

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CADÁVERES DE GATOS QUIMICAMENTE PREPARADOS E
EMBALADOS A VÁCUO VISANDO AO ENSINO DA
CIRURGIA VETERINÁRIA - EFEITO NA BIOMECÂNICA DA
PELE E JEJUNO E AVALIAÇÃO
MICROBIOLÓGICA**

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz
Médica Veterinária

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CADÁVERES DE GATOS QUIMICAMENTE PREPARADOS E
EMBALADOS A VÁCUO VISANDO AO ENSINO DA
CIRURGIA VETERINÁRIA - EFEITO NA BIOMECÂNICA DA
PELE E JEJUNO E AVALIAÇÃO
MICROBIOLÓGICA**

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária, área:
Anatomia Cirúrgica.**

2020

Q3c

Queiroz, Andréa Barros Piazzon de Souza

Cadáveres de gatos quimicamente preparados e embalados a vácuo visando ao ensino da cirurgia veterinária- Efeito na biomecânica da pele e jejuno e análise microbiológica / Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz. -- Jaboticabal, 2020

45 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Fabrício Singaretti de Oliveira

1. Anatomia. 2. Sais de cura. 3. Conservação. 4. Cultura microbiológica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Certificado de aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



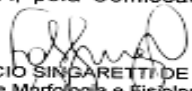
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

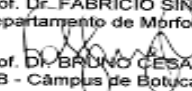
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CADÁVERES DE GATOS QUIMICAMENTE PREPARADOS E EMBALADOS
À VÁCUO VISANDO AO ENSINO DA CIRURGIA VETERINÁRIA - EFEITO
NA BIOMECÂNICA DA PELE E JEJUNO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

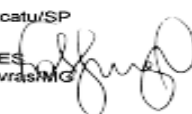
AUTORA: ANDREA BARROS PIAZZON DE SOUZA QUEIROZ

ORIENTADOR: FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV - UNESP


Prof. Dr. BRUNO CÉSAR SCHIMMING
IBB - Câmpus de Botucatu - UNESP / Botucatu/SP


Prof. Dr. GREGÓRIO CORRÊA GUIMARÃES
Universidade Federal de Lavras-UFLA / Lavras/MG

Jaboticabal, 20 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz, nascida em Campinas, São Paulo, em 21 de setembro de 1971. Graduiu-se em Fisioterapia – PUC, Campinas, no ano de 1992. Fez residência na AACD (Associação de Assistência à Criança Defeituosa) em 1994. Graduiu-se em Medicina Veterinária no ano de 2018, com trabalho de conclusão de curso intitulado “Hiperadrenocorticismo em cães”, na Faculdade Anhanguera de Campinas. Fez estágio curricular obrigatório no Laboratório de Anatomia Cirúrgica do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV – UNESP – Jaboticabal, onde desenvolveu o projeto de pesquisa “Análise Biomecânica do duodeno, jejuno e cólon de cadáveres de cão”. Em agosto de 2019, iniciou o curso de Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na FCAV – UNESP Câmpus de Jaboticabal, SP, sob orientação do Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira.

“Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim; todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela! Novas folhas, novas flores, na indefinida benção do recomeço...”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença e auxílio constante ao longo de minha vida. Porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

À minha mãe Cristina, por toda paciência, amizade, amor e cuidado. E por me apoiar em minhas escolhas e me ensinar que o que se leva dessa vida é apenas o conhecimento que podemos obter com muito estudo, em cada viagem, conhecendo novas pessoas e novas culturas...

Ao meu pai Guguy, por ser um homem de caráter, honesto e que nunca mediu esforços para nos dar de tudo.

À minha irmã Patrícia por ter me apoiado nesse projeto e à Cacau por estar sempre perto em pensamento. A minha sobrinha linda que nos alegra a cada dia.

Ao meu orientador Prof. Fabrício Singaretti de Oliveira por toda confiança, ensinamentos profissionais e de vida, pela amizade, dedicação, paciência e por acreditar que seria capaz.

À Marcela, Duda, Pê, Priscila e Lais, que dividiram um pouco de suas vidas comigo em Jaboticabal tornando tudo mais fácil. Muito obrigada pela convivência, respeito e amizade!

À Alessandra por toda ajuda nas coletas e experimentos, sem você não teria conseguido realizar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) por conceder a bolsa de estudos.

Aos alunos de Doutorado e Iniciação Científica do Laboratório de Anatomia Cirúrgica da FCAV, Thiago, Raphael, Laura, Nathália, Geovana, Giovana, Isabela, agradeço pela amizade, horas de risadas, toda a parceria e apoio. Minha gratidão!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1 Histologia da pele e jejuno	2
2.2 Fixadores e conservantes em anatomia	4
2.3 Aspectos microbiológicos na conservação de peças anatômicas	6
2.4 Conservantes na indústria alimentícia	7
2.5 Embalagem a vácuo	7
2.6 O desafio para o ensino da cirurgia veterinária	9
2.7 Análise biomecânica de tecidos de animais	10
3. Referências	12
CAPÍTULO 2 – Biomechanics and microbiological analyses of chemically prepared cats kept on vacuum aiming surgery practicing	18
Abstract	18
Introduction	19
Material and methods	20
Results	22
Discussion	23
Conclusion	25
References	26
CAPÍTULO 3 – Biomechanical and microbiological analysis of embalmed cats – acute effect of conservation	31
Abstract	31
Introduction	32
Materials and methods	33
Results and discussion	36
Conclusion	38
References	38

CEUA – certificado de comprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



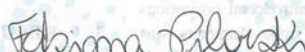
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Cadáveres de cães e gatos quimicamente preparados mediante emprego de diferentes soluções fixadoras/conservadoras”**, protocolo nº 004593/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabricio Singaretti de Oliveira, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 11 de abril de 2019.

Vigência do Projeto	20/04/2019 a 10/04/2021
Espécie / Linhagem	Canino/ SRD; Gatos/ SRD (cadáveres)
Nº de animais	40
Peso / Idade	3 a 15 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro de controle de Zoonoses de Ribeirão Preto, SP (processo 02.2014/000027-1, já aprovado pelo Departamento Jurídico Municipal).

Jaboticabal, 11 de abril de 2019.


Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

CADÁVERES DE GATOS QUIMICAMENTE PREPARADOS E EMBALADOS A VÁCUO VISANDO AO ENSINO DA CIRURGIA VETERINÁRIA - EFEITO NA BIOMECÂNICA DA PELE E JEJUNO E AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

RESUMO – O uso de animais em pesquisa e atividades de ensino sofreu mudança após o decreto da lei Arouca em 2008. Assim, faz-se necessário a busca de métodos alternativos ao uso de animais vivos que não tragam prejuízo acadêmico ou científico, visando uso racional e bem-estar dos animais previstos em lei. Existem diversas substâncias utilizadas para a conservação de cadáveres, dentre elas, a glicerina, álcool etílico, fenol e formaldeído. Objetivou-se, com este trabalho, determinar o efeito biomecânico, na pele e jejuno, de cadáveres de gatos submetidos à fixação com álcool etílico e sal de cura, embalados à vácuo, visando a prática da cirurgia veterinária, além de obter a avaliação microbiológica durante o processo. Foram quantificadas as alterações na resistência cutânea, medida em Newtons durante o teste de tração, nos momentos zero (previamente à fixação), 30, 60, 90 e 120 dias de conservação a vácuo, além do efeito agudo, por 7 dias seguidos, após a fixação. Os outliers foram removidos e os dados foram analisados pelo teste de Cramer-Von Mises. Em seguida, foram realizados os testes ANOVA e Tukey (5%). A força máxima de ruptura (FMR) e o alongamento da ruptura (AR) das amostras controle da pele e do jejuno foram 294,14N, 9,84mm, 28,05N e 4,84mm e, durante a conservação, 215,10N e 7,93mm, 24,94N e 5,62 mm (30 dias), 268,41N e 7,70mm, 25,71N e 4,42mm (60 dias), 197,75N e 7,80mm, 25,46N e 5,50mm (90 dias), 209,14N e 7,81mm, 25,18N e 5,20mm (120 dias), respectivamente. A FMR da pele foi diferente do controle em todos os momentos, com exceção de D60 que foi similar ao controle. O AR foi diferente em todos os momentos em relação ao controle. A FMR do jejuno ($p = 0,8394$) não apresentou diferença entre o controle e os momentos de conservação. O AR foi diferente do controle apenas no momento D60 ($p=0,0087$). A população microbiana não excedeu $4,0 \times 10^2$ UFC / mL no total de bactérias aeróbicas e $8,8 \times 10^2$ UFC/mL no total de bactérias anaeróbicas; 25% das amostras não apresentaram contaminação. No efeito agudo da conservação, a análise de tração das amostras foi realizada durante sete dias consecutivos. No último dia, foram escolhidos três cadáveres ao acaso e o líquido presente nos sacos plásticos foi analisado microbiologicamente. A FMR da pele e jejuno das amostras controle foram 344,27N e 23,39N e, durante a conservação, D1 266,95N e 24,31N, D2 269,48N e 24,56N, D3 237,48N e 27,60N, D4 337,77N e 20,08N, D5 241,78N e 23,35N, D6 292,18 e 19,67N, D7 249,70 e 21,08, respectivamente. Na FMR da pele os momentos D1 e D2 foram similares ao controle, o mesmo ocorreu com o AR. A FMR do jejuno nos momentos D2, D4 e D6 foi similar ao controle, enquanto o AR foi similar ao controle nos momentos D2 e D6. A população microbiana não excedeu $6,0 \times 10^4$ CFU/mL no total de bactérias aeróbicas e $4,8 \times 10^4$ CFU/mL no total de bactéria anaeróbicas. A biomecânica não foi significativamente afetada e a contagem microbiológica foi baixa durante a conservação, demonstrando a eficácia dessa técnica anatômica no treinamento cirúrgico.

Palavras-chave: anatomia, sais de cura, conservação, cultura microbiológica.

CHEMICALLY PREPARED CATS AND VACUUM PACKAGING AIMING THE VETERINARY SURGERY TEACHING - EFFECT ON THE BIOMECHANICS OF SKIN AND JEJUNUM AND MICROBIOLOGICAL EVALUATION

ABSTRACT - The use of animals in research and teaching activities changed after the Arouca law decree in 2008. It is necessary to search for alternative methods to the use of live animals that do not cause academic or scientific damage, aiming at rational use and welfare provided by law. There are several substances used for the preservation of corpses, among them, glycerin, ethyl alcohol, phenol, and formaldehyde. The objective of this research was to determine the biomechanical effect, on the skin and jejunum, of cats' cadavers submitted to fixation with ethyl alcohol and curing salt, vacuum-packed, aiming the practice of veterinary surgery, and microbiological analyzes. Changes in skin resistance measured in Newtons during the traction test were quantified at moments zero (before fixation), 30, 60, 90, and 120 days of vacuum packaging, in addition to the acute effect, for seven consecutive days, after fixing. Outliers were removed, and data were analyzed by Cramer-Von Mises test. Then, ANOVA and Tukey's test (5%) were performed. The maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (RE) of the control samples of skin and the jejunum were 294.14N, 9.84mm, 28.05N and 4.84mm and, during conservation, 215.10N, and 7.93mm, 24.94N and 5.62mm (30 days), 268.41N and 7.70mm, 25.71N and 4.42mm (60 days), 197.75N and 7.80mm, 25.46N and 5.50mm (90 days), 209.14N and 7.81mm, 25.18N and 5.20mm (120 days), respectively. The skin MRF was different from control in all moments, except on D60. And also, the RE was different in all moments. There was no difference between control and conservation moments of the jejunum MRF ($p = 0,8394$), RE was different from control only on D60 ($p=0,0087$). The microbial population did not exceed 4.0×10^2 CFU/mL in total aerobics and 8.8×10^2 CFU/mL in total anaerobes; 25% of samples presented no contamination. On the acute effect of the conservation, the traction test of the samples was performed for seven consecutive days. On the last day, three corpses were randomly chosen, and the liquid presented in the plastic bags was microbiologically analyzed. The MRF of skin and jejunum of the control samples were 344.27N and 23.39N and, during conservation, D1 266.95N and 24.31N, D2 269.48N and 24.56N, D3 237.48N and 27.60N, D4 337.77N and 20.08N, D5 241.78N and 23.35N, D6 292.18 and 19.67N, D7 249.70 and 21.08, respectively. The skin MRF, the moments D1 and D2 were similar to the control group; the same happened for RE. The jejunum MRF was similar to the control group on D2, D4, and D6. At the same time, the RE was similar in moments D2 and D6. The microbial population did not exceed 6.0×10^4 CFU/mL in total aerobics, and 4.8×10^4 CFU/mL in total anaerobes. Biomechanics was not significantly affected, and the microbiological count was low during conservation, demonstrating the effectiveness of this anatomical technique for surgery training.

Keywords: anatomy, healing salts, conservation, microbiological culture.

LISTA DE ABREVIACÕES

AE.....	Álcool etílico
AEG.....	Álcool etílico glicerinado
AR.....	Alongamento da Ruptura
CEUA.....	Comissões de Ética Institucionais no Uso de Animais
CFU.....	Colony Forming Unit
CSS.....	Curing Salt Solution
EA.....	Ethyl Alcohol with glicerín
FCAV.....	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMR.....	Força máxima de ruptura
kg.....	Quilogramas
mL.....	Mililitro
mm.....	Milímetros
MRF.....	Maximal Rupture Force
N.....	Newtons
RE.....	Rupture Elongation
SACS 30%.....	Solução Aquosa de Cloreto de Sódio à 30%
SC.....	Sal de cura
CSS.....	Curing Salt Solution

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Biomechanics and microbiological analyses of chemically prepared cats kept on vacuum aiming surgery practicing.

Tabela 1. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (N) and rupture elongation (mm) of the skin of chemically prepared cats' corpses kept in the vacuum package up to 120 days.....28

Tabela 2. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (N) and rupture elongation (mm) of the jejunum of chemically prepared cats' corpses kept in vacuum package up to 120 days.....29

Tabela 3. Microbiological analysis of the fluid from chemically prepared cats' corpses kept in vacuum up to 120 days.....29

CAPÍTULO 3 - Microbiological and biomechanical analysis of the skin and jejunum of cats chemically prepared for seven days (acute effect).

Tabela 1. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (ER) of the skin samples from cat cadavers chemically prepared and vacuum packaging for up to 7 days.....43

Tabela 2. Average and standard deviation of the maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (ER) of the jejunum samples from cat cadavers chemically prepared and vacuum packaging for up to 7 days.....43

Tabela 3. Analysis of variance of the Maximal Rupture Force of the jejunum of cadavers of cats chemically preserved under the acute effect of conservation for seven days.....43

Tabela 4. Analysis of variance of the Elongation Rupture of the jejunum of cadavers of cats chemically preserved under the acute effect of conservation for seven days.....44

Tabela 5. Microbiological analysis of the liquid contained in the vacuum packaging from three randomly chosen cadavers.....44

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - Biomechanics and microbiological analyses of chemically prepared cats kept on vacuum aiming surgery practicing.

Figura 1- A vacuum packed cat after fixation with ethyl alcohol and curing salt.....30

Figura 2- Three consecutive moments (A, B, C) during traction test in a skin sample from embalmed cats' corpses.....30

CAPÍTULO 3 - Microbiological and biomechanical analysis of the skin and jejunum of cats chemically prepared for seven days (acute effect).

Figura 1- A vacuum packed cat after fixation with ethyl alcohol and curing salt.....44

Figura 2- Jejunum sample collected in the longitudinal direction in an embalmed cats' corpse.....45

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Existem muitas razões para as instituições de pesquisa e ensino procurarem alternativas para a substituição de animais em aulas práticas, incluindo riscos de zoonoses, considerações éticas, eficácia no ensino, higiene do ambiente de trabalho, pressões econômicas e publicidade adversa. Muitos acadêmicos e pesquisadores são contra as práticas com animais por motivos éticos e morais, podendo causar conflitos e problemas psicológicos. Por isso, foram estabelecidas normas legais para uso de animais em pesquisa e aulas, assegurando-se, assim, o bem-estar (Arluke, 2004).

Em 2008, foi implementada a lei Arouca (11.794/2008) e oficializada pelo Decreto 6.899 de 2009 (Brasil, 2009). Ela regulamenta o uso de animais em atividades de ensino e pesquisas, estabelecendo que Comissões de Ética Institucionais no Uso de Animais (CEUA) controlem as atividades de ensino e pesquisa nas universidades, auxiliando os profissionais da área biomédica, e cadastrando a instituição junto ao Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (Brasil, 2008), auxiliando na formação dos novos profissionais com valores éticos de responsabilidade e respeito para com a vida (Oliveira et al., 2013).

Para a substituição do uso de animais vivos no ensino da cirurgia veterinária vários métodos alternativos vêm sendo empregados sem que tragam prejuízo ao ensino da técnica cirúrgica (Rocha et al., 2019). Para isso, o trabalho conjunto das áreas de anatomia e cirurgia permitem a preservação adequada de cadáveres e um ensino de excelência (Groscurth et al., 2001).

Objetivou-se, com este estudo, avaliar a conservação mediante análise biomecânica e microbiológica de cadáveres de gatos, utilizando-se álcool etílico glicerinado (AEG) como fixador e sais de cura (SC) como conservante, em embalagens a vácuo, visando o ensino prático da cirurgia veterinária.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histologia da pele e jejuno

A pele é composta por três camadas: a epiderme, que é a camada mais externa; a derme (camada média); e uma camada profunda que é a tela subcutânea (hipoderme ou tecido celular subcutâneo) (Bacha e Bacha, 2012). Os queratinócitos sintetizam grânulos lamelares, que terão importância na barreira de proteção oferecida pela epiderme (Bacha e Wood, 2003). Possui quatro especializações de padrões anatômicos (pele com pêlo, pele escrotal, coxins e plano nasal), que diferem em vários aspectos em relação à espessura (Affolter e Moore, 1994).

O gato apresenta a pele com espessura entre 0,4 – 2mm enquanto cães, entre 0,5 a 5mm (Scott, 1980; Affolter e Moore, 1994). Possui, ainda epiderme significativamente mais fina que a do cão, com espessura aproximada de 15 μm , enquanto a do cão é de 40 μm (Kristensen, 1975).

Os fibroblastos são responsáveis pela produção de fibras colágenas ou elásticas (Bacha e Wood, 2003). As fibras elásticas são representadas pela elastina e correspondem a uma pequena parte das fibras dérmicas, enquanto as colágenas perfazem de 75% a 90% do total e a espessura da derme da pele com pêlos está correlacionada com a quantidade e com o diâmetro dos feixes de colágeno ((Manschot, Wijn e Brakkee, 1982; Meyer e Neurand, 1987). Dentre as fibras colágenas destacam-se as do tipo I (87%), III (10%) e V (3%). No cão e no gato, a derme superficial é formada principalmente por fibras colágenas finas, frouxamente arranjadas e distribuídas de forma irregular, já a derme profunda contém principalmente fibras colágenas espessas, densamente organizadas e distribuídas paralelamente à superfície cutânea (Affolter e Moore, 1994, Scott et al., 2001).

O alongamento da pele (ou seja, valor máximo de deformação sem ruptura) está relacionado à propriedade da camada córnea da epiderme e é fortemente impactada pela sua hidratação. A resistência à tração da pele deve-se às fibras de colágeno tipo I, na camada mais profunda da derme. A elastina forma uma rede fibrosa na derme e desempenha um papel importante na

recuperação da tensão da pele após aplicar um estresse, mas sua contribuição é pequena (Bismuth et al., 2014).

A derme consiste numa rede complexa de fibras colágenas e elastina incorporada por uma substância amorfa, sendo sua maior parte composta por colágeno (77%). As fibras colágenas têm seu coeficiente de elasticidade de 10^8Pa enquanto a elastina tem seu coeficiente de elasticidade de 10^6Pa (Manschot, Wijn e Brakkee, 1982).

O intestino dos mamíferos é composto por duodeno, jejuno e íleo (intestino delgado), no qual ocorre a finalização da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina, e pelo ceco, cólon, reto e canal anal (intestino grosso) que está adaptado para exercer absorção de água, produção de muco e formação de massa fecal. Ambos possuem epitélio colunar simples com bordas estriadas e as células caliciformes entre as células colunares. Os vilos se restringem ao intestino delgado, são longos, delgados e em sua base encontram-se as glândulas intestinais ou criptas de Lieberkuhn, que são responsáveis pela reposição da mucosa epitelial através da divisão celular dentro da cripta. A camada muscular mucosa é formada por duas camadas de músculo liso e separa as criptas da submucosa adjacente e encontra-se a lâmina subglandular. A camada muscular externa é composta de musculatura lisa e serosa que compõe o restante do intestino. Na região inicial e média do duodeno dos carnívoros, podem ser encontradas as glândulas de Brünner (glândulas duodenais e glândulas mucosas), tubuloacinares e compostas (Bacha e Wood, 2003).

O tecido muscular liso é composto de células involuntárias e sem estriação. Cada célula do tecido muscular liso é envolvida por um revestimento constituído por uma rede de filamentos de proteína chamado de endomísio. Esse tipo de musculatura não apresenta perimísio (envoltório interno constituído de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas) e nem epimísio (envoltório resistente de tecido conjuntivo, rico em fibras colágenas, que recobre todo o músculo) (Bacha e Bacha, 2012).

Nos gatos, a espessura da mucosa jejunal pode variar de 2 a 3mm, enquanto nos cães varia de 4 a 5mm dependendo do peso (Gaschen, 2011; Griffin, 2019).

2.2 Fixadores e conservantes em anatomia

Há mais de 5 mil anos existe a preocupação da conservação de peças anatômicas, pois essas são indispensáveis ao ensino, melhorando o treinamento das práticas cirúrgicas (Cury et al., 2013). Para possibilitar o estudo de animais por tempo superior ao da autólise e sem a proliferação de patógenos, é necessário o uso de métodos de fixação e preservação. A fixação é extremamente importante, pois mantém os tecidos firmes, insolúveis e protegidos (Calamares Neto e Colombo, 2015).

As substâncias mais utilizadas para a conservação em meio líquido são o formaldeído, a glicerina, o álcool etílico e o fenol, que também inibem o crescimento de microrganismos no meio líquido (Rodrigues, 2010).

Por ser mais barato, o formaldeído a 10%, é o fixador e conservante mais utilizado, penetra rapidamente nos tecidos (seis mm em doze horas), porém as peças se tornam escuras com o passar do tempo, além de friáveis e de difícil utilização, aumentando o peso das estruturas e produzindo vapores tóxicos que irritam as mucosas e conjuntivas. Apresenta ação bactericida, fungicida, viricida e esporicida (Calamares Neto e Colombo, 2015). É considerada uma substância cancerígena e teratogênica, e pode contaminar o meio ambiente caso seja descartado inadequadamente (WHO, 1991). Segundo Cury et al. (2013), os cadáveres e peças anatômicas utilizadas na dissecação, podem ser fixadas pela técnica de glicerinação, porém ainda, na sua maioria, são conservadas em solução de formaldeído à 10%.

Em substituição ao formol, podem ser utilizadas diversas soluções conservantes, como a solução de Thiel que é composta de ácido bórico, etileno glicol, nitrato de potássio, clorometilfenol, sulfato de sódio, formalina e, mantém os cadáveres macios e flexíveis com cores parecidas com o natural (Groscurth et al., 2001; Hayashi et al., 2014). A solução de Klotz é composta de cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, hidrato de cloral, formalina e água; e a solução de Jores é composta de água destilada, formalina, sulfato de sódio, sulfato de potássio, cloreto de sódio, bicarbonato de sódio, glicerina e acetato de sódio ou potássio (Rodrigues, 2010); a solução modificada de Larssen contém 100 ml de formalina a 10%, 400ml de glicerina, 200g de hidrato de cloral, 200g de sulfato

de sódio, 200g de bicarbonato de sódio, 180g de cloreto de sódio e 2 litros de água destilada (Silva et al., 2004), no entanto todas ainda contam com a formalina em sua composição e consequentemente com seu potencial tóxico.

Como a solução de Laskowski é composta de: 800ml de glicerina, 200ml de etanol, 50g de ácido fênico e 50g de ácido bórico, há a necessidade dos cadáveres ficarem armazenados em temperatura de 0°C, o que leva muito tempo até serem descongelados para o uso, e os tecidos se tornam extremamente escuros (Silva et al., 2007).

Foram utilizadas soluções saturadas de sais para a fixação e conservação de peças anatômicas por longos períodos, conforme descrito em estudo de pericárdio canino armazenado por um período mínimo de 90 dias em uma solução hipersaturada de cloreto de sódio (Brun et al., 2002) e, em outro trabalho, os centros frênicos foram armazenados em glicerina (Brun et al., 2004).

Foi avaliado por Oliveira (2014), a efetividade da conservação de peças anatômicas previamente fixadas com formaldeído a 10% e conservada em solução aquosa de cloreto de sódio 30% por 5 anos, demonstrando sua eficácia, pois não houve contaminação durante o período do estudo, permitindo sua utilização nos laboratórios de anatomia.

Janczyk et al. (2011) utilizaram sal de cura como alternativa ao uso do formaldeído no ensino da anatomia veterinária. A solução continha 23% de sais de cura, 30% de etanol, 20% de Pluriol® E 400 (mistura de polietilenoglicol) e 0,1% de óleo de orégano na solução final para melhorar o odor. Os autores afirmaram que a solução testada preservou com sucesso os cadáveres de cães, sem riscos ambientais e à saúde com baixo custo efetivo. Na Universidade de Ciências de Szent István (Hungria), foi utilizado solução de sais de cura a 16% para a preservação de peças anatômicas de cães. As peças mantiveram a sua coloração e consistência, demonstrando a alta qualidade dessas peças comparativamente àquelas submetidas a fixação com formaldeído. Os sais de cura são um método de baixo custo e seguro no uso para o ensino anatômico (Werdelmann; Gerics, 2016).

O cadáver fresco é o modelo que mais se aproxima da realidade, porém necessita de congelamento, apresenta um tempo limitado de trabalho devido à rápida putrefação e risco de infecção. No entanto, as soluções saturadas de sais têm demonstrado ser um método simples, com baixo risco de infecção e de baixo

custo, que contribui para ampla utilização de cadáveres preservados em treinamentos cirúrgicos, porém são necessários mais estudos (Hayashi et al., 2016).

Estudos recentes demonstram análises biomecânicas de tecidos de cães e gatos durante a conservação (Cerqueira et al., 2017; Pelógia et al., 2018; Rocha et al., 2018; Fração et al., 2019), além de análises microbiológicas das soluções fixadoras/conservadoras (Pereira et al., 2019), e da avaliação dos alunos sobre a prática cirúrgica (Rocha et al., 2019).

2.3 Aspectos Microbiológicos na Conservação de Peças Anatômicas

Devido à exposição de alunos e profissionais aos esporos suspensos no ar dos laboratórios de anatomia, podem ocorrer quadros alérgicos, acarretando, de acordo com a contaminação do ambiente e a intensidade da exposição, desordens do sistema nervoso central, respiratório e imune (Corrêa, 2003).

A fixação das peças anatômicas é muito importante para que não haja contaminação, deterioração dos tecidos, e para garantir que se mantenham insolúveis, protegidas e firmes. Portanto, boas práticas de fixação e conservação, são necessárias, para a não deterioração do material e a proliferação de patógenos causadores de doenças (Corrêa, 2003; Rodrigues, 2010).

Ao ser avaliada a resistência de diferentes microrganismos ao formaldeído e seu efeito antimicrobiano em diversas concentrações, verificou-se que, *Salmonella* sp. *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp. foram mais susceptíveis ao formaldeído que *Staphylococcus* sp. Os fungos mostraram-se mais resistentes que as bactérias, sendo o *Aspergillus niger* mais resistente que *Candida albicans* (Solomon, 1975).

A glicerina provoca desidratação de peças anatômicas, e possui efeito antisséptico, atuando contra fungos e bactérias. Suprime vapores prejudiciais à saúde como aqueles liberados pelo formaldeído (Krug et al., 2011).

A utilização de álcool etílico na fixação e de solução aquosa de cloreto de sódio a 30% na conservação de cadáveres de cães já foi avaliada com sucesso, apresentando baixa contagem microbiológica para os gêneros *Bacillus*, *E. coli* e

Pseudomonas, e sem contaminação aparente à inspeção visual nos tanques e cadáveres, ausência de odor desagradável ou putrefação (Pereira et al., 2019).

2.4 Conservantes na indústria alimentícia

A cura de produtos cárneos baseia-se na aplicação de aditivos alimentares como sais de nitrito, nitrato, cloreto de sódio e açúcares, que contribuem para a fixação da cor avermelhada da carne curada, ação bacteriostática cientificamente comprovada e manutenção das características físico-químicas. Tanto os nitratos quanto os nitritos são muito utilizados na indústria alimentícia e são adicionados aos alimentos para retardar ou impedir ações enzimáticas ou microbianas, inibindo a deterioração dos alimentos (Iamarino et al., 2015).

O nitrito é agente de cura e conserva a carne contra a deterioração bacteriana, inibindo principalmente o crescimento do *Clostridium botulinum*, que pode causar infecções e/ou intoxicações alimentares ao organismo humano, por ser extremamente tóxico e ser o responsável por causar o botulismo (Iamarino et al., 2015).

As temperaturas elevadas promovem a putrefação da massa muscular interna da carne, favorecendo o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, sendo o *Clostridium perfringens* a principal, e a refrigeração rápida inibe o crescimento bacteriano e a putrefação (Rosset, 1994).

O principal objetivo da refrigeração da carne é reduzir a temperatura para que a taxa de crescimento bacteriano seja severamente retardada, como no resfriamento, ou interrompida, como no congelamento. Assim, eliminam-se os riscos do desenvolvimento de microrganismos patogênicos causadores de toxinfecções e aumenta o tempo de prateleira, sem alterar o sabor, odor e a cor da carne (Aidani et al., 2014).

2.5 Embalagem a vácuo

A embalagem a vácuo vem ganhando importância como técnica de preservação para o prazo de validade da carne e outros alimentos (Farber et al., 2003). Na embalagem a vácuo, o ar é removido completamente, e como as

bactérias que mais facilmente acometem os alimentos de origem animal são as aeróbicas e, para causarem as reações oxidativas precisam de oxigênio, quando é retirado o ar da embalagem elas não sobrevivem. Assim, o vácuo inativa essas bactérias e a deterioração causada por elas é evitada, levando a um maior tempo de armazenamento e uma maior qualidade do produto. Porém, ainda pode existir contaminação por bactérias anaeróbicas que conseguem se multiplicar sem a presença de oxigênio e por isso o uso da refrigeração é utilizada para minimizar esse problema (Mantilla et al., 2010).

O CO₂ retarda o crescimento microbiano de várias maneiras: penetra na parede da célula microbiana alterando a permeabilidade celular; solubiliza-se dentro da célula e vai produzir ácido carbônico (H₂CO₃), reduzindo o pH celular e, interferindo em muitos caminhos enzimáticos e bioquímicos dentro da célula microbiana, reduzindo sua taxa de crescimento (Floros; Matsos, 2005). Portanto, a provável combinação dessas atividades é responsável pelo efeito bacteriostático do CO₂ (Blakistone, 1999). A atividade inibitória do CO₂ aumenta se a temperatura de armazenamento diminui em virtude da maior solubilidade do gás em água sob baixas temperaturas. A inibição também aumenta quando o pH diminui em uma faixa ácida (Jay, 2005).

Segundo Leonel (2008), o vácuo promove redução nos valores de oxidação e da força de cisalhamento muscular, provocando assim maior maciez do produto, e, com a falta de oxigênio, as bactérias láticas predominarão, causando menor alteração na qualidade das carnes (Tesser, 2009).

As bactérias Gram negativas são mais sensíveis à inibição pelo CO₂ do que as Gram positivas, sendo as pseudomonas classificadas como as mais sensíveis, e os clostrídios, como os mais resistentes. Em carnes, durante o armazenamento prolongado, o CO₂ provoca uma mudança considerável em sua microbiota, variando de uma microbiota predominantemente formada por microorganismos Gram negativos, nos produtos frescos, para uma principalmente, ou exclusivamente, formada por Gram positivos (Jay, 2005). Fungos, leveduras e bactérias aeróbias deteriorantes são altamente suscetíveis ao CO₂. As bactérias facultativas podem ou não ser inibidas pelo CO₂, enquanto as bactérias ácido-láticas e anaeróbias são altamente resistentes (Finne, 1982).

Segundo Church (1995), a embalagem a vácuo possui a vantagem de ser uma técnica simples, porém, a compressão que causa no alimento pode diminuir sua forma original e/ou aumentar o exsudato da carne.

2.6 O desafio para o ensino da cirurgia veterinária

Após a criação da lei Arouca (nº 11.794) e o estabelecimento das CEUAs, as quais controlam as atividades de ensino e pesquisas universitárias envolvendo animais, houve necessidade ainda maior da busca por métodos alternativos e éticos para o ensino e pesquisa que envolva animais.

Para a substituição do uso de animais vivos no ensino da cirurgia veterinária, vários métodos alternativos vêm sendo empregados sem que tragam prejuízo ao ensino das técnicas cirúrgicas (Rocha et al., 2019). Para isso, o trabalho conjunto das áreas de anatomia e cirurgia permitem a preservação adequada de cadáveres e ensino de excelência (Groscurth et al., 2001).

Modelos de ensino utilizando-se cadáveres humanos é parte histórica da cirurgia. Seu uso é secular e continua sendo o método de treinamento mais eficaz devido a exposição à real anatomia e suas variações nos indivíduos, permitindo ao cirurgião em treinamento, apreciar os planos de dissecação e praticar o manuseio real dos tecidos (Stirling et al., 2014).

As técnicas de ensino humanizado em medicina veterinária vêm sendo utilizadas opondo-se à utilização de animais vivos na prática da técnica cirúrgica. O cadáver deve ser o mais semelhante possível em relação aos animais vivos, para que as técnicas estudadas possam ser utilizadas posteriormente em procedimentos cirúrgicos. A utilização de cadáveres, em determinadas situações, promove maior aprendizado, aumento na eficiência, diminuindo os custos, além da repetitividade do exercício, aprimorando as habilidades. O aumento da confiança e satisfação do aluno devido à diminuição do estresse durante o procedimento cirúrgico com cadáveres, beneficia o processo como um todo, desde que a fonte de cadáveres seja ética, e os animais sejam submetidos à eutanásia por razões médicas, morte natural ou acidentes (Silva et al., 2004; Knight, 2007).

Segundo Carpenter et al. (1991), o uso de cadáveres deve ser integrado ao modelo de ensino como um treinamento das técnicas cirúrgicas necessárias

a serem executadas nos animais vivos posteriormente, não indicando, alterações na performance cirúrgicas dos alunos. Silva et al. (2007) reportaram que houve 95,7% de aceitação dos alunos em relação a utilização de cadáveres quimicamente preparados e, 88,9% consideraram muito satisfatório o aprendizado utilizando-se os cadáveres. Em outro estudo, houve 93,29% de aceitação a favor desse método de ensino com cadáveres quimicamente preparados (Silva et al., 2004).

Para que isso seja possível são utilizados animais que vieram a óbito em hospitais veterinários, abrigos, clínicas e que seriam descartados. Eles são fixados e utilizados como substitutos de animais vivos, com isto o respeito aos direitos dos animais e a consciência da bioética entre alunos, professores, pesquisadores e quaisquer profissionais que trabalhem com animais serão preservados (Silva et al., 2007; Mathews et al., 2010)

No Brasil, 75,67% dos estudantes da Faculdade de medicina veterinária de Jaboticabal, aprovaram o uso de cadáveres quimicamente preservados (com álcool etílico na fixação e solução de cloreto de sódio em tanques para conservação) no ensino de cirurgia e 81,08% eram a favor do treinamento cirúrgico inicial em cadáveres, seguido de prática em animais submetidos à cirurgia eletiva no Hospital Veterinário da Unesp (Rocha et al., 2019).

2.7 Análise biomecânica de tecidos de animais

A análise dos tecidos é realizada por testes em máquinas universais de ensaios mecânicos que aplicam forças uniaxiais como os testes de tração, flexão e compressão dos corpos de provas, gerando dados computacionais e tabelas (Souza, 1982).

O interesse pelas propriedades biomecânicas dos tecidos biológicos de animais vem crescendo, dando-se enfoque a estudos comparativos entre tecidos conservados quimicamente e frescos, na busca de material biológico alternativo para implantes e novas opções de modelos de experimentação (Camargo et al. (2014).

A solução supersaturada de açúcar a 300%, ao ser utilizada na conservação de peritônio de paca, mostrou-se eficaz, garantindo a melhoria da maleabilidade do material no ato cirúrgico (Leal et al., 2014).

Ao compararem peritônio de paca (*Cuniculus paca*) fresco e conservado em glicerina 98%, observou-se melhora da propriedade tênsil do peritônio conservado, sugerindo sua utilização como mais uma opção de material biológico para o uso em cirurgias reconstrutivas (Camargo et al., 2014).

Rocha et al. (2016) determinaram que a fixação alcoólica (de 30 a 120 dias) e a conservação em solução de cloreto de sódio (por até 120 dias) de cadáveres de cães causam pouca variação na resistência da pele e jejuno, segundo dados biomecânicos pelo teste de tração, mantendo-os de maneira semelhante aos cadáveres frescos, visando as práticas cirúrgicas. Os cadáveres foram avaliados por graduandos do curso de veterinária durante diversas práticas de cirurgias abdominais, em escores de 0 a 10, registrando-se notas sempre superiores a sete (Rocha et al., 2018). Esta técnica anatômica em cães também permitiu que suas artérias carótidas (Cerqueira et al., 2017) e veias jugulares (Pelógia et al., 2018) fossem avaliadas quanto à sutura e em teste de tração, com ótimos resultados de exequibilidade e baixa contagem microbiológica (Pereira et al., 2019).

Oliveira et al. (2018a) realizaram pesquisas em cadáveres de gatos, sobre fixação etílica (por até 90 dias) e conservação em solução de cloreto de sódio (por até 120 dias), os quais demonstraram ótimo comportamento tecidual biomecânico da pele e intestinos durante todo o processo, com valores similares aos das amostras-controle, de animais frescos e sem qualquer agente fixador/conservante (Oliveira et al., 2018b).

Foi realizada a fixação em álcool etílico (AE) e conservação em solução aquosa de cloreto de sódio a 30% (SACS 30%) em cadáveres de gatos por até 90 dias, e demonstrou-se que a pele dos gatos submetidos ao teste biomecânico permaneceu com os valores similares à amostra fresca. A avaliação dos alunos sempre foi caracterizada por notas maiores de 8 (escala de zero a 10), sendo recomendado o emprego dessa técnica anatômica em de técnica cirúrgica (Fração et al., 2019).

Em um estudo com cadáveres de cães fixados com AEG e conservados em tanques com AE por 30 dias e após transferidos para tanques com SACS 30%, foram realizados testes de biomecânica do jejuno e pele durante 8 meses, concluindo-se que o tecido conservado apresentou características similares ao

dos cadáveres frescos, sendo utilizados nas aulas de técnica cirúrgica com ótima aprovação dos alunos de graduação (Rocha et al., 2018; Rocha et al., 2019).

3. REFERÊNCIAS

Affolter, V.K.; Moore, K. (1994) Histologic features of normal canine and feline skin. **Clinical Dermatology**, v.12, p. 491-497.

Aidani, E.; Aghamohammadi, B.; Akbarian, M.; Morshedi, A.; Hadidi, M.; Ghasemkhani, N.; Akbarian, (2014) A. Effect of chilling, freezing and thawing on meat quality: a review. **International Journal of Biosciences**, v.5, n.4, p.159-169.

Arлуke, A. (2004) The use of dogs in medical and veterinary training: understanding and approaching Student uneasiness. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v.7,n.3,p197–204.

Bacha, W.J. and Bacha, L.M. (2012). **Color atlas of Veterinary Histology**. Third edition. Chapter 8 p. 57-64.

Bacha, W.J.; Wood, L.M. (2003) **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. Segunda edição, Roca, p.195-253.

Blakistone, B.A. **Principles and applications of modified atmosphere packaging of Foods**. New York: Chapman & Hall, 1999.

Bismuth, C.; Gerin, C.; Viguier, E.; Fau, D.; Dupasquier, F.; Cavetier, L.; Carozzo, C. (2014). The biomechanical properties of canine skin measured in situ by uniaxial extension. **Journal of Biomechanics**. v. 47, p.1067–1073.

Brasil. Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e estabelece as normas para seu funcionamento e de sua Secretaria Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. Diário Oficial da União. 16 de julho 2009;(134):Seção 1; p. 2-5.

Brasil. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Diário Oficial da União, 9 de outubro de 2008;(196):Seção 1; p.1-4.

Brun, M.V.; Pippi, N.L.; Dreimeier, D.; Contesini, E.A.; Beck, C.A.C.; Cunha, O.; Pinto Filho, S.L.; Roehsig, C.; Stedile, R. (2002) Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, n.32, p.1019-1025.

Brun, M.V.; Pippi, N.L.; Driemeier, D.; Contesini, E.A.; Beck, C.A.C.; Cunha, O.; Pinto Filho, S.L.; Roehsig, C.; Stedile, R.; Silva, T.F. (2004) Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. **Ciência Rural**, n. 34, p.147-153.

Calamares Neto, J.E.; Colombo, T.E. (2015) Isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas conservadas em formol. **Journal Health Science Institute** v. 33, n. 3, p. 218-222.

Camargo, D.C.; Camargo, P.C.; Leal, L.M.; Filho, S.P.G.; Martins, L.L.; Shimano, A.C.; Machado, M.R.F. (2014) Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*) a fresco e conservado em glicerina 98%. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n.34, v.2, p.185-191.

Carpenter, L.G.; Donald, L.; Piermattei, D.L.; Salman, M.D.; Orton, C.; NELSON, A.W.; Smeak, D.D.; Jennings, P.B.; Taylor, R.A. A (1991) Comparison of surgical training with live anesthezed dogs and cadavers. **Veterinary Surgery**, v.20, p.373–378.

Cerqueira, E.S.F.; Pelogia, M.E.S.; Silveira, C.P.B.; Fechis, A.D.S.; Rocha, T.A.S.S.; Laus, J. L.; Oliveira, F. S. (2017). Suture analysis and arterial traction test in dogs fixed on alcohol and preserved on saline solution aiming surgical practice. **Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Science**. v. 6, p. 292-295.

Church, I.J.; Parsons, A.L. (1995) Modified atmosphere packaging tecnology: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 67, p. 143-152.

Corrêa, W.R. (2003) Isolamento e identificação de fungos filamentosos encontrados em peças anatômicas conservadas em solução de formol a 10%. 59 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)** – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

Cury FS, Censoni JB, Ambrósio CE (2013) Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal **Pesquisa Veterinária Brasileira** n.33, v.5, p.688-696.

Farber, J.N.; Harris, L.J.; Parish, M.E.; Beuchat, L.R.; Suslow, T. V.; Gorney, J.R.; Garrett, E.H.; Busta, F.F. (2003) Microbiological Safety of Controlled and Modified Atmosphere Packaging of Fresh and Fresh-Cut Produce **Comprehensive Reviews. Food Science and Food Safety**. v. 2, p.142-160.

Finne, G. (1982) Modified and controlled-atmosphere storage of muscle foods, **Food Technology**, v. 36, n. 2, p. 128-133.

Floros, J.D.; Matsos, K.I. (2005) **Introduction on modified atmosphere packaging**. In: HAN, J. H. Innovations in food packaging, p. 159-172.

Fração, V.C.; Zero, R.C.; Rodrigues, A.; Ferreira, B.N.; Fechis, A.D.S.; Rocha, T.A.S.S.; Iozzi, M. T.; Oliveira, F. S. (2019). Analysis of the Skin of Cats' Corpses Chemically Prepared with Ethylic Alcohol and Curing Salt Aiming Veterinary Surgical Practice - Chronic Effect on Biomechanics and Students' Evaluation. **CPQ Medicine**. v.6, p 01-08.

Gaschen, L. (2011). Ultrasonography of Small Intestinal Inflammatory and Neoplastic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.41, p. 329–344.

Griffin, S. (2019). Feline abdominal ultrasonography: what's normal? what's abnormal? The biliary tree. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 21, p 1039-1046.

Groscurth, P.; Eggli, P.; Kapfhammer, J.; Rager, G. J.; Hornung, P.; Fasel, J.D.H. (2001) Gross Anatomy in the Surgical Curriculum in Switzerland: Improved Cadaver Preservation, Anatomical Models, and Course Development. **The Anatomical Record (New Anat.)**. n. 265, p. 254–256.

Hayashi, S.; Homma, H.; Naito, M.; Oda, J.; Nishiyama, T.; Kawamoto, A.; Kawata, S.; Sato, N.; Fukuhara, T.; Taguchi, H.; Mashiko, A.; Azuhata, T.; Ito, M.; Kawai, K.; Suzuki, T.; Nishizawa, Y.; Araki, J.; Matsuno, N.; Shirai, T.; Qu, N.; Hatayama, N.; Hirai, S.; Fukui, H.; Ohseto, K.; Yukioka, T.; Itoh, M. (2014) Saturated Salt Solution Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. **Medicine Journal** v.93 n. 27.

Hayashi, S.; Naito, M.; Kawata, S.; Qu, N.; Hatayama, N.; Hirai, S.; Itoh, M. (2016) History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. **Anatomical Science International Journal** v.91, p.1–7.

Iamarino, L.Z.; Oliveira, M.C.; Antunes, M.M.; Oliveira, M.; Rodrigues, R.O.; Zanin C.I.C.B; Schimile. M.; LIMA, A.A. (2015) Nitratos em Produtos Cárneos Enlatados e/ou Embutidos. **Gestão em Foco**, n. 07.

Janczyk, P.; Weigner, J.; Becker, A.L.; Kaessmeyer, S.; Plendl, J. (2011) Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy - A study based on histo and microbiological analyses. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**. v.193, p.71–75.

Jay, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Knight, A. (2007) The Effectiveness of Humane Teaching Methods in Veterinary Education. **ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation** Tokyo. v. 24, n. 2, p. 91-109.

Kristensen, S. (1975) A study of skin disease in dogs and cats. I. Histology of the hair skin of dogs and cats. **Nord. Vet. Med**. V.27, p.593-603.

Krug, L.; Pappen, F.; Zimmermann, F.; Dezen, D.; Rauber, L.; Semmelmann, C.; Roman, L.I.; Barreta, M.H. (2011) **Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira**. Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, p.1- 6.

Leal, L.M.; Ferreira, A.R.S.; Reis, A.C.G.; Martins, L.L.; Filho, S.P.G.; Machado, R.F.O (2014) Uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1383-1391.

Leonel, F.R. **Irradiação e qualidade da carne de frango congelada e embalada a vácuo**. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal, SP. 2008.

Mantilla, S.P.S; Borges, S.M.; Vital, H. (2010) Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica Ciência Agrário Ambiente**, Curitiba, v.8, n.4, p.437-448.

Manschot, J.F.M.; Wijn, P.F.F. and Brakkee, A.J.M. (1982) The angular distribution function of the elastic fibres in the skin as estimated from in vivo measurements. **Biomechanics: Principles and Applications**. Selected Proceedings of the 3rd General Meeting of the European Society of Biomechanics, Nijmegen, The Netherlands,

Mathews, K.G.; Riley, K.; Lascelles, B.D.X.; Dernell, W.S. (2010) Preparation of Canine and Feline Cadavers for Surgical Laboratories. **Veterinary Surgery**. v.39, p.224–225.

Meyer, W.; Neurand, K. (1987) A comparative scanning electron microscopic view of the integument of domestic mammals. **Scanning Microscopy**. v.1, p.169-180

Oliveira, L.N.; Rodrigues, G.S.; Gualdi, C.B.; Feijó, A.G.S.A (2013) Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. **Revista Bioethikos**. n.7, v. 2, p. 139-149.

Oliveira, F.S. (2014) Assessing the effectiveness of 30% sodium chloride aqueous solution for the preservation of fixed anatomical specimens: a 5-year follow-up study. **Journal of Anatomy**. n.225, p.118—121.

Oliveira, F.S.; Zero, R.C.; Rocha, T.A.S.S.; Cardozo, M.V.; Ávila, F.A.; Machado, M.R.; Shimano, A.C. (2018a) Chemically prepared cat cadavers – biomechanical analysis of the skin. In: **Congress of the European Association of Veterinary Anatomists**, Hanover, Alemanha.

Oliveira, F.S.; Zero, R.C.; Rocha, T.A.S.S.; Machado, M.R.F.; Kihara, M.R.; Santos, C.C.C. (2018b) Chemically prepared cat cadavers – biomechanical analysis of the jejunum. In: **Congress of the European Association of Veterinary Anatomists**, Hanover, Alemanha.

Pelógia, M.E.S.; Cerqueira, E.S.F.; Silveira, C.P.B.; Rolim, G.S.; Fechis, A.D.S.; Rocha, T.A.S.S.; Laus, J.L.; Oliveira, F.S. (2018). Suture and venous traction test analysis in dogs fixed in alcohol and preserved in saline solution. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 38(9), p. 1834-1837.

Pereira, N.; Cardozo, M.V.; Rocha, T.A.S.S.; Ávila, F.A.; Machado, M.R.F.; Oliveira, F.S. (2019) Microbiological analysis of a new anatomical specimen preparation technique for use in veterinary surgery. **Semina – Ciências Agrárias**. v. 40, n. 6, p. 3099-3106.

Rocha, T.A.S.S.; Dias, L.G.G.G.; De Nardi, A.B.; Minto, B.W.; Moraes, P.C.; Oliveira, F.S. (2016) Cadáveres de cães preparados com álcool etílico e cloreto de sódio no ensino da técnica cirúrgica - avaliação dos graduandos em medicina veterinária In: **XXVII Congresso Brasileiro de Anatomia, Natal, RN**.

Rocha, T.A.S.S.; Yanagihara, G.R.; Shimano, A.C.; Rolim, G.S.; Santos, C.C.C.; Fechis, A.D.S.; Oliveira, F.S. (2018). Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. **The Journal of Plastination**. v.30, p.16-23.

Rocha, T.A.S.S.; Santos, C.C.C.; Iozzi, M.T.; Dias, R.S.; Zero, R.C.; Cardozo, M.V.; Oliveira, F.S. (2019) Chemically prepared dog cadavers in teaching of surgical technique - evaluation by students of a veterinary medicine course. **Acta Scientiae Anatomica**, v1, p.136-140.

Rodrigues, H. (2010) **Técnicas anatômicas**. GM GRÁFICA & EDITORA. Vitória-ES. 269p.

Rosset, R. (1994) Otras carnes y productos cárnicos. In: BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J., org. **Microbiología Alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria**. Zaragoza: Acribia, p.247-261.

Scott, D.W. (1980) Feline dermatology 1900-1978: A monograph. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.16, p.331.

Scott, D.W.; Miller, D.H.; Griffin, C.E. (2001) **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6th ed. Saunders, Philadelphia. 1528p.

Silva, R.M.G.; Matera, J.M.; Ribeiro, A.A.C.M. (2004) Preservation of cadavers for surgical technique training. **Veterinary Surgery**. v.33, p. 606–608.

Silva, R.M.G.; Matera, J.M.; Ribeiro, A.A.C.M. (2007) New Alternative Methods to Teach Surgical techniques for Veterinary Medicine Students despite the Absence of Living Animals. Is that an Academic Paradox? **Anatomia, Histologia, Embryologia**. v. 36, p. 220–224.

Solomon, W.R. (1975) Assessing fungus prevalence in domestic interiors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.56 n.3 p.235-242.

Souza, S.A. Ensaio de tração. In: **Ensaaios mecânicos de material metálico**. 3ª ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, 1982, cap.1, p. 3-58.

Stirling, E.R.B.; Lewis, T.L.; Ferran, N.A. (2014) Surgical skills simulation in trauma and orthopaedic training. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. V.9 p.126-135.

Tesser, E.S. (2009) **O uso de diferentes tipos de embalagem na conservação de carnes bovinas**. Monografia – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Werdelmann, R.; Geric, B. (2016) Preservation of specimens for students – formaldehyde vs. Salt based fixative. In: **XXXIth Congress of the European Association of Veterinary Anatomists**. University of Veterinary Medicine Vienna, Austria Vienna, Áustria.

WHO – World Health Organization – (1991) IPCS International Programme on Chemical Safety Formaldehyde - Health and Safety Guide. n.57.

CAPÍTULO 2 – Biomechanics and microbiological analyses of chemically prepared cats kept on vacuum aiming surgery practicing¹

ABSTRACT

In order to replace live animals in veterinary surgery practicing, alternative methods have been applied. This research quantified microorganisms during conservation and the resistance and elasticity of the skin and jejunum in chemically prepared cats' cadavers comparing to fresh corpses, considered suitable for surgical practicing. Cadavers were injected with 120 mL/kg of a 20% sodium chloride, 1% nitrite and 1% sodium nitrate solution, and 150 mL/kg of alcohol with 5% glycerin and kept in vacuum packages between 0 to 4°C. Samples of the skin and jejunum were collected on day 0 (fresh samples/before fixation), and on days 30, 60, 90, and 120, and the fluid in the plastic packages were microbiologically analyzed. The maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (RE) of the control samples of skin and the jejunum were 294.14N, 9.84mm, 28.05N, 4.84mm, during conservation, 215.10N, 7.93mm, 24.94N, 5.62mm (D30), 268.41N, 7.70mm, 25.71N, 4.42mm (D60), 197.75N, 7.80mm, 25.46N, 5.50mm (D90), 209.14N, 7.81mm, 25.18N, 5.20mm (D120), respectively. The Tukey test of the skin MRF was different from the control in all moments, except on D60. And also, the RE was different in all moments. There was no difference between control and conservation moments of the jejunum in MRF, RE was different from the control only on D60. The microbial population did not exceed 4.0×10^2 CFU/mL in total aerobics and 8.8×10^2 CFU/mL in total anaerobes. Biomechanics was not significantly affected during conservation, and the microbiological count was low, demonstrating the effectiveness of this technique for surgery training.

Keywords: anatomy, bacteria, conservation, curing salt.

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido ao Anatomical Sciences Education e encontra-se em avaliação para publicação.

INTRODUCTION

There are several alternative methods to avoid the use of live animals without cause losses to the practice of surgery training (Rocha et al., 2019). Solutions with ethanol and sodium chloride have been tested in surgery of soft tissues (Rocha et al., 2018; Rocha et al., 2019) or in veins (Pelogia et al., 2018) and arteries (Cerqueira et al., 2017) of dogs and cats' cadavers, presenting excellent microbiological control (Pereira et al., 2019). The 30% sodium chloride solution proved to be excellent to preserve formaldehyde-fixed anatomical specimens (Oliveira, 2014) previously but not for surgery training.

For more than 5,000 years, concern about the preservation of anatomical specimens improved the training of surgery practices (Cury et al., 2013). It is necessary to apply chemical fixation to preserve specimens for a long time, without the proliferation of pathogens, to keep tissues firm, insoluble, and protected (Calamares Neto and Colombo, 2015).

The most applied substances for specimen preservation are formaldehyde, glycerin, ethyl alcohol, and phenol (Rodrigues, 2010). Formaldehyde is a cheap substance, one of the most common preservatives in anatomy laboratories, and readily penetrates tissue (six mm in twelve hours). It makes specimens darker, as well as friable and difficult to handle. This substance presents bactericidal, fungicidal, virucidal, and sporicidal effects (Calamares Neto and Colombo, 2015) and is considered carcinogenic, teratogenic, and may cause contamination into the environment (Who, 1991).

Vacuum packaging is a good preservation technique in meat products (Farber et al., 2003) because it inactivates aerobic bacteria, which cause deterioration. It tolerates an extended storage period and higher product quality. However, anaerobic bacteria can survive, and refrigeration is necessary to minimize this problem (Mantilla et al., 2010).

Nitrite, nitrate, sodium chloride, and sugars salts are additives that contribute to reddish color of cured meat, besides causing bacteriostatic effect and maintaining its

physical and chemicals characteristics. Also, nitrite preserves meat against bacterial deterioration, mainly inhibiting the growth of *Clostridium botulinum*, which can cause infections and foodborne illness or botulism (Iamarino et al., 2015).

Fresh corpses are good models to simulate reality for surgery training; however, they need to be kept under refrigeration due to rapid putrefaction. Saturated salt solutions have proven to be a simple method, with low risk of infection and low cost to preserve corpses for surgical training (Hayashi et al. 2014; Hayashi et al., 2016).

This research determined the maximum rupture force (in Newtons - N) and the rupture elongation (mm) of the skin and jejunum, in cat corpses chemically prepared with ethyl alcohol, curing salt and vacuum packed for comparison with fresh corpses, considered suitable for surgical practicing. Microbiological identification throughout the conservation for four months was performed.

MATERIAL AND METHODS

Nine cat corpses weighing 4.17 ± 0.60 , males and females, were used and obtained from the Zoonosis Control Center in Ribeirão Preto, SP, in a process approved by the Law Department (process 02.2014.000027-1) and by the local ethics committee for use (process 4593/19). Animals were frozen (freezer at -18°C) after death and transported to the Laboratory of Animal Anatomy at UNESP Jaboticabal, SP, located 50 km away.

Animals' body score was 5 (palpable ribs without excessive adipose coverage, when viewed from above; the waist is seen behind the ribs, and the abdomen can be seen retracted from the side), on a scale of 1 to 9, considered as an ideal body score for cats by Laflamme (1997).

Corpses were thawed in tap water for 12h and shaved. Three fragments of the fresh skin and jejunum were collected (control samples) for immediate biomechanical analysis. After obtaining (D0), each cadaver received via common carotid artery, 150

ml/kg pure ethyl alcohol with 5% glycerin (EA) , and after 120 ml/kg of curing salt solution, containing 200 g/l of sodium chloride, 10 g/l of sodium nitrite and 10 g/l of sodium nitrate and then (CSS). Then, corpses were individually put in vacuum plastic packages (Figure 1) in a professional machine (CETRO DZ Q600 DE), and refrigerated between 0 and 4°C.

The chronic effect of vacuum conservation was evaluated with tissue samples taken monthly for four months. After samples were collected, corpses were put again in vacuum packages under refrigeration.

For skin collection, corpses were positioned in right lateral decubitus. A scalpel and a 1x5cm steel mold were used perpendicular to the tension lines, on the lateral of the chest, parallel, and 5cm away from the median plane. Three samples were collected longitudinally (craniocaudal), which is the direction that provides higher tensile strength (Haar et al. 2013), as demonstrated in the sheep (Jacinto et al. 2004). Also, three 1x5cm fragments of the jejunum from each animal were collected longitudinally.

To assess tissue resistance, an EMIC® Universal Testing Machine - model DL-2000 was used. The load cell was the 500 N, the load application speed was 100 mm/min, and the free space between the grips of the material was 20 mm. The equipment belongs to the Surgical Anatomy Laboratory of the Department of Animal Morphology and Physiology of FCAV - UNESP – Jaboticabal (Figure 2).

The fluid was monthly collected during the conservation period (every month, four months) from the plastic bags of 4 corpses, randomly chosen, for microbiological analysis. The surface plating technique was used to quantify viable facultative aerobic and anaerobic bacteria. In this technique, the fluid was diluted up to 5 times, and from each dilution, 100µl was used as an inoculum and distributed on sterilized plates on the agar culture medium. Plates for counting aerobic microorganisms were stored directly in

a bacteriological incubator. While plates for counting anaerobic microorganisms were stored in anaerobic jars using Anaeroback (Probac), both incubated at 37 °C for 24 h. After this period, the colony-forming units (CFU) were counted per mL using a magnifying glass (Vanderzant and Splittstoesser, 1992). Five colonies isolated from each plate on BHI agar (Brain Heart Infusion), with different phenotypic characteristics, which was incubated at 37°C for 24 hours for later identification of the genera *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* species, and *Clostridium* sp.

Selective culture media shown for the genera analyses SPS agar (sulfite-polymyxin-sulfadiazine), for identification of the genus *Clostridium*; Mac Conkey agar, for evaluation of *Pseudomonas* and *Escherichia coli*; and MYP Base Agar (mannitol-yolk-polymyxin) for isolation of *Bacillus*. Cultures were evaluated for cell morphology, presence of spores, and Gram classification, after 24 hours of incubation at 37°C (Barrow and Feltham, 1993).

RESULTS

Mean, and standard deviation of the maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (RE) for skin and jejunum rupture are shown in tables 1 and 2.

Outliers were removed, and data were analyzed by Cramer-Von Mises test. Then, ANOVA and Tukey's test (5%) were performed.

All analyses were performed using the R 3.6.1 software for Windows. Box cox transformation of the data to guarantee homoscedasticity, when necessary. A Cramer-Von Mises normality test was taken, and the parametric distribution of data was confirmed ($p > 0.05$). For the skin maximal force ($P = 0.73$) and elongation ($P = 0.33$) and for the jejunum maximal force ($P = 0.63$) and elongation ($P = 0.61$).

ANOVA was subsequently taken to analyze the maximal force (N) and elongation (mm) for the skin maximal force ($P = 0.0013$) and elongation ($P = 0.0006$), and the jejunum

maximal force ($P=0.8394$) was non-significant at 5% and elongation ($P=0.0087$). The Tukey test of the skin MRF was different from the control in all moments, except on D60 (60 days). And also, the RE was different in all moments, as shown on table 1. There was no difference between control and conservation moments of the jejunum in MRF ($p=0.8394$), RE was different from the control only on D60 ($p=0.0087$), as shown in table 2.

The microbial population was presented in all moments (30, 60, 90, 120 days), but never exceeding $4,0 \times 10^2$ CFU/mL (colony-forming units) of total aerobes and $8,8 \times 10^2$ CFU/mL of total anaerobes, and 4 of 16 samples did not present contamination as demonstrated on table 3.

DISCUSSION

The use of this anatomical technique allowed the conservation of cats' corpses up to 120 days. The results were similar to the research that used the same fixative and conservative solution (Fração et al. 2019). The skin did not become dark or rigid, differently when fixatives with formaldehyde are used (Groscurth et al., 2001, Hayashi et al., 2015), and soft tissues presented good quality, like human cadavers fixed with alcohol (Goyri-O'Neill et al., 2013).

In our research with cats weighting 4.17 ± 0.60 kg, the MRF of the skin was 294.15N (fresh/control samples) and 209.14N after 120 days, what is compatible to another study of cats weighting 3.58 ± 0.63 kg, using the same anatomical technique but with no vacuum, in which the MRF of skin ranged from 254.19 ± 183.25 N (fresh/control samples) to 234.68 ± 108.17 N, after 90 days of conservation (Fração et al. 2019). In dogs weighting 7.6 ± 2.7 kg, the MRF of skin ranged from 131.3N (fresh samples) to 177.5 N (after 90 days of ethylic fixation) or 132.4N (after 120 days of conservation on a 30%

sodium chloride solution, after ethylic fixation), representing a skin much more resistant in cats, even if they are lighter than dogs (Rocha et al., 2018).

The MRF in the jejunum of dogs weighing $20.07 \pm 8.00 \text{ Kg}$ (23.30 N) (Queiroz et al., 2019) or $7.6 \pm 2.7 \text{ Kg}$ (27.6 N) (Rocha et al., 2018) was similar to the MRF in cats' jejunum (28.05 N) weighting $4.17 \pm 0.60 \text{ kg}$. The lower MRF in the intestine compared to fresh cats' skin ($254.15 \pm 183.25 \text{ N}$) (Fração et al., 2019) or dogs' skin ($131.3 \pm 75.6 \text{ N}$) (Rocha et al., 2018). The elasticity and resistance (extensibility) of the skin is mainly dictated by the properties of the corneal layer of the epidermis, and the tensile strength of the skin are considered to be due to type I collagen fibers, in the deeper layer of the dermis (Bismuth et al., 2014). The jejunum is composed of smooth musculature that is poor in collagen fibers, becoming less elastic and resistant (Bacha and Bacha, 2012).

The concentration for bacteriae to cause disease in the host is 10^9 CFU/mL (Rigobelo et al., 2016). In experiments with probiotics, the concentration to cause benefits should be $\geq 10^8 \text{ CFU/g}$ (Kuru et al., 2017). This data shows that to cause the effect, whether positive through probiotics or negative through pathogens, the amount of CFU must be above 10^8 CFU/g . Also, there are sanitary microbiological standards for foods that set limits on the count of microorganisms in fruits, vegetables, meat, fish, milk, and dairy products, among others. The tolerance varies according to the microorganism but reaches up to 10^2 CFU/g (Brasil, 2001). In our research, the microbial population never exceeded $4.0 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$ of total aerobes and $8.8 \times 10^2 \text{ CFU/mL}$ of total anaerobes. Our bacterial counting was similar to a study using dogs fixed with ethylic alcohol and conserved in tanks with a 30% sodium chloride solution in which the contamination did not exceed $9 \times 10^1 \text{ CFU/mL}$ in total aerobes and $7 \times 10^1 \text{ CFU/mL}$ in total anaerobes (Pereira et al., 2019). Fungi were not observed on the samples, maybe because of the vacuum conservation (Mantilla et al., 2010).

CONCLUSION

Biomechanics was not significantly affected during conservation, and the microbiological count was low, demonstrating the possible effectiveness of this anatomical technique on corpses for surgery training.

NOTES ON CONTRIBUTORS

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz is graduated in Veterinary Medicine in 2018 and got a Master Degree at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil in 2020 in Surgical Anatomy.

Alessandra Rodrigues is a Veterinary Medicine student at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Natália Teresina Brandão Costa is a Veterinary Medicine student at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Laura Gusman Soares is a Veterinary Medicine student at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Geovana Coelho Ferreira is a Veterinary Medicine student at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Alisson Denis Senna Fecht is graduated in Veterinary Medicine in 2019 and Resident in Preventive Medicine and Public Health at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

Fabício Singaretti de Oliveira is graduated in Veterinary Medicine (2000) and got a Master (2002) and Doctoral Degree (2004) in Surgical Anatomy. Nowadays, he is a Professor of the Department of Animal Morphology and Physiology at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

REFERENCES

- Bacha WJ and Bacha LM (2012). Color atlas of Veterinary Histology. In: Chapter 8, 3rd ed. New York, John Wiley & Sons Inc. p .57-64.
- Barrow GI and Feltham RKA. 1993. Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University. p. 331.
- BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.
- Bismuth C, Gerin C, Viguier E, Fau D, Dupasquier F, Cavetier L, Carozzo C. 2014. The biomechanical properties of canine skin measured in situ by uniaxial extension. *J.Biomech.* 47:1067-1073.
- Calamares Neto JE and Colombo TE. 2015. Isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas conservadas em formol. *J. Health Sci Inst.* 33:218-222.
- Cerqueira ESF, Pelogia MES, Silveira CPB, Fechis ADS, Rocha TASS, Laus JL, Oliveira FS. 2017. Suture analysis and arterial traction test in dogs fixed on alcohol and preserved on saline solution aiming surgical practice. *Global Adv Res J Med Medical Sci.* 6:292-295.
- Cury FS, Censoni JB, Ambrósio CE. (2013). Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal. *Pesq. Vet. Bras.* 33:688-696.
- Farber JN, Harris LJ, Parish ME, Beuchat LR, Suslow TV, Gorney JR, Garrett EH, Busta FF. 2003. Microbiological Safety of Controlled and Modified Atmosphere Packaging of Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2: 142-160.
- Fração VC, Zero RC, Rodrigues A, Ferreira BN, Fechis ADS, Rocha TASS, Iozzi MT, Oliveira FS. 2019. Analysis of the Skin of Cats' Corpses Chemically Prepared with Ethylic Alcohol and Curing Salt Aiming Veterinary Surgical Practice - Chronic Effect on Biomechanics and Students' Evaluation. *CPQ Medicine*, 6:01-08.
- Goyri-O'Neill J, Pais D, Freire de Andrade F, Ribeiro P, BELO A, O'Neill A, Ramos S, Neves Marques C. 2013. Improvement of the embalming perfusion method: The innovation and the results by light and scanning electron microscopy. *Acta Med Port.* 3:188-194.
- Groscurth P, Eggli P, Kapfhammer J, Rager G J, Hornung P, Fasel JDH. 2001. Gross Anatomy in the Surgical Curriculum in Switzerland: Improved Cadaver Preservation, Anatomical Models, and Course Development. *Anat. Record.* 265:254–256.
- Haar G, Buiks SC, Van Delden M, Reijntjes T, Sanchez RF, Kirpensteijn J. 2013. Skin tension. In: Kirpensteijn, J.; Haar, G. Reconstructive surgery and wound management of the dog and the cat. London, p.12-14.

Hayashi S, Homma H, Naito M, Oda J, Nishiyama T, Kawamoto A, Kawata S, Sato N, Fukuhara T, Taguchi H, Mashiko A, Azuhata T, Ito M, Kawai K, Suzuki T, Nishizawa Y, Araki J, Matsuno N, Shirai T, Qu N, Hatayama N, Hirai S, Fukui H, Ohseto K, Yukioka T, Itoh M. 2014. Saturated Salt Solution Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. *Medicine*; 93:1-10.

Hayashi S, Naito M, Kawata S, Qu N, Hatayama N, Hirai S, Itoh M. 2016. History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anatomical Science International*. 91:1–7.

Iamarino LZ, Oliveira MC, Antunes MM, Oliveira M, Rodrigues RO, Zanin CICB, Schimile M, Lima AA. 2015. Nitritos e Nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. *Gestão em Foco*. 7:246-251.

Jacinto MAC, Silva Sobrinho AG, Costa RG. 2004. Características anátomo-estruturais da pele de ovinos (*Ovis áries*) lanados e deslanados, relacionadas com o aspecto físico-mecânico do couro. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33:1001-1008.

Kuru BE, Laleman I, Yalnizoglu T, Kuru L, Teughels W. 2017. The influence of *Bifidobacterium Animalis* Probiotic on gingival health: a randomized controlled clinical trial. *J. Periodontol*. 88:115-1123.

Laflamme D. 1997. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Practice*. 25:13-18.

Mantilla SPS, Borges SM, Vital H. 2010. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. *Rev. Acad.Ciência Agrário Ambiente, Curitiba*. 8:437-448.

Oliveira FS. 2014. Assessing the effectiveness of 30% sodium chloride aqueous solution for the preservation of fixed anatomical specimens: a 5-year follow-up study. *J. Anat*. 225:118—121.

Pelogia MES, Cerqueira ESF, Silveira CPB, Rolim GS, Fechis ADS, Rocha TASS, Laus JL, Oliveira FS. 2018. Suture and venous traction test analysis in dogs fixed in alcohol and preserved in saline solution. *Pesq. Vet. Bras*. 38:1834-1837.

Pereira N, Cardozo MV, Rocha TASS, Ávila FA, Machado MRF, Oliveira FS. 2019. Microbiological analysis in the fixation and preservation of dog cadavers with ethyl alcohol and sodium chloride solution. *Semina: Ciências agrárias*. 40:3099-3106.

Queiroz ABPS, Soares LG, Vieira GC, Del Ponti I, Fechis ADS, Rocha TASS, Oliveira FS. 2019. Biomechanics Analysis of Duodenum, Jejunum and Colon of Dogs' Cadavers. *CPQ Medicine*. 8:1-5.

Rigobelo EC, Cardozo MV, Avila FA, Blackall P J. 2016. An evaluation of the use of probiotics and manure composting as strategies to reduce levels of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Afr. J*. 10:1011-1017.

Rocha TASS, Yanagihara GR, Shimano AC, Rolim GS, Santos CCC, Fechis ADS, Oliveira FS. 2018. Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers

subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. *The Journal of Plastination*. 30:16-23.

Rocha TASS, Santos CCC, Iozzi MT, Dias RS, Zero RC, Cardozo MV, Oliveira FS. 2019. Chemically prepared dog cadavers in the teaching of surgical technique - evaluation by students of a veterinary medicine course. *Acta Scientiae Anatomica*. 1:136-140.

Rodrigues H. 2010. *Técnicas anatômicas*. GM Gráfica and editora. Vitória-ES. p.269.

Vanderzant C and Splittstoesser DE. 1992. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3^aed. Washington: American Public Health Association, p.1219.

WHO – World Health Organization. 1991. *IPCS International Programme on Chemical Safety Formaldehyde - Health and Safety Guide*. n.57.

Table 1. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (N) and rupture elongation (mm) of the skin of chemically prepared cats' corpses kept in the vacuum package up to 120 days.

	D0	D30	D60	D90	D120
Maximum rupture force of the skin (N)	294.14±105.91a	201.08±96.90b	240.69±122.26ab	197.75±62.10c	209.14±73.84bc
The maximum elongation of the skin (mm)	10.36±3.07a	7.67±2.61b	7.52±2.01b	8.28±2.47b	7.61±1.71b

* Moments: D0 (control / fresh samples), D30 (30 days), D60 (60 days), D90 (90 days) and D120 (120 days). Means followed by the same letter in the same column do not differ by Tukey's test 5%

Table 2. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (N) and rupture elongation (mm) of the jejunum of chemically prepared cats' corpses kept in vacuum package up to 120 days.

	D0	D30	D60	D90	D120
Maximum jejunum rupture force (N)	28.05±13.36	24.94±10.39	25.71±8.08	25.46±9.88	25.18±6.67
The maximum elongation of the jejunum (mm)	4.84±2.14ab	5.62±2.55a	4.42±1.82b	5.50±2.09ab	5.20±1.62ab

* Moments: D0 (control / fresh samples), D30 (30 days), D60 (60 days), D90 (90 days) and D120 (120 days) Means followed by the same letter in the same column do not differ by Tukey's test 5%

Table 3. Microbiological analysis of the fluid from chemically prepared cats' corpses kept in vacuum up to 120 days.

	Sample	Total aerobes (CFU/mL)	Total Anaerobes (CFU/mL)	Microorganism
D30	C1	3.1 x 10 ²	6.0 x 10	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>E.coli</i>
	C2	3.2 x 10 ²	3.0 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp.
	C5	0	3.0 x 10	<i>Bacillus</i> sp.
	C8	1.0 x 10	8.8 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp. and <i>Bacillus</i> sp.
D60	C1	3.9 x 10 ²	3.0 x 10	<i>Staphylococcus</i> sp. and <i>Bacillus</i> sp.
	C6	4.0 x 10 ²	0	<i>Bacillus</i> sp.
	C7	2.6 x 10 ²	3.0 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp. and <i>Bacillus</i> sp.
	C9	6.1 x 10	0	<i>Bacillus</i> sp.
D90	C2	6.0 x 10	1.0 x 10	<i>Bacillus</i> sp. and <i>E. coli</i>
	C3	2.0 x 10	1.2 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. and <i>E. coli</i>
	C4	4.0 x 10	1.0 x 10	<i>Bacillus</i> sp.
	C6	3.7 x 10 ²	4.2 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp. and <i>Bacillus</i> sp.
D120	C5	3.0x10	3.6x10	<i>Bacillus</i> sp.
	C7	3.6 x 10 ²	4.0 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.
	C9	6.1 x 10	0	<i>Bacillus</i> sp.
	C6	3.9 x 10 ²	5.2 x 10 ²	<i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.



Figure 1. A vacuum-packed cat after fixation with ethyl alcohol and curing salt.

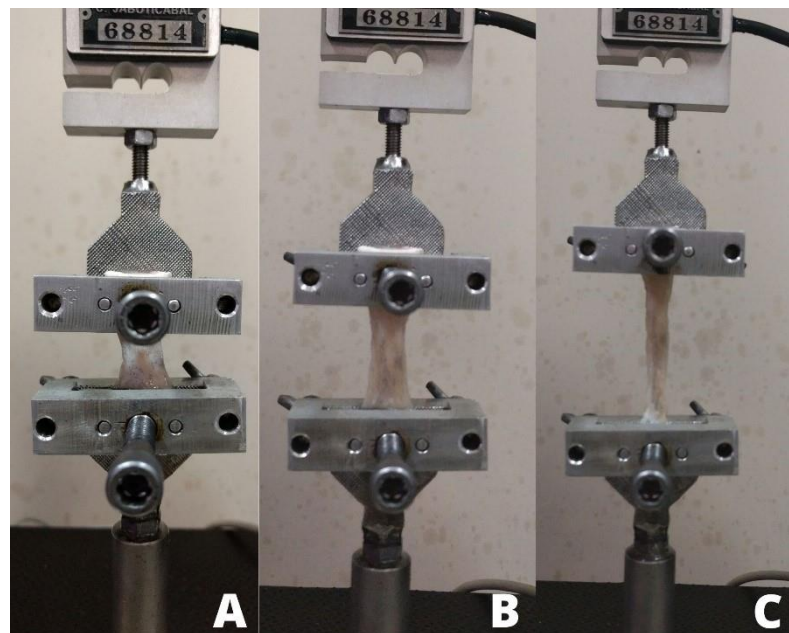


Figure 2. Three consecutive moments (A, B, C) during traction test in a skin sample from an embalmed cats' corpses.

CAPÍTULO 3 – Biomechanical and microbiological analysis of embalmed cats – acute effect of conservation²

Abstract - Teaching and research institutions are looking for alternatives to the use of live animals in practical classes of veterinary surgery due to the risks of zoonoses transmission, ethical considerations, learning effectiveness, hygiene of the professional environment, economic pressures, and adverse publicity. Cadavers were injected with 120 mL/kg of a 20% sodium chloride, 1% nitrite and 1% sodium nitrate solution, and 150 mL/kg of alcohol with 5% glycerin and kept in vacuum packages between 0 to 4°C. Skin and jejunum were collected on day 0 (fresh samples/control), and traction analysis of the samples was performed for seven consecutive days. On the last day, the liquid in the plastic bags was microbiologically analyzed. The Tukey test of skin MRF, the moments D1 and D2 were similar to the control group; the same happened for RE. The jejunum MRF was similar to the control group on D2, D4, and D6. At the same time, the RE was similar in moments D2 and D6. The microbial population did not exceed 6.0×10^4 CFU/mL in total aerobics, and 4.8×10^4 CFU/mL in total anaerobes. Biomechanics was not significantly affected, and the microbiological count was low during conservation, demonstrating the possible effectiveness of this anatomical technique for surgery training.

Keywords: anatomy, bacteria, acute effect, curing salt, surgery

² Este capítulo corresponde ao artigo científico submetido à revista Anais da Academia Brasileira de Ciências e encontra-se em avaliação para publicação.

INTRODUCTION

Teaching and research institutions are looking for alternatives to the use of live animals in practical classes due to the risks of zoonoses transmission, ethical considerations, teaching effectiveness, hygiene of the professional environment, economic pressures, and adverse publicity. For this reason, legal rules were established for the use of these animals in research and classes, thus ensuring their welfare (Arluke 2004).

Alternatives, such as the use of cadavers, promote greater learning, increase efficiency, decrease costs, allow repetition of training, increasing confidence, and satisfaction during surgical practice (Rocha et al. 2019).

Enabling the study using animals for a longer time than autolysis and without the proliferation of pathogens is necessary by fixation and preservation methods. Fixation is crucial as it keeps tissues firm, insoluble, and protected (Calamares Neto & Colombo 2015).

Several preservative solutions can be used in corpses. Thiel's solution is composed of boric acid, ethylene glycol, potassium nitrate, chloromethylphenol, sodium sulfate, and formalin, keeping the cadavers soft and flexible, and the colors similar to the natural (Groscurth et al. 2001; Hayashi et al. 2016). Klotz's solution is composed of sodium chloride, sodium bicarbonate, chloral hydrate, formalin and water; and the Jores' solution is composed of distilled water, formalin, sodium sulfate, potassium sulfate, sodium chloride, sodium bicarbonate, glycerin, and sodium or potassium acetate (Rodrigues, 2010); the modified Larssen solution contains 100 ml of 10% formalin, 400 ml of glycerin, 200 g of chloral hydrate, 200 g of sodium sulfate, 200 g of sodium bicarbonate, 180 g of sodium chloride and 2 liters of distilled water. All of them present formalin in their composition and, consequently, are toxic (Silva et al. 2004).

Fresh corpses present limited handling time due to rapid putrefaction and risk of infection. However, saturated salt solutions have proven to be effective as a conservative

substance, with low cost and contributing to the extensive use of chemically prepared corpses in surgical training (Hayashi et al. 2014).

Food additives such as nitrite, nitrate, sodium chloride, and sugars are applied to keep the red color of cured meat and because they rule as a bacteriostatic agent and keep its physical-chemical properties (Iamarino et al. 2015).

In vacuum packing, the air is completely removed. As the bacteria that most easily affect animal foods are aerobic and cause oxidative reactions, they need oxygen; when air is removed from the package, they do not survive (Mantilla et al. 2010).

In general, Gram-negative bacteria are more sensitive to CO₂ inhibition than Gram-positive bacteria, with *Pseudomonas* sp. being classified as the most sensitive, and *Clostridium* as the most resistant. In meat, during prolonged storage, CO₂ causes a considerable change in the microbiota, ranging from one predominantly formed by Gram-negative microorganisms in fresh products, to other exclusively formed by Gram-positive (Jay 2005). Fungi, yeasts, and deteriorating aerobic bacteria are highly susceptible to CO₂. Facultative bacteria may or may not be inhibited by CO₂, while acid-lactic and anaerobic bacteria are highly resistant (Finne 1982).

This research aimed to evaluate the conservation of cat corpses fixed with ethyl alcohol glycerinated, curing salts as preservatives, vacuum-packed, for the use of a practical class of veterinary surgery. Determined the maximum rupture force (in Newtons - N) and the rupture elongation (mm) of the skin and jejunum, in cat corpses chemically prepared and conserved for seven days, for comparison with fresh corpses, to considered suitable for surgical practicing. And microbiological identification on the last day of conservation.

MATERIALS AND METHODS

Eight cats' corpses, males and females, adults, weighing 3.76 ± 1.27 Kg, and whose death did not involve morphological changes were used. The corpses were obtained from the

Zoonosis Control Center in Ribeirão Preto, SP, in a process already approved by the Municipal Legal Department (process 02.2014.000027-1) and approved by the local ethics committee (process 4593/19). The animals were frozen (freezer at -18°C) after death and then transported to the Laboratory of Animal Anatomy at UNESP Jaboticabal, SP, located 50km away.

The animals' body score was 5 (palpable ribs without excessive adipose coverage, when viewed from above; the waist is seen behind the ribs, and the abdomen can be seen retracted from the side), on a scale of 1 to 9, considered as an ideal score body for cats by Laflamme (1997).

Corpses were thawed in tapping water for 12h, and trichotomy performed, taking attention in not causing any damage to the skin. Three skin and jejunum fragments were collected (fresh/control, before fixation) and were immediately subjected to biomechanical analysis. After collecting the samples (D0), each cadaver received a solution containing 120ml/kg of a solution with curing salt (CS), having 200g/L of sodium chloride, 10g/L of sodium nitrite and 10g/L of sodium nitrate and then, ethyl alcohol with 5% glycerin (EA), in the amount of 150ml/kg of body weight, via the common carotid artery, with a 40x12G cannula. Then, the corpses were individually vacuum-packed (Figure 1) by a professional machine (CETRO DZ Q600 DE), and kept in a horizontal refrigerator between 0 and 4°C, with a digital thermometer attached outside to the refrigerator's sealing lid.

Tissues samples were taken daily for seven days, in addition to fresh samples. Every day, the packages were opened, samples collected, and the animals placed in vacuum packaging again, then kept under refrigeration. For skin harvesting, the corpses were initially positioned in the right lateral decubitus. With a scalpel (blade number 23), a 1x5cm stainless steel mold was bypassed in three sequential skin samples, perpendicular to the tension lines of the cat's skin, on the thorax lateral, and 5cm away from the median plane, which is the direction that

provides higher tensile strength (Haar et al. 2013), as demonstrated in the sheep (Jacinto et al. 2004). Also, three 1x5 cm fragments of the jejunum from each animal were collected in the longitudinal direction, just below the duodenojejunal flexure (Figure 2).

To assess tissue resistance, an EMIC® Universal Testing Machine - model DL-2000, present in our Department, was used. The load cell was 500N, the load application speed was 100 mm/min, and the gap space between the grips was 20mm. The equipment belongs to the Laboratory of Surgical Anatomy of the Department of Animal Morphology and Physiology at São Paulo State University in Jaboticabal.

Microbiological analyses were performed on the last day of conservation (D7) in 3 corpses/packages, always, randomly chosen, in the liquid that leaks during the process. For each analysis, 10mL were collected in previously sterilized bottles and sent to the Microbiology Laboratory of the Institution.

The surface plating technique was used to quantify viable facultative aerobic and anaerobic bacteria. In this technique, samples are diluted five times, 100µl as an inoculum, and distributed on plates of the agar surface, spreading with the drigalski loop. The plates for counting aerobic microorganisms were stored directly in a bacteriological incubator. While the plates for counting anaerobic microorganisms were stored in anaerobic jars using Anaeroback (Probac), both incubated at 37°C for 24h. After this period, the colony-forming unit (UFC) was counted per mL using a magnifying glass (Vanderzant & Splittstoesser 1992). Five colonies isolated from each plate on BHI agar (Brain Heart Infusion), with different phenotypic characteristics, which was incubated at 37°C for 24 hours for later identification of the genera *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli* species, and *Clostridium* sp. Selective culture media sown for the genera analyzes SPS agar (sulfite-polymyxin-sulfadiazine), for identification of the genus *Clostridium*; Mac Conkey agar, for evaluation of

Pseudomonas and *Escherichia coli*; and MYP Base Agar (mannitol-yolk-polymyxin) for isolation of *Bacillus*. Cultures were evaluated for cell morphology, presence of spores, Gram classification, after 24 hours of incubation at 37°C (Barrow & Feltham 1993).

RESULTS AND DISCUSSION

Analyzes were performed using the software R 3.6.1 for Windows, and the outliers were removed. Boxcox transformation of the data was performed to guarantee homoscedasticity. The Cramer-Von Mises normality test ($P=0.1894$) of the residues and Analysis of Variance (ANOVA) at 5% and 1% were performed, in addition to the Tukey test at 5%.

The mean and standard deviation of the MRF and RE for skin and jejunum rupture are shown in tables I and II.

In MRF data, the outliers were removed, and data subjected to box cox transformation ($\lambda=0.6$) using the Cramer-Von Mises test and $p=0.5421$. According to ANOVA ($p=0.06$), there is no significant difference between times (Table III).

In RE data, outliers were removed, and data submitted to box cox transformation ($\lambda=0.25$) with Cram-Von Mises ($p=0.4593$). According to ANOVA, there was no significant difference between different times (Table IV).

The Tukey test of skin MRF, the moments D1 and D2 were similar to the control group; the same happened for RE (Tables I). The jejunum MRF was similar to the control group on D2, D4, and D6. At the same time, the RE was similar in moments D2 and D6 (Table II). Microbiological analysis was performed on three of the eight vacuum corpses packs (Table V).

The use of EA as a fixative agent proved to be efficient for cat corpses, demonstrating adequate conservation and avoiding deterioration, similarly to the reported in dogs' (Rocha et al. 2018) and cats' (Fração et al. 2019) cadavers in surgery training. Also, alcohols used as a fixative in human cadavers from 6 months to 1 year kept tissue quality similar to the one of fresh tissue (Goyri-O'Neill et al. 2013)

The use of 30% SCAS was evaluated in a 5-year study and proved to be efficient in the conservation of fixed tissues, with no visual contamination, unwanted odors, loss of softness, and color (Oliveira 2014). This solution proved to be effective in conserving dogs previously fixed with EA for up to 120 days (Rocha et al. 2018), and in cats fixed with EA and 30% SCAS for up to 90 days (Fração et al. 2019), similar to the findings of this research. In all studies, the salt solution was higher than 20%, as recommended for the efficient conservation of corpses (Friker et al. 2007).

The success of high concentration salt solution may be due to the difficulty of microorganisms to survive in a medium that requires an enormous capacity of osmoregulation, as occurs in the dead sea (Nissembaum 1975).

The use of this technique with 30% SCAS and EA did not generate contamination on effluents and no harmful odors, being a low-cost alternative to the methods that use formaldehyde (WHO 1991; Janczyk et al. 2011; Cury et al. 2013).

The use of formaldehyde to fix corpses causes changes in the color, resistance, and fragility of organs and tissues, making their use limited for surgery training (Groscurth et al. 2001). This research provided, without formaldehyde, cats corpses could be used for one week with no significant changes in tissue biomechanics, in addition to providing good softness and tissue malleability.

During the fixation with EA and conservation of cats' corpses with a 30% SCAS, microbiological contamination had remained low (Pereira et al. 2019), similar to the described in this research. The microbiological counting of the liquid in packages reached 10^4 at maximum, which provides a good health security (Brasil 2001). In an experiment carried out with pathogen inoculum, the concentration used for the bacteria to be able to cause disease in

the host was 10^9 CFU/mL (Rigobelo et al. 2016). When using probiotics, the concentration for bacteria to cause the expected benefits should be over 10^8 UFC/g (Kuru et al. 2017).

In cats weighing 3.58 ± 0.63 Kg, prepared with EA and CSS, and preserved for 90 days, the MRF of skin samples ranged from 254.19 ± 183.25 N (fresh/control samples) to 234.68 ± 108.17 N (after 90 days of conservation) (Fração et al. 2019), while in a study with dogs weighing 7.6 ± 2.7 kg, preserved with 30% SCAS and fixed with AE up to four months, the maximum rupture force was 106.7N to 177.5N (mean 142.1N) (Rocha et al. 2018). In our study with cats prepared with CSS and EA, weighing 3.76 ± 1.27 kg, the MRF ranged from 344.27 ± 102.23 N to 249.70 ± 63.80 N after seven days, demonstrating a higher resistance and elasticity of cats' skin when compared to dogs'.

The MRF of chemically prepared cats' jejunum was 23.39 ± 14.29 N, which was similar to the 21.04 ± 9.49 N in the duodenum, 23.30 ± 9.92 N in the jejunum, and 23.82 ± 7.74 N in the colon of fresh dog corpses weighing 20.07 ± 8.00 Kg (Queiroz et al. 2019).

CONCLUSION

This tested anatomical technique proved to be efficient in keeping biomechanical characteristics of embalmed cat's cadavers, as well as microbiological analyses, were low, demonstrating the possible effectiveness on corpses for surgery training.

REFERENCES

- ARLUKE A. 2004. The use of dogs in medical and veterinary training: understanding and approaching Student uneasiness. *J Appl Anim Welf Sci* 7: 197–204.
- BARROW GI & FELTHAM RKA. 1993. Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. 3.ed. Cambridge: Cambridge University, 331 p.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

CALAMARES NETO JE & COLOMBO TE. 2015. Isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas conservadas em formol. J. Health Sci Inst 33: 218-222.

CURY F.S. CENSONI JB, AMBRÓSIO CE (2013). Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal. Pesq. Vet. Bras 33: 688-696.

FINNE, G. 1982. Modified and controlled atmosphere storage of muscle foods, Food Technol 36: 128-133.

FRAÇÃO VC, ZERO RC, RODRIGUES A, FERREIRA BN, FECHIS ADS, ROCHA TASS, IOZZI MT, OLIVEIRA FS. 2019. Analysis of the Skin of Cats' Corpses Chemically Prepared with Ethylic Alcohol and Curing Salt Aiming Veterinary Surgical Practice - Chronic Effect on Biomechanics and Students' Evaluation. CPQ Medicine 4: 01-08.

FRIKER J, ZEILER E, MCDANIEL BJ. 2007. From formalin to salt. Development and introduction on a salt-based preserving solution for macroscopic anatomic specimens. Tierärztl. Praxis 35: 243–248.

GOYRI-O'NEILL J, PAIS D, FREIRE DE ANDRADE F, RIBEIRO P, BELO A, O'NEILL A, RAMOS S, NEVES MARQUES C. 2013. Improvement of the embalming perfusion method: The innovation and the results by light and scanning electron microscopy. Acta Médica Port 26: 188-194.

GROSCURTH P, EGGLI P, KAPFHAMMER J, RAGER G J, HORNUNG P, FASEL JDH. 2001. Gross Anatomy in the Surgical Curriculum in Switzerland: Improved Cadaver Preservation, Anatomical Models, and Course Development. The Anatomical Record 265: 254–256.

HAAR G, BUIKS SC, VAN DELDEN M, REIJNTJES T, SANCHEZ RF, KIRPENSTEIJN J. 2013. Skin tension. In: KIRPENSTEIJN, J.; HAAR, G. Reconstructive surgery and wound management of the dog and the cat. London, p.12-14.

HAYASHI S, HOMMA H, NAITO M, ODA J, NISHIYAMA T, KAWAMOTO A, KAWATA S, SATO N, FUKUHARA T, TAGUCHI H, MASHIKO A, AZUHATA T, ITO M, KAWAI K, SUZUKI T, NISHIZAWA Y, ARAKI J, MATSUNO N, SHIRAI T, QU N, HATAYAMA N, HIRAI S, FUKUI H, OHSETO K, YUKIOKA T, ITOH M. 2014. Saturated Salt Solution Method: A Useful Cadaver Embalming for Surgical Skills Training. *Medicine Journal* 93: 1-10.

HAYASHI S, NAITO M, KAWATA S, QU N, HATAYAMA N, HIRAI S, ITOH M. 2016. History and future of human cadaver preservation for surgical training: from formalin to saturated salt solution method. *Anat Sci Int* 91: 1–7.

IAMARINO LZ, OLIVEIRA MC, ANTUNES MM, OLIVEIRA M, RODRIGUES RO, ZANIN CICB, SCHIMILE M, LIMA AA. 2015. Nitritos e Nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. *Gestão em Foco* 7:246-251.

JACINTO MAC, SILVA SOBRINHO AG, COSTA RG. 2004. Características anátomo-estruturais da pele de ovinos (*Ovis áries*) lanados e deslanados, relacionadas com o aspecto físico-mecânico do couro. *R Bras Zootec* 33: 1001-1008.

JANCZYK P, WEIGNER J, BECKER AL, KAESSMEYER S, PLENDL J. 2011. Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy - A study based on histo and microbiological analyses. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 193: 71–75.

JAY JM. 2005. Microbiologia de alimentos. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.

KURU BE, LALEMAN I, YALNIZOGLU T, KURU L, TEUGHELS W. 2017. The influence of Bifidobacterium Animalis Probiotic on gingival health: a randomized controlled clinical trial. *J. Periodontol* 88:115-1123.

LAFLAMME D. 1997. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. *Feline Pract* 25:13-18.

MANTILLA SPS, BORGES SM, VITAL H. 2010. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. *Rev. Acad.Ciência Agrário Ambiente* 8: 437-448.

NISSENBAUM A. 1975 The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microb Ecol* 2: 139-161.

OLIVEIRA FS 2014. Assessing the effectiveness of 30% sodium chloride aqueous solution for the preservation of fixed anatomical specimens: a 5-year follow-up study. *J Anat* 225: 118-121.

PEREIRA N, CARDOZO MV, ROCHA TASS, ÁVILA FA, MACHADO MRF, OLIVEIRA FS. 2019. Microbiological analysis of a new anatomical specimen preparation technique for use in veterinary surgery. *Semin Cienc Agrar* 40: 3099-3106.

QUEIROZ ABPS, SOARES LG, VIEIRA GC, DEL PONTI I, FECHIS ADS, ROCHA TASS, OLIVEIRA FS. 2019. Biomechanics Analysis of Duodenum, Jejunum and Colon of Dogs' Cadavers. *CPQ Medicine* v.8, n.1, p.1-5.

RIGOBELLO EC, CARDOZO MV, AVILA FA, BLACKALL P J. 2016. An evaluation of the use of probiotics and manure composting as strategies to reduce levels of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Afr. J.* 10:1011-1017.

ROCHA TASS, YANAGIHARA GR, SHIMANO AC, ROLIM GS, SANTOS CCC, FECHIS ADS, OLIVEIRA FS. 2018. Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. *The Journal of Plastination* 30: 16-23.

- ROCHA TASS, SANTOS CCC, IOZZI MT, DIAS RS, ZERO RC, CARDOZO MV, OLIVEIRA FS. 2019. Chemically prepared dog cadavers in the teaching of surgical technique - evaluation by students of a veterinary medicine course. *Acta Scientiae Anatomica* 1: 136-140.
- RODRIGUES H. 2010. Técnicas anatômicas. GM Gráfica & Editora. Vitória-ES, 269 p.
- SILVA RMG, MATERA JM, RIBEIRO AACM. 2004. Preservation of cadavers for surgical technique training. *Vet Surg* 33: 606–608.
- VANDERZANT C & SPLITTSTOESSER DE. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3^aed. Washington: American Public Health Association, 1219 p.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1991. IPCS International Programme on Chemical Safety Formaldehyde - Health and Safety Guide. n.57.

Table I. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (RE) of the skin samples from cat cadavers chemically prepared and vacuum packaging for up to 7 days.

	MRF (N)	RE (mm)
D0	344.27±102.23 a	7.87±3.05 a
D1	266.95±134.39 a	5.04±2.08 ab
D2	269.48±066.39 ab	5.66±1.26 ab
D3	237.48±087.50 b	4.46±0.99 bc
D4	337.77±083.49 b	6.22±2.66 bc
D5	241.78±086.99 b	5.15±2.47 c
D6	292.18±068.87 b	6.25±1.57 c
D7	249.70±063.80 b	5.41±1.49 c

D0: fresh samples / without preservatives; D1 to D7: 1 to 7 days of storage.

Means followed by the same letter in the same column do not differ by Tukey's test 5%

Table II. Mean and standard deviation of the maximum rupture force (MRF) and rupture elongation (RE) of the jejunum samples from cat cadavers chemically prepared and vacuum packaging for up to 7 days.

	MRF (N)	RE (mm)
D0	23.39±14.29 a	3.98±1.72 a
D1	24.31±11.69 b	4.64±2.11 c
D2	24.56±11.44 ab	4.92±2.01 ab
D3	27.60±07.70 b	3.95±0.90 c
D4	20.08±08.81 a	3.81±1.28 bc
D5	23.35±10.76 b	4.11±1.50 c
D6	19.67±10.02 ab	4.43±1.73 ab
D7	21.08±07.71 b	4.04±2.07 bc

D0: fresh samples / without preservatives; D1 to D7: 1 to 7 days of storage.

Means followed by the same letter in the same column do not differ by Tukey's test 5%

Table III. Analysis of variance of the Maximal Rupture Force of the jejunum of cadavers of cats chemically preserved under the acute effect of conservation for seven days.

	DF	SS	MS	Value F	Value P
Treatments	7	38.61	5.5153	1.971	0.0610
Residues	188	526.06	2.7982		

Table IV. Analysis of variance of the Rupture Elongation of the jejunum of cadavers of cats chemically preserved under the acute effect of conservation for seven days.

	DF	SS	MS	Value F	Value P
Treatments	7	0.2620	0.0374	1.8841	0.0746
Residues	177	3.5157	0.0199		

Table V. Microbiological analysis of the liquid contained in the vacuum packaging from three randomly chosen cadavers.

Samples	Total aerobes (CFU/mL)	Total Anaerobes (CFU/mL)	Microorganism
A4	5.3×10^4	1.4×10^4	<i>Micrococcus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp.
A5	6.0×10^4	4.8×10^4	<i>Bacillus</i> sp. e <i>Klebsiella</i> sp.
A7	1.0×10^3	2.2×10^3	<i>Staphylococcus</i> sp. e <i>Bacillus</i> sp.



Figure 1. A vacuum-packed cat after fixation with ethyl alcohol and curing salt



Figure 2- Jejunum sample collected in the longitudinal direction in an embalmed cats' corpse.