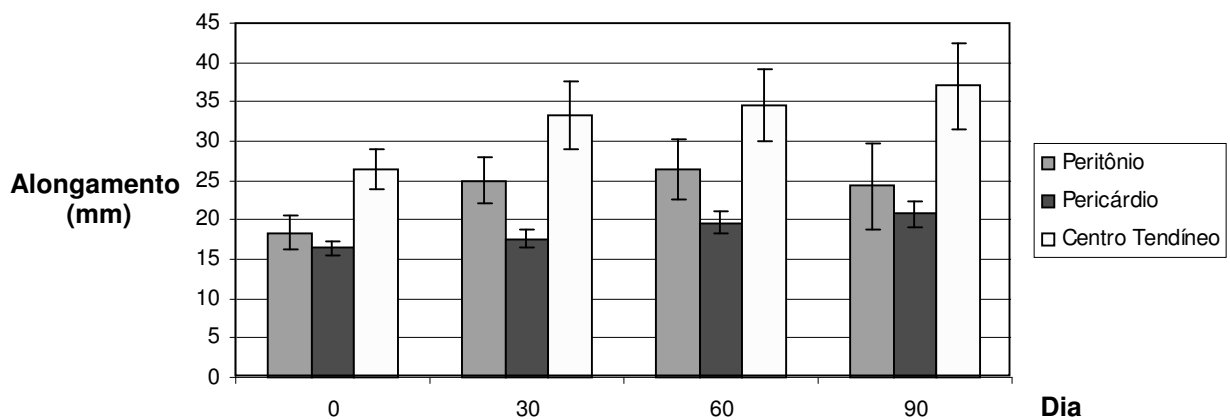


Figura 4. Representação gráfica dos valores de alongamento médio e erro padrão dos corpos de prova de centro tendíneo, pericárdio e peritônio bovinos, submetidos ao ensaio mecânico de tração, a fresco (dia 0) e conservados em glicerina a 98%, durante 30, 60 e 90 dias.

4.2 Microscopia

Constatou-se para todas as membranas analisadas, tanto nas amostras a fresco, quanto nas conservadas em glicerina a 98%, nos dias 30, 60 e 90, a mesma constituição estrutural. No material conservado em glicerina, foram evidenciadas algumas alterações referentes à sua menor afinidade para a coloração à eosina, e maior para a hematoxilina, além da ocorrência de espaçamento entre as fibras do colágeno tecidual.

As amostras de centro tendíneo bovino, a fresco, apresentaram o seguinte arranjo: mesotélio revestindo uma camada de tecido conjuntivo frouxo, na qual se observou presença de vasos pouco calibrosos. Em seqüência constatou-se tecido conjuntivo denso modelado, cujas fibras, dispunham-se longitudinalmente, mostrando-se acentuadamente acidófilas com muitos núcleos basófilos. Sua porção média constituía-se de tecido adiposo contendo vasos sangüíneos mais calibrosos em relação aos já descritos. Em seguida a esta camada verificava-se novamente a ocorrência de tecido conjuntivo denso, tecido conjuntivo frouxo e mesotélio. Esta última camada caracterizava a presença de dupla serosa, ou seja, em uma face pleura parietal e, na outra, peritônio parietal (Figura 5A).

As amostras de centro tendíneo conservadas em glicerina a 98% exibiam uma desorganização tecidual mais acentuada aos 60 dias, e em todos os períodos notou-se menor afinidade para a coloração à eosina (Figuras 5B, 6A e 6B).

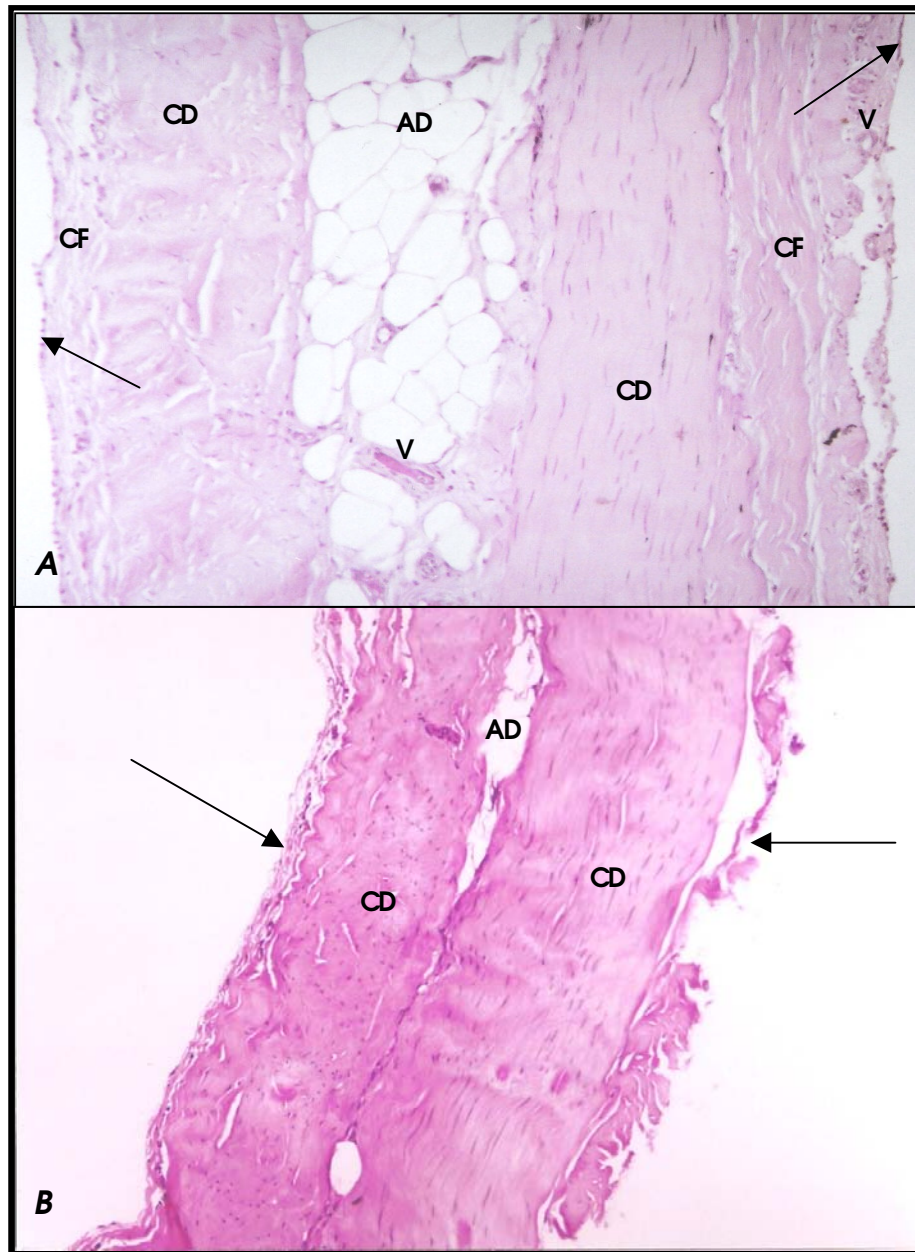


Figura 5. Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo bovino a fresco (A, 200X) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B, 100X), verificando sua constituição, mediante a presença de mesotélio (seta), em ambas as margens, revestindo tecido conjuntivo frouxo (CF) com vasos sangüíneos (V), e que se continuam em tecido conjuntivo denso modelado (CD) disposto longitudinalmente, além de tecido adiposo (AD) em posição média com vasos (V). HE.

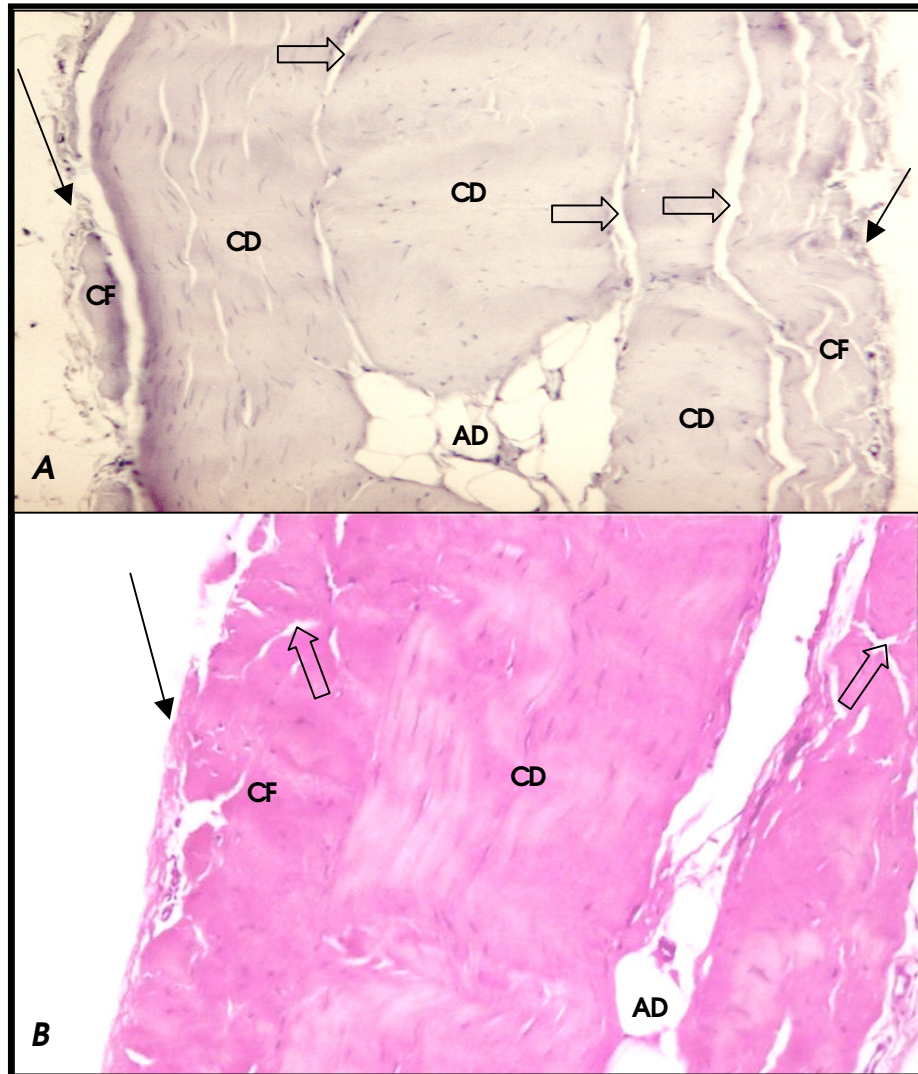


Figura 6. Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo bovino conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF); tecido conjuntivo denso modelado (CD); tecido adiposo (AD). Notar a diferenciação na organização tecidual (seta vasada), 100X. HE.

Na avaliação do pericárdio a fresco constatou-se a presença de fina camada de células epiteliais (mesotélio) repousando sobre uma delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, a qual mostrava fibras pouco acidófilas dispostas irregularmente, bem condensadas, com núcleos acentuadamente basófilos, seguido por tecido conjuntivo denso não modelado (Figura 7A).

No atinente às amostras de pericárdio conservadas em glicerina a 98%, observou-se uma desorganização tecidual mais acentuada naquelas de 60 e 90 dias, e em todo o material conservado, independente do período avaliado, notou-se menor afinidade para a coloração à eosina (Figuras 7B, 8A e 8B).

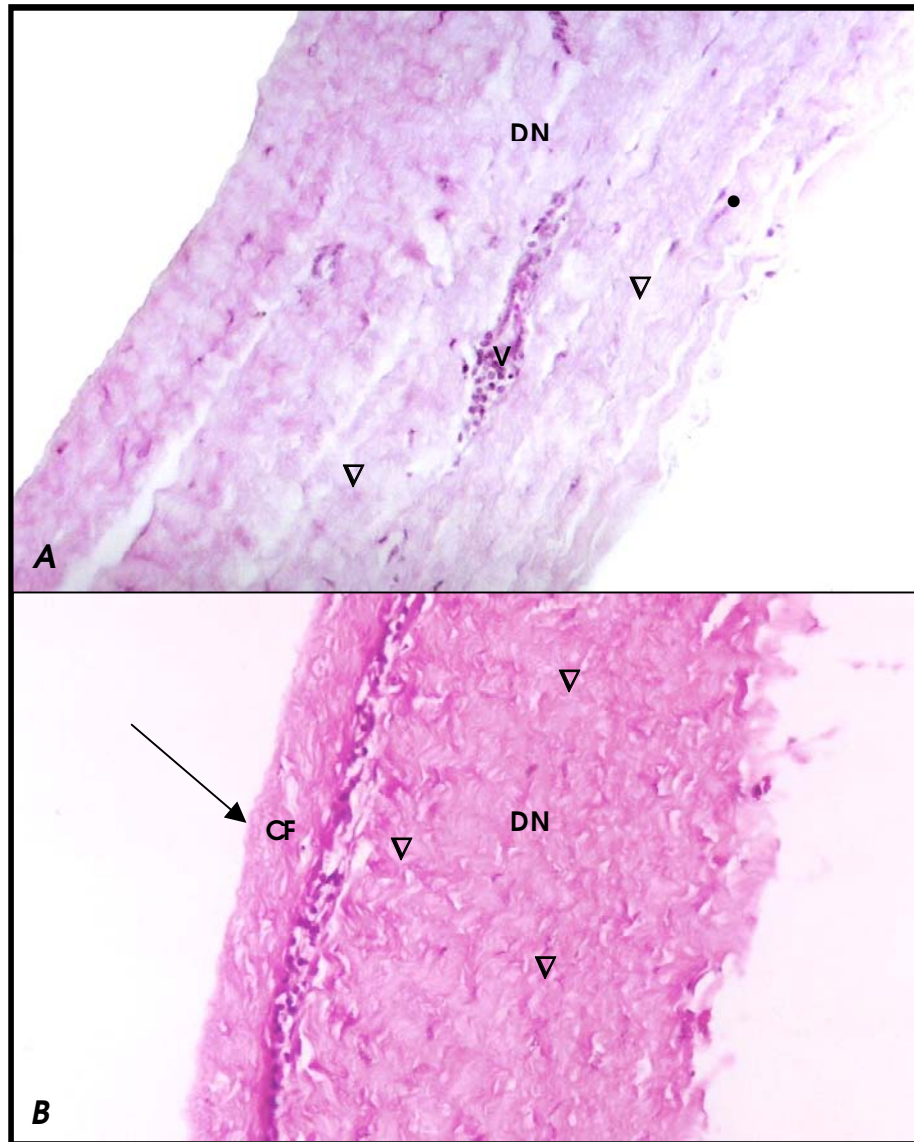


Figura 7. Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino a fresco (A) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B), na qual se observa o mesotélio (seta), tecido conjuntivo frouxo (CF), conjuntivo denso não modelado (DN), com fibras dispostas irregularmente (∇), vasos sanguíneos (V), e núcleos acentuadamente basófilos (•), 200X. HE.

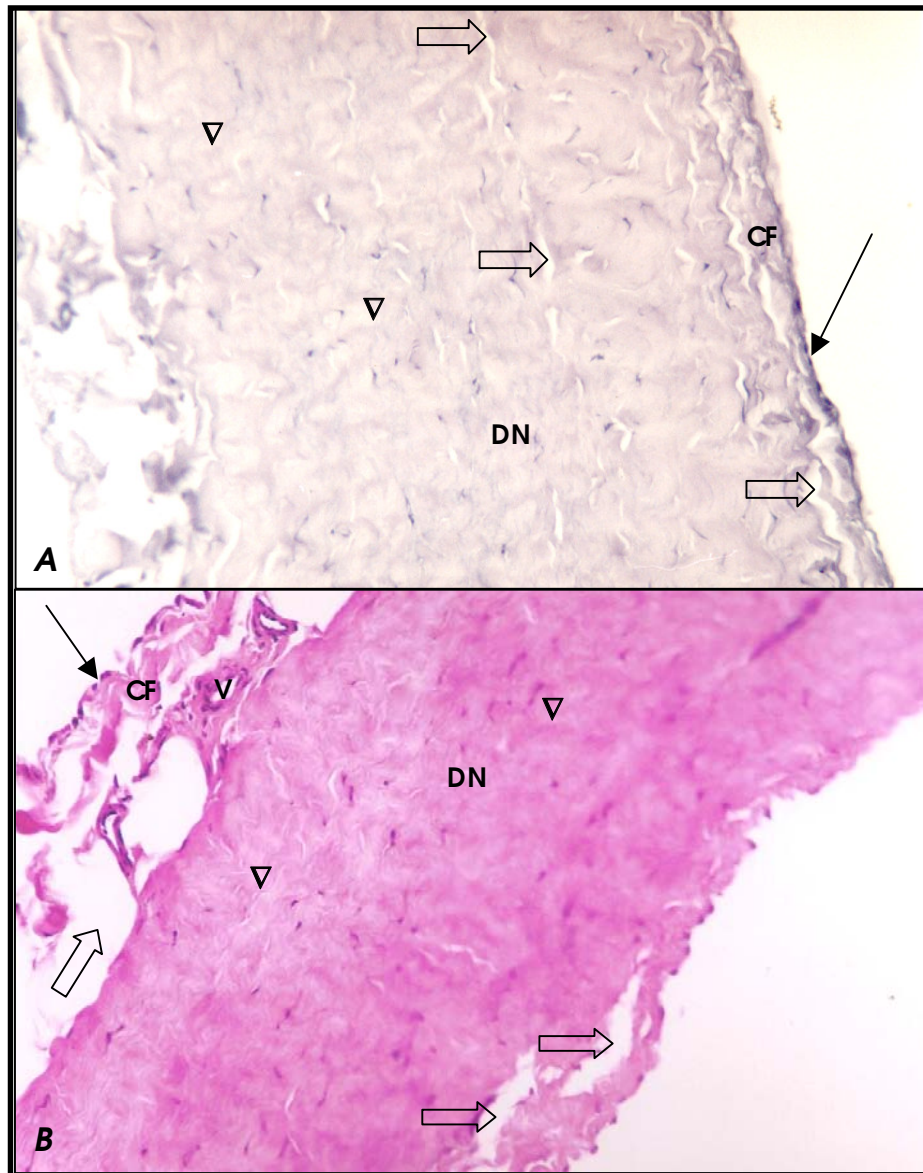


Figura 8. Fotomicrografias de amostras de pericárdio bovino conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF); conjuntivo denso não modelado (DN), com fibras dispostas irregularmente (∇); vasos sanguíneos (V). Notar a diferenciação na organização tecidual (seta vasada), 200X. HE.

Com relação ao peritônio a fresco, observou-se presença de tecido conjuntivo denso modelado, cujas fibras mostraram-se acidófilas, dispostas longitudinalmente e justapostas, apresentando fibroblastos com núcleos levemente basófilos. Em sequência

verificou-se delgada camada de tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sangüíneos, revestidas por células mesoteliais (Figura 9A).

As amostras de peritônio conservadas em glicerina a 98% exibiram uma desorganização tecidual mais acentuada aos 60 e 90 dias e, em todos os períodos pode-se observar menor afinidade para a coloração à eosina (Figuras 9B, 10A e 10B).

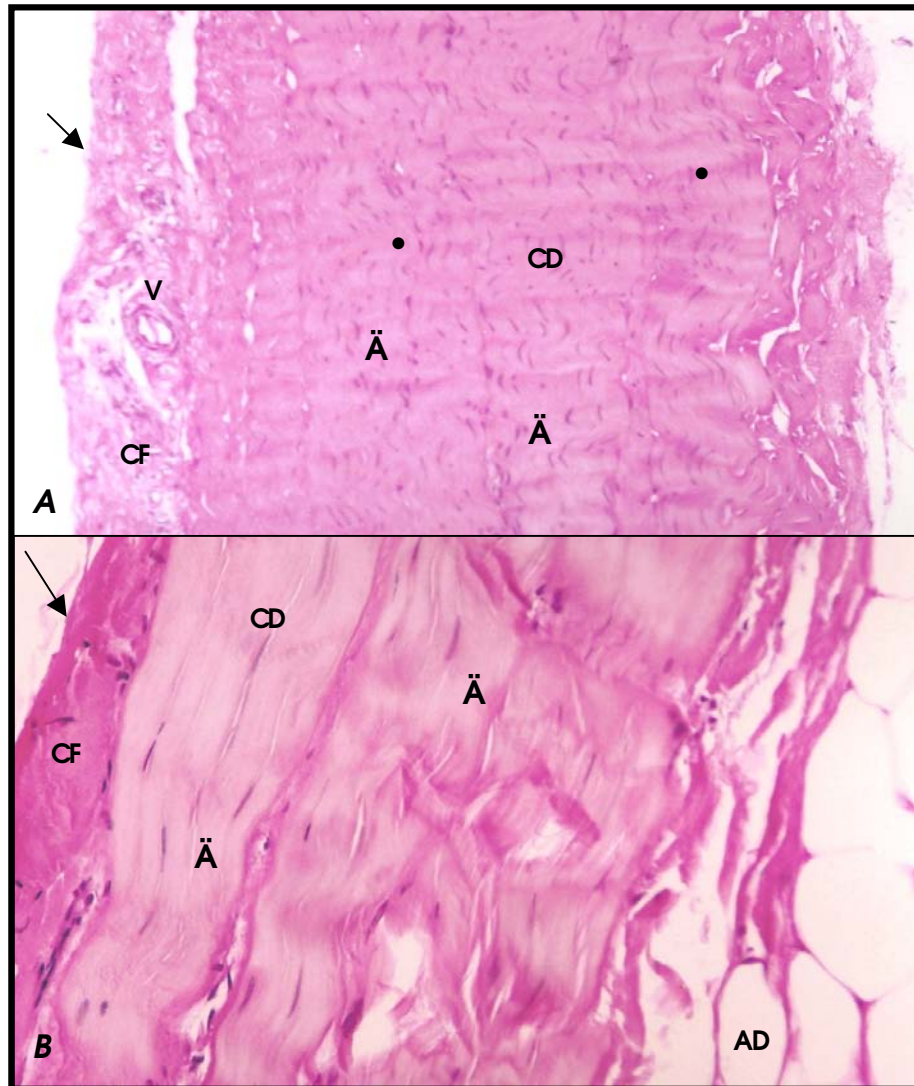


Figura 9. Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino a fresco (A, 100X) e conservada em glicerina a 98% durante 30 dias (B, 200X), onde se observa tecido conjuntivo denso modelado (CD), com fibras acidófilas e condensadas (Ä), dispostas longitudinalmente, com fibroblastos exibindo núcleos levemente basófilos (••), e mesotélio (seta) apoiado sobre tecido conjuntivo frouxo (CF), compondo a extremidade desta serosa, além de vasos sangüíneos (V). HE.

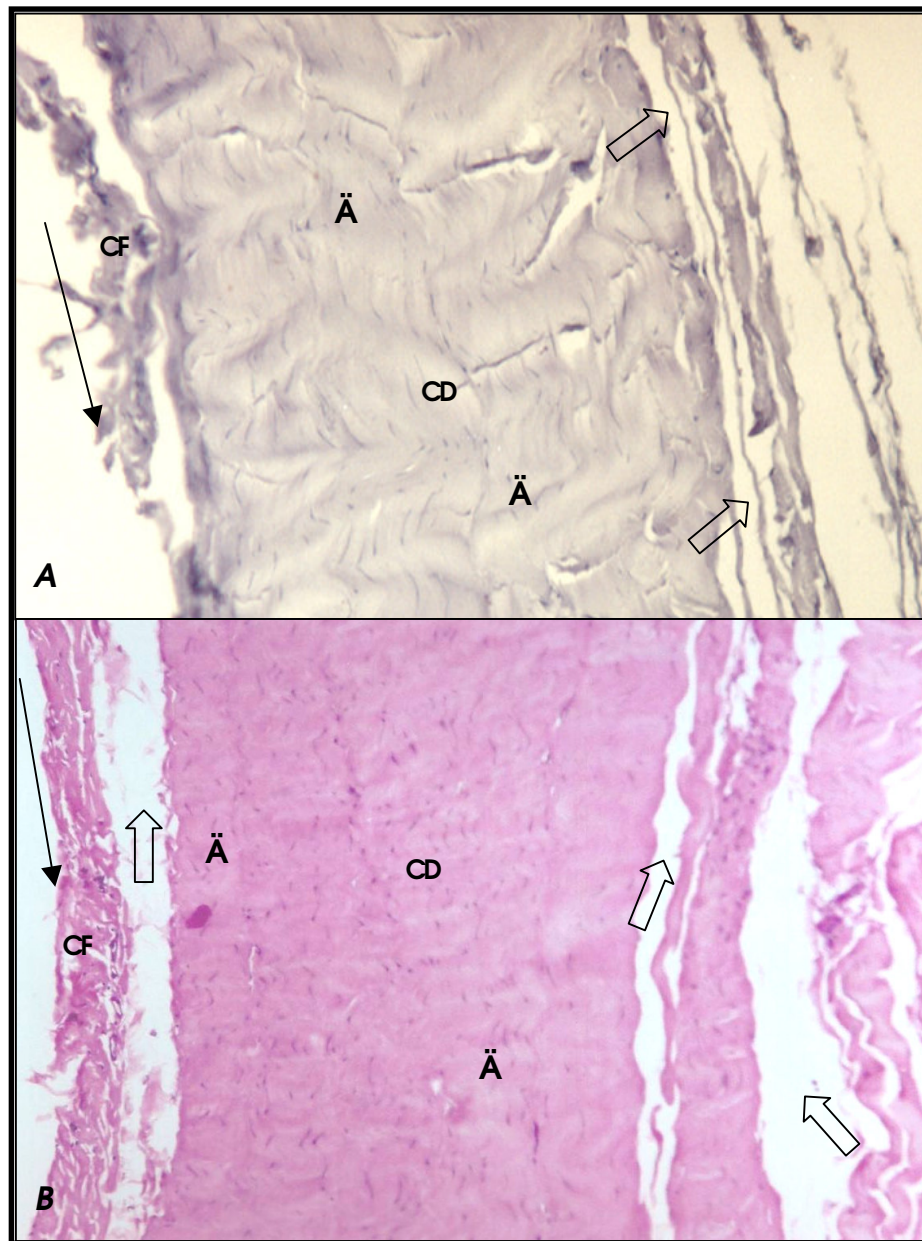


Figura 10. Fotomicrografias de amostras de peritônio bovino conservadas em glicerina a 98% durante 60 (A) e 90 dias (B): tecido conjuntivo denso modelado (CD), com fibras acidófilas e condensadas (Ä), dispostas longitudinalmente; mesotélio (seta); tecido conjuntivo frouxo (CF). Notar leve diferenciação na organização (seta vasada), 100X. HE.

Dos tecidos estudados, o peritônio foi o que exibiu maior proporção de fibras elásticas em sua constituição, cuja quantidade assemelhava-se às das fibras colágenas. O pericárdio exibiu menor proporção dessas fibras em relação ao peritônio;

que se apresentaram acompanhando o sentido das fibras colágenas, encontrando-se mais concentradas junto ao tecido conjuntivo denso modelado, e menos ao tecido conjuntivo frouxo e à transição deste com o epitélio. Já, no centro tendíneo, as fibras elásticas são quase que imperceptíveis (Figura 11).

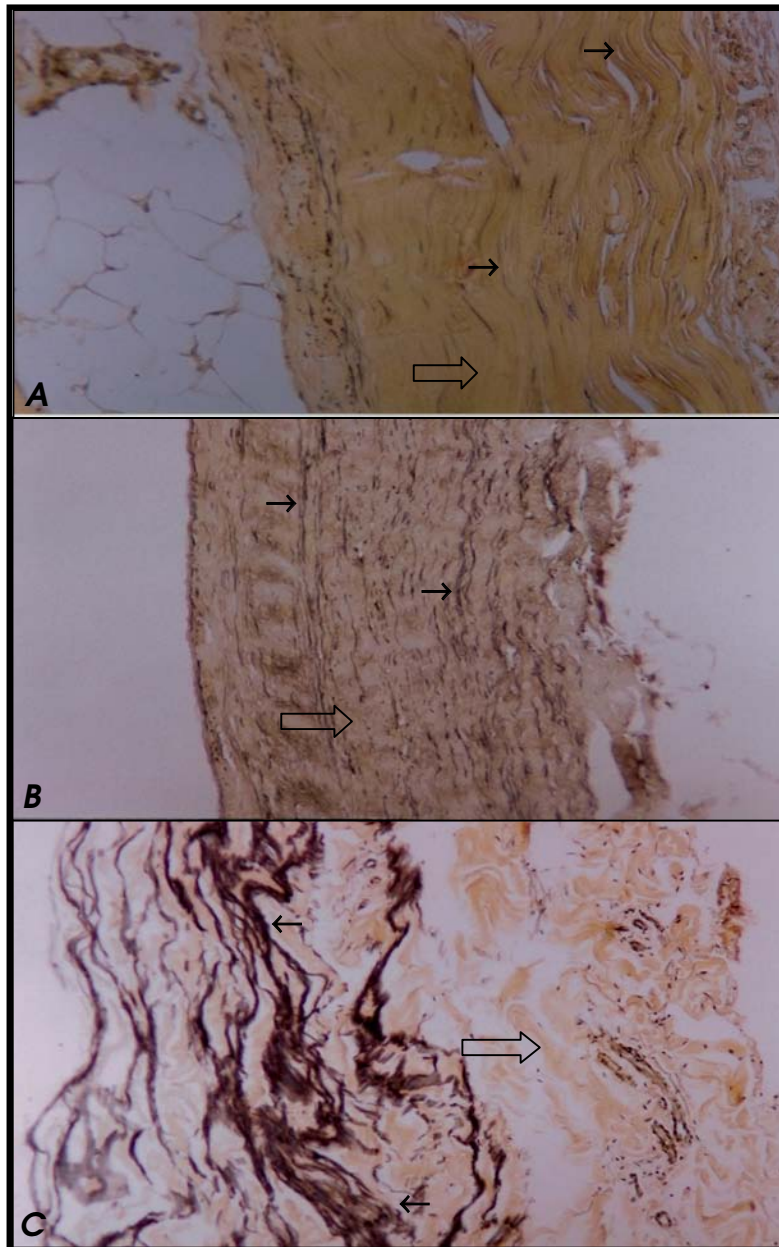


Figura 11. Fotomicrografias de amostras de centro tendíneo (A), pericárdio (B) e peritônio (C) bovino a fresco, nas quais se observa a diferenciação entre fibras elásticas, evidenciadas pela cor negra (setas) e fibras colágenas em verde (seta vasada), 100X. VH.

O estudo realizado mediante o emprego do microscópio eletrônico de varredura propiciou melhor evidenciação da estrutura das membranas ora avaliadas. Tanto o material a fresco, quanto o conservado em glicerina a 98%, apresentavam integridade e organização tecidual semelhantes, não se verificando no material preservado, defibrilação e fragmentação intensa das fibras colágenas. Um desarranjo mínimo foi verificado nas fibras das amostras de centro tendíneo e de pericárdio e, um pouco mais acentuadas nas de peritônio (Figuras 12, 13 e 14).

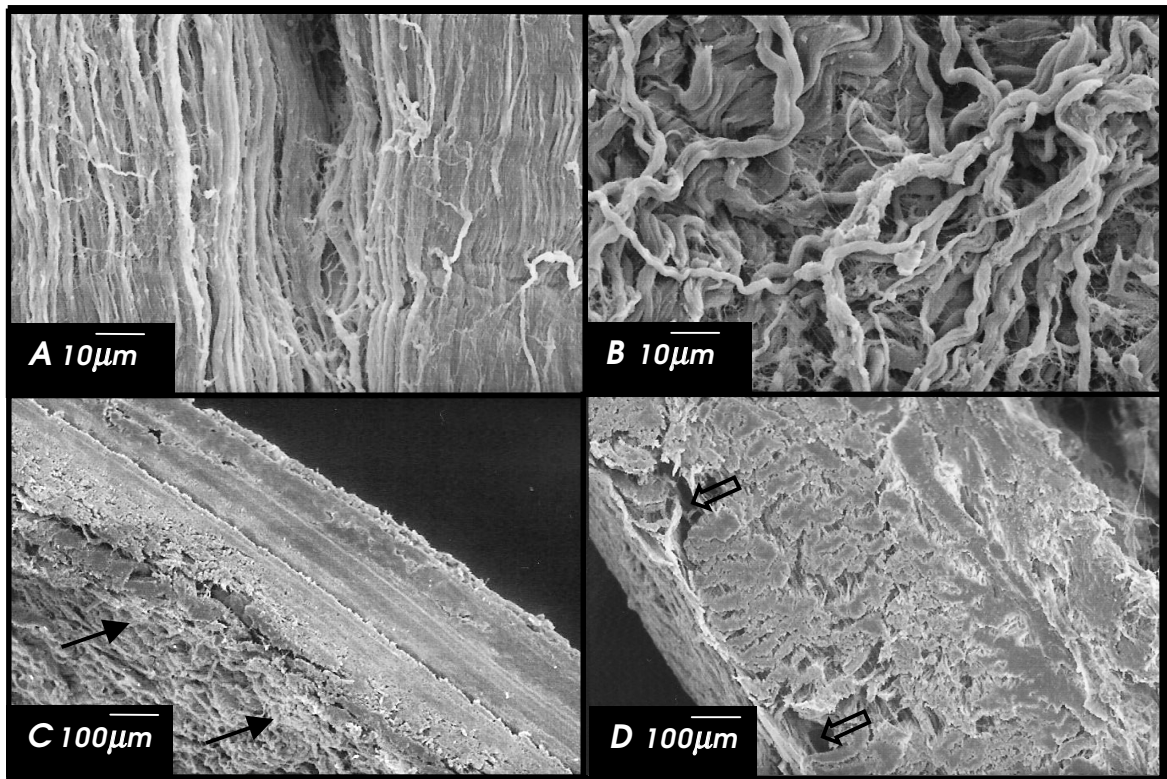


Figura 12. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura do centro tendíneo bovino, em A) material a fresco, evidenciando-se disposição longitudinal das fibras colágenas, 750X; em B) membrana conservada em glicerina durante 60 dias, exibindo fibras colágenas desorganizadas, 750X; em C) corte transversal aos 60 dias, notando-se boa preservação das fibras colágenas (seta), 150X; em D) corte transversal aos 90 dias evidenciando-se retração tecidual (seta vasada), 150X.

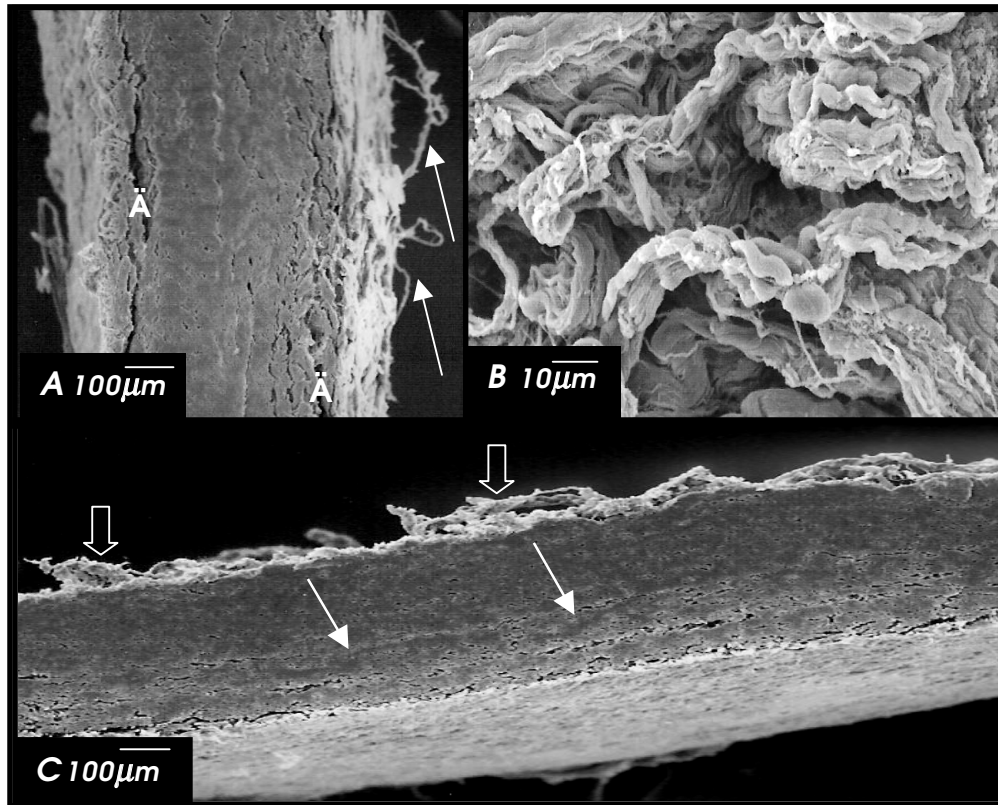


Figura 13. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de pericárdio bovino, em A) material conservado durante 30 dias, evidenciando-se leve desassociação das fibras colágenas (↗) e seu desprendimento (seta), 150X; em B) detalhe das fibras colágenas aos 30 dias, exibindo desorganização em sua disposição, 750X; em C) tecido conservado durante 90 dias, notando-se boa preservação das fibras colágenas (seta) com leve desprendimento na extremidade do pericárdio fibroso (seta vasada), 150X.

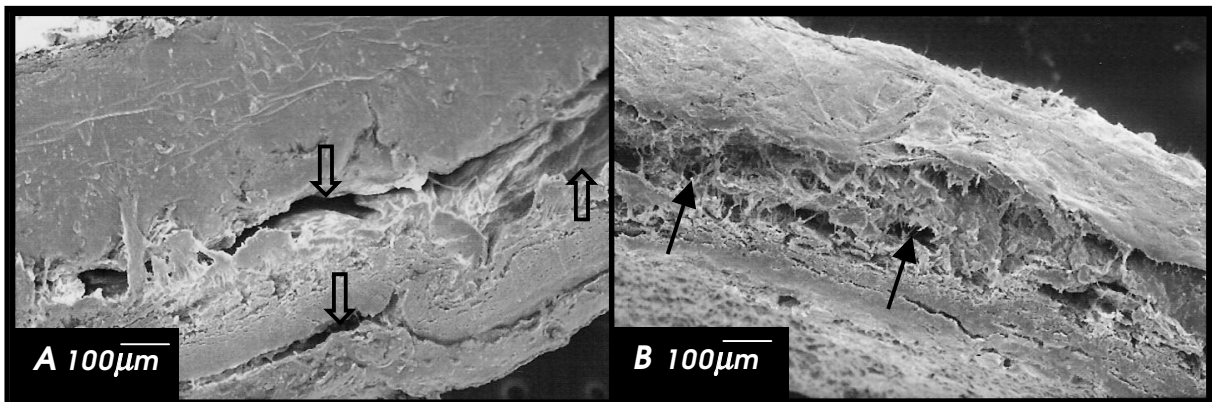


Figura 14. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura de peritônio bovino, em A) material conservado por período de 30 dias em glicerina, notar retração das fibras colágenas (seta vasada); em B) aos 90 dias de preservação, evidenciando-se também desassociação das fibras colágenas (seta), 150X.

5 DISCUSSÃO

Estudos relativos à morfologia microscópica e ultraestrutural acrescidos dos testes de resistência à tração sobre membranas biológicas, tais quais o centro tendíneo, o pericárdio e o peritônio bovinos, e que ora efetuou-se, revestem-se de importância pelo fato de que estas estruturas apresentam ampla aplicação como material de implante (PIGOSSI, 1964; ALVARENGA, 1992; DALECK et al. 1992), tanto em experimentos com animais de laboratório (BASTOS et al., 2005) quanto na prática da clínica cirúrgica veterinária (INATOMI et al. 1980; DALECK et al. 1988; DALECK et al. 1992; COSTA NETO et al. 1999; RODASKI et al. 2002). Além disso faltam informações sobre ensaios mecânicos que envolvam membranas biológicas (BATISTA et al. 1996).

Avaliando as membranas em questão, constatou-se que estas se enquadram na classe de materiais com propriedade viscoelástica não-linear, conforme descreveu DAL FABRO (1979) citado por WU et al. (2004).

No que se refere aos corpos de prova, estes, ao serem submetidos à imposição de uma força axial externa de tração, da qual origina-se um fenômeno denominado “fenômeno de constricção”, ou seja, tanto a área de secção do segmento, quanto a parede da região média dos espécimes sofrem estreitamento, e conseqüente alteração no valor da área, em cada instante de aplicação da força (WU, 2003, citado por WU et al. 2004). Tais observações também foram constatadas nos corpos de prova do presente estudo, exceto em alguns exemplares de centro tendíneo, que tiveram seu ponto de ruptura deslocado para a extremidade do espécime da amostra, dada a fragilidade que a pleura mediastínica conferiu à região.

Desse modo, as colocações de WU et al. (2004), de que a constante de elasticidade dos corpos de prova modificam-se com a ação da força axial, em decorrência das micro-rupturas que ocorrem a cada momento da tração, com conseqüente alteração da disposição celular e fibrilar do tecido; comprovado nesta oportunidade, à semelhança destes autores, mediante a avaliação histológica das amostras após a realização dos testes mecânicos, evidenciando-se a presença de espaçamentos difusos, os quais promovem o afastamento das fibras colágenas, ocasionando perda de resistência e conseqüente ruptura.

Os valores registrados na literatura consultada referentes a área de secção dos corpos de prova não coincidem com os encontrados no presente estudo. Tal fato se deve provavelmente, à padronização dos corpos de prova, que é realizada mediante o tipo de máquina utilizada nos ensaios. Assim, embora se tenha observado nesta pesquisa, diferença marcante no valor da largura das amostras, o valor da espessura dessas estruturas era bem próximo aos valores da espessura do peritônio bovino relatado por ABRAHÃO et al. (1992) e do pericárdio bovino registrado por FORTI et al. (2006).

Constatou-se no presente estudo que o centro tendíneo suporta a maior carga para força máxima de tração ($220,8 \pm 71,87$ N), seguido pelo pericárdio ($124,15 \pm 33,86$ N) e pelo peritônio ($44,94 \pm 13,30$ N), todos conservados por 30 dias em glicerina. Estas observações estão de acordo com as informações de ABRAHÃO et al. (1992) para o peritônio bovino a fresco ($51,53 \pm 4,05$ N) e para o conservado em glicerina por 30 dias ($58,61 \pm 5,01$ N).

Quanto aos valores ora encontrados para a força máxima de tração, estes diferem dos descritos por RABELO et al. (2004), que observaram para o centro tendíneo bovino a fresco valor de $4,61 \pm 0,97$ N, para o centro tendíneo conservado em glicerina por 30 dias, $4,28 \pm 0,79$ N, e para o conservado em glutaraldeído por 30 dias valor de $5,58 \pm 1,25$ N. Diferem também das observações de COSTA et al. (2005), que registraram para o pericárdio bovino a fresco valor de 28 ± 6 N e para o pericárdio bovino descelularizado valor de 10 ± 6 N, fatos estes que podem ser atribuídos à menor área de secção do material analisado por estes autores quando comparados à área de secção das amostras estudadas nesta ocasião.

De acordo com PIGOSSI (1964) e NOORTH et al. (1981) citados por WELLS et al. (2006), ao analisarem a dura-máter canina e humana, respectivamente, após conservação em glicerina, observaram aumento na resistência dessas membranas quando tracionadas. Estas informações assemelham-se, em parte, às encontradas neste estudo, onde notou-se aumento da força máxima de tração quando esta era aplicada nos materiais conservados por até 90 dias em glicerina, porém, estes valores, não foram significativos.

Quanto à tensão que é suportada pelas membranas biológicas, para o pericárdio bovino a fresco são descritos valores em torno de $0,84 \pm 0,21$ Kg/mm² (FORTI et al. 2006) e de $3,0 \pm 0,6$ Kg/mm² (COSTA et al. 2005), para o pericárdio bovino descelularizado, valor de $1,0 \pm 0,3$ Kg/mm² (COSTA et al. 2005) e para o pericárdio bovino tratado em glutaraldeído 0,05% por 2 horas, valor de $1,06 \pm 0,34$ Kg/mm² (FORTI et al. 2006). Valores estes que se aproximam dos encontrados neste estudo

para o pericárdio bovino, tanto a fresco ($1,0 \text{ Kg/mm}^2$), quanto conservado em glicerina por 30 ($1,4 \text{ Kg/mm}^2$), 60 ($1,3 \text{ Kg/mm}^2$) e 90 dias ($1,7 \text{ Kg/mm}^2$).

O valor da tensão para o pericárdio bovino a fresco, registrado por COSTA et al. (2005), difere das demais observações, sugerindo que a seleção das amostras para a realização dos ensaios mecânicos interferiu nos valores da tensão, uma vez que os autores utilizaram apenas amostras padronizadas para a confecção de biopróteses valvares.

Embora se tenha observado maiores valores para as forças de tração aplicadas aos corpos de prova de centro tendíneo bovino, avaliados neste estudo, constatou-se para tensão desta estrutura, valores entre $0,57$ e $0,65 \text{ Kg/mm}^2$, sendo estes, inferiores aos encontrados para o pericárdio, porém, maiores do que os apresentados pelo peritônio, que dentre os tecidos avaliados, foi o que exibiu menores valores para a tensão ($0,37$ a $0,56 \text{ Kg/mm}^2$).

Verificou-se para todas as membranas estudadas, que o aumento no tempo de conservação em glicerina, promovia diminuição em sua rigidez. Tal situação foi evidenciada pela diferença nos valores de alongamento apresentados tanto pelas amostras analisadas a fresco, quanto naquelas conservadas em glicerina por até 90 dias. Estas informações se assemelham às observações de ABRAHÃO et al. (1992), ao relatarem diferenças significativas para o alongamento do peritônio bovino a fresco ($16,58 \pm 0,58 \text{ mm}$) e conservado em glicerina por 60 dias ($28,93 \pm 1,54 \text{ mm}$).

De acordo com COSTA et al. (2005), o pericárdio bovino a fresco, quando submetido à tração, distende-se por cerca de 20% de seu comprimento inicial, valor que se aproxima do descrito para este mesmo tecido a fresco (23,5%) e tratado em

glutaraldeído 0,05% por 2 horas (27,2%), segundo os relatos de FORTI et al. (2006), e também estão próximos aos valores observados neste estudo, no qual o pericárdio a fresco apresentou alongamento em torno de 30% e o conservado em glicerina por 90 dias, alongamento de 43%. Estes achados são atribuídos à ação da glicerina no tecido, tal qual descreveu REYES (1993) para o pericárdio e para a fácia lata de eqüinos conservados em glicerina, por 30 ou 40 dias. Entretanto, PIGOSSI (1964) não constatou alteração no grau de elasticidade da dura-máter canina conservada em glicerina, da mesma forma que NOORTH et al. (1981) citados por WELLS (2006), quando analisaram a dura-máter humana após imersão em glicerina e, subsequente reidratação.

Quanto à integridade morfológica e estrutural dos elementos que constituem as amostras colhidas das membranas avaliadas, tanto a fresco quanto àquelas conservadas em glicerina a 98%, por período de 30, 60 e 90 dias, verificadas nesta oportunidade, assemelham-se aos relatos de DALECK et al. (1987), que não observaram alterações no aspecto das células mesoteliais e das fibras conjuntivas de peritônio canino autógeno ou homogêneo conservado em glicerina, durante 30, 90 ou 240 dias, implantados em cães. Também estão em concordância com as constatações de DALECK et al. (1988), ao observarem, em outra oportunidade, que o peritônio bovino conservado em glicerina a 98% por 60 dias apresentava-se semelhante ao peritônio a fresco.

As comparações entre todas as preparações das membranas conservadas em glicerina nos distintos períodos, com as do material a fresco correspondente (centro tendíneo, pericárdio e peritônio), demonstraram um esmaecimento na coloração geral e

uma melhor evidenciação dos núcleos no material conservado em glicerina. Tais características, provavelmente, devem-se ao fato de que a glicerina, tratando-se de um álcool triídrico de fórmula molecular $C_3H_8O_3$ (LEITE et al. 1979), reage com o citoplasma da célula diminuindo a afinidade tintorial para a eosina e aumentando para a hematoxilina.

Com relação à retração observada entre as fibras de colágeno das preparações oriundas das membranas conservadas em glicerina a 98%, que não foram verificadas nas amostras provenientes do material a fresco, deve-se considerar o fato da glicerina apresentar acentuada hidrofília, devido a sua polaridade, que ao tornar-se livre é capaz de atrair átomos de hidrogênio das moléculas vizinhas, sem, contudo, promover uma reação química, preservando a arquitetura tecidual. Entretanto, tanto a glicerina quanto a água, moléculas polares, apresentam o fenômeno físico-químico de atração mútua, que promove a condensação do volume, caracterizando uma ação desidratante, que a rigor, consiste em uma diminuição de volume exercida pela glicerina nas preparações que nela forem conservadas. Propriedade esta, fundamental para explicar tanto a ocorrência da delaminação, ou seja, do deslocamento das camadas do colágeno, quanto ao evento da retração dos núcleos (PIGOSSI et al., 1971).

Assim, o sucesso da implantação de qualquer uma dessas membranas dependerá, em grande parte, da reação biológica no processo de reparação e regeneração tecidual, sugerindo a necessidade de investigações mais específicas sobre esses eventos, principalmente, aquelas envolvendo experimentações “in vivo”.

6 CONCLUSÕES

- Não houveram modificações significativas na integridade tecidual das membranas ora estudadas quando submetidas à ação da glicerina;
- O pericárdio se mostrou como a membrana mais resistente dentre as três avaliadas;
- A glicerina diminuiu a rigidez dos tecidos testados, sem interferir na resistência dos mesmos.

7 REFERÊNCIAS*

ABRAHÃO, M. S.; SHIMANO, A. C.; PAULIN, J. B. P.; DALECK, C. R. Estudo comparativo da resistência a tração do peritônio de bovino a fresco e conservado em glicerina. In: FÓRUM NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM SAÚDE, 1., 1992, Caxambu, MG. **Resumo Expandido...** Caxambu: SBEB, 1992. p. 22-25.

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

BASTOS, E. L. S.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.; NOVO, N. F.; SILVADO, R. A. B. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 256-260, set./out. 2005.

BATISTA, L. C.; DALECK, C. R.; SHIMANO, A. C.; ALESSI, A. C.; ABRAHÃO, M. S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, eqüino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, supl., p. 305-312, 1996.

COSTA, J. N. L.; POMERANTZEFF, P. M. A.; BRAILE, D. M.; RAMIREZ, V. A.; GOISSIS, G.; STOLF, N. A. G. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 20, n. 1, p. 14-22, jan./fev. 2005.

*NBR 6023 ago. 2002

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina.

Ciência Rural, Santa Maria, v. 29, n. 4, p. 697-703, out./dez. 1999.

CRUZ, P. A. **Peritonitis**. 2002 Disponível em: <<http://www.educacionmedica.pri.sld.cu/datas/area-clinica/diplomadoci/p2/Terapia%20Intensiva%20%20Caballero/Secci%F3n12Sepsis/103%20PERITONITIS.doc>> Acesso em: 01 fev. 2006.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; GANDOLFI, W.; ALESSI, A. C. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina - “estudo experimental”. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 2, p. 195-202, dez. 1987.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; ALESSI, A. C.; PADILHA FILHO, J. G.; COSTA NETO, J. M. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 53-61, jun. 1988.

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

FORTI, F. L.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A. M. G. Modifications on collagen structures promoted by 1,4-dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. **Journal of Biomaterials Applications**, London, v. 20, n. 3, p. 267-285, jan. 2006.

FRANDSON, R. D.; LEE WILKE, W.; DEE FAILS, A. **Anatomia e fisiologia dos animais de fazenda**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.11-13.

FREITAS-NETO, A. G.; RODRIGUES, C. J.; TOLOSA, E. M. C.; BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 239 p.

INATOMI, L. S.; PRANTONI, G. A.; ARAÚJO, F. C.; RAISER, A. G.; PEREIRA, S. N.; CARDOSO, G.; BARROS, S. S.; SANTOS, M. N. Implante de dura-máter heteróloga em cães. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, jun./jul. 1980.

KÖNIG, E. H.; LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos**: texto e atlas colorido. Porto Alegre: Artmed, 2004. v. 2, p. 1-14.

LEITE, J. B. F.; MARQUES, A. F.; GOMES, O. M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação de tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 93, n. 3-4, p. 81-84, mai./jun. 1979.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; BELLETTI, 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 1/6, p. 13-17, dez. 2002.

NOLASCO, R. M.; BELETTI, M. E.; EURIDES, D.; SILVA, F. O. C. E.; COELHO, H. E.; DALECK, C. R.; SILVA, L. A. F. Avaliação histológica e ultra-estrutural de tendões de bovinos preservados em diferentes meios. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 210-215, dez. 2003.

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-máter homogênea conservada em glicerina – estudo experimental em cães**. 1964. 41 f. Tese (Doutorado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1964.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-máter: estudo experimental**. 1967. 83 f. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1967.

PIGOSSI, N.; RAIA, A.; LEX, A.; GAMA, A. H.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico 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, out. 1971.

POMERANTZEFF, P. M. A.; BRANDÃO, C. M. A.; CAUDURO, P.; PUIG, L. B.; GRINBERG, M.; TARASOUTCHI, F.; CARDOSO, L. F.; LERNER, A.; STOLF, N. A. G.; VERGINELLI, G.; JATENE, A. D. Biopróteses de pericárdio bovino Fisics-InCor: 15 anos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São José do Rio Preto, v. 12, n. 4, p. 359-366, out./dez. 1997.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste, 1990. v. 2. 508 p.

RABELO, R. E.; TAVARES, G. A.; PAULO, N. M.; SILVA, L. A. F.; DAMASCENO, A. D.; ANDRADE, M. A.; MARTINS, F. G.; ROMANI, A. F.; SILVA, O. C.; TRINDADE, B. R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 5, n. 4, p. 229-238, out./dez. 2004.

REYES, E. E. F. **Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco**. 1993. 85 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

RODASKI, S.; GUÉRIOS, S. D.; PERRONI, M. A.; NARDI, A. B.; SILVA, C. A. M. Esfincteroplastia anal externa experimental com membranas de peritônio bovino preservada em glicerina a 98%, em cães. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 55-60, 2000.

RODASKI, S.; CUNHA, O.; NARDI, A. B.; RIOS, A.; COMAR, F. A.; CASTRO, J. H. T. Artroplastia acetábulo-femoral em cães com pericárdio bovino conservado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 179-187, 2002.

SARTORI FILHO, F.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E. P. Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 9, p. 69-77, 1997.

SCHAUM, D.; VAN DER MERWE, C. W. **Física geral**. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1973. 430 p.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística**. 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682 p.

VÁMHIDY, L.; STRAUCH, B.; BIRÓ, V. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a review. **Acta Chirurgica Hungarica**, Budapest, v. 31, n. 3, p. 209-215, 1990.

WELLS, P. B.; YEH, A. T.; HUMPHREY, J. D. Influence of glycerol on the mechanical reversibility and thermal damage susceptibility of collagenous tissues. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, New York, v. 53, n. 4, p. 747-753, apr. 2006.

WU, F. C.; LEE, H. D.; MACHADO, R. B.; DALMÁS, S.; COY, C. S. R.; GÓES, J. R. N.; FAGUNDES, J. J. Apresentação do teste energia total de ruptura para avaliação de material biológico com propriedade viscoelástico não-linear. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 609-616, nov./dez. 2004.