

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CONSERVAÇÃO DE VÍSCERAS DE CÃES VISANDO AO
TREINAMENTO CLÍNICO E CIRÚRGICO – UTILIZAÇÃO DO
VÁCUO E SAL DE CURA**

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz
Médica Veterinária

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**CONSERVAÇÃO DE VÍSCERAS DE CÃES VISANDO AO
TREINAMENTO CLÍNICO E CIRÚRGICO – UTILIZAÇÃO DO
VÁCUO E SAL DE CURA**

Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira

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

2023

Q3c

Queiroz, Andréa Barros Piazzon de Souza

Conservação de vísceras de cães visando ao treinamento clínico e cirúrgico – utilização do vácuo e sal de cura / Andréa Barros Piazzon de Souza Queiroz. -- Jaboticabal, 2023

56 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Fabrício Singaretti de Oliveira

1. Anatomia. 2. Biomecânica. 3. Insuflação pulmonar. 4.
Maleabilidade. 5. Microbiologia. 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.

Impacto potencial desta pesquisa

Com o crescimento da população mundial, o descarte de cadáveres passa a ser uma questão ambiental fundamental quanto ao uso do solo, emissão de poluentes, consumo de recursos e desperdício de materiais. Tornou-se uma fonte de preocupação pública no século XXI, evidente no desenvolvimento de um “movimento funerário verde” no mundo ocidental, que busca um corpo menos impactante e práticas de eliminação, mais ecologicamente corretas. Com este trabalho iremos avaliar a conservação de vísceras isoladas, advindas de necropsias, o que poderá gerar um grande potencial de utilização desses conjuntos no treinamento clínico e cirúrgico com repetibilidade, reduzindo, inclusive, a quantidade de cadáveres utilizados. Também poderemos diminuir a quantidade de material biológico enviado à descarte sanitário, tornando menor o acúmulo de carcaças, a contaminação do solo e dos lençóis freático.

The potential impact of this research

As the world population grows, the disposal of cadavers becomes a fundamental environmental issue regarding land use, pollutant emissions, resource consumption, and waste. It has become a source of the public concerning the 21st century, evident in the development of a “green burial movement” in the Western world, which seeks a less impactful cadaver and more ecologically correct disposal practices. This study aimed to evaluate the conservation of isolated viscera resulting from necropsies, which could generate a great potential for clinical and surgical training, with repeatability. We can also decrease the amount of biological material sent to sanitary disposal, thereby reducing the accumulation of carcasses and contamination of the soil and groundwater.

Certificado de aprovação



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONSERVAÇÃO DE VÍSCERAS DE CÃES VISANDO AO TREINAMENTO CLÍNICO E CIRÚRGICO - UTILIZAÇÃO DO VÁCUO E SAL DE CURA

AUTORA: ANDREA BARROS PIAZZON DE SOUZA QUEIROZ

ORIENTADOR: FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Data: 04/05/2023 08:39:06-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LEANDRO LUÍS MARTINS (Participação Virtual)
Departamento de Anatomia / Universidade Estadual de Londrina (UEL) - Londrina/PR

Documento assinado digitalmente
LEANDRO LUIS MARTINS
Data: 04/05/2023 08:44:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. BRUNO CESAR SCHIMMING (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / IBB UNESP Botucatu

Documento assinado digitalmente
BRUNO CESAR SCHIMMING
Data: 05/05/2023 08:24:01-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Virtual)
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Paola Castro
Paola Castro
Moraes:26766509805
2023.05.04 08:31:08 -03'00'

Profa. Dra. MARCIA RITA FERNANDES MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
MARCIA RITA FERNANDES MACHADO
Data: 24/05/2023 11:58:32-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 27 de abril de 2023

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 o 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 em 2018. Em 2020, concluiu o mestrado em anatomia cirúrgica pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na FCAV – UNESP Câmpus de Jaboticabal, SP, sob orientação do Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira. Iniciou o Doutorado em agosto de 2020 na mesma linha pesquisa e foi responsável pelas disciplinas “Anatomia dos animais domésticos I e II” para o Curso de Zootecnia nos anos de 2020 e 2021. Desde julho de 2022, é Assistente de Suporte Acadêmico do Laboratório de Anatomia Animal do referido Departamento

“Passing over the other arts in silence, I shall speak briefly of that which concerns the health of mankind; indeed, of all the arts the genius of man has discovered it is by far the most beneficial and of prime necessity, although difficult and laborious.”

Andreas Vesalius

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. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, por todos os ensinamentos profissionais e de vida, pela amizade, dedicação, paciência e principalmente pela confiança depositada.

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

Ao Seu Zé e Dona Marilda por todo carinho, amizade e parceria.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	09
1. Introdução	09
2. Revisão de literatura	10
2.1 Fixadores e conservantes em anatomia	10
2.2 Uso de animais em pesquisa e ensino	12
2.3 Aspectos microbiológicos da degradação e conservação de peças anatômicas	15
2.4 Conservantes e vácuo na indústria alimentícia	17
2.5 Descarte das peças anatômicas e carcaças	18
2.6 Análise biomecânica	22
3. Referências	24
CAPÍTULO 2 – Conservation of dog viscera aiming for clinical and surgical training - use of vacuum and curing salt	31
Abstract	33
1 Introduction	34
2 Materials and Methods	34
2.1 The animals	35
2.2 Anatomical Technique	36
2.3 Analysis of Tissue Resistance	37
2.4 Analysis of Insufflation	37
2.5 Statistics	38
2.6 Sampling	38
2.6.1 Microbiological Analysis	38
2.6.2 Quantification	38
2.6.3 Detection of <i>Clostridium sp.</i>	39
3 Results	39
4 Discussion	42
5 Conclusion	45
6 Acknowledgments	45
7 Author Contributions	46
8 References	46

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 **"Conservação de vísceras ocas isoladas de cães visando treinamento cirúrgico - utilização do vácuo e sal de cura"**, protocolo nº 2693/22, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fabrício 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 18 de maio de 2022.

Vigência do Projeto	20/05/2022 a 20/03/2024
Espécie / Linhagem	Cães e gatos
Nº de animais	120
Peso / Idade	3 a 20 Kg
Sexo	Macho e fêmea
Origem	Centro de zoonoses de Ribeirão Preto processo 02.2014.000027-1

Jaboticabal, 18 de maio de 2022.



Profª Drª Paola Castro Moraes
Vice-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

CONSERVAÇÃO DE VÍSCERAS DE CÃES VISANDO AO TREINAMENTO CLÍNICO E CIRÚRGICO – UTILIZAÇÃO DO VÁCUO E SAL DE CURA

RESUMO – Métodos alternativos vêm sendo utilizados para minimizar o uso de animais vivos no ensino e buscam, também, reduzir o número de animais em experimentação. O uso de cadáveres é uma possibilidade como recurso alternativo ao uso de animais vivos para aprendizagem cirúrgica, os quais promovem eficiência prática, melhoram o aprendizado, além de apresentarem menor custo e serem possíveis customizá-los para repetição de técnicas. Objetivou-se, com esse trabalho, avaliar a conservação de conjuntos de vísceras (conjunto pulmão e coração – CPC -, e conjunto estômago, baço e intestinos – CEBI - de cães) com dois tipos de soluções preparadoras em relação à microbiologia, biomecânica ou insuflação pulmonar por até quatro meses. Foram utilizados 16 cadáveres, 8 para o grupo 1 (G1 - Álcool etílico glicerinado e sais de cura) e 8 para o grupo 2 (G2 - sais de cura). Para o CEBI foram quantificadas as alterações na resistência intestinal, medida em Newtons, durante o teste de tração, nos momentos zero (previamente à fixação), 30, 60, 90 e 120 dias de conservação à vácuo e para o CPC foi avaliada a viabilidade pulmonar por meio da insuflação pulmonar. Foi realizada a análise microbiológica do líquido e de fragmento de tecido pulmonar para a quantificação das bactérias mesófilas aeróbias e anaeróbias, leveduras, Enterobacteriaceae, esporulados totais viáveis e presença de *Clostridium*. A força máxima de ruptura (FMR) para o G1 e G2, e o alongamento da ruptura (AR) do G1 e do G2 para as amostras controle do jejuno foram 19,21N, 9,68mm, 18,29N e 13,76mm, respectivamente, e durante a conservação, 23,34N e 9,06mm, 23,27N e 8,37mm (30 dias), 16,79N e 6,15mm, 21,46N e 5,33mm (60 dias), 23,02N e 5,02mm, 27,29N e 5,54 (D90), 28,07N e 5,39mm, 25,96N e 4,51mm (120 dias), respectivamente. Não houve diferença significativa entre a interação Tempo x Tratamento, e os fatores foram examinados individualmente dentro de cada grupo. No G1, os momentos D60, D90 e D120 diferiram significativamente do D0 (controle). Já no G2 houve diferença significativa em todos os momentos em relação ao D0. Não houve diferença significativa entre os tratamentos no D30, D60, D90 e D120 e a diferença observada no D0 não é estatisticamente relevante. A população microbiana não excedeu $9,2 \times 10^3$ UFC / mL no total de bactérias aeróbicas e $1,8 \times 10^3$ UFC/mL no total de bactérias anaeróbicas no G1 e $1,9 \times 10^3$ UFC/mL no total de bactérias aeróbias e $1,33 \times 10^3$ UFC/mL para anaeróbios totais no G2. Enterobacteriaceae foi detectado nas amostras de jejuno em 120 dias na concentração de $2,1 \times 10^2$. A contagem de leveduras nunca ultrapassou $3,4 \times 10^2$ UFC/mL e esporulados, $2,3 \times 10^3$ UFC/mL. A biomecânica não foi significativamente afetada e a contagem microbiológica foi baixa durante os 120 dias, demonstrando a eficácia de ambos protocolos de conservação de vísceras isoladas visando ao treinamento cirúrgico.

Palavras-chave: anatomia, biomecânica, insuflação pulmonar, maleabilidade, microbiologia .

CONSERVATION OF DOG VISCERA AIMING FOR CLINICAL AND SURGICAL TRAINING - USE OF VACUUM AND CURING SALT

ABSTRACT - Alternative methods have been used to minimize the use of live animals in teaching and also seek to reduce the number of animals in experimentation. The use of cadavers is a possibility as an alternative resource to the use of live animals for surgical learning, which promotes practical efficiency and improves learning, in addition to presenting lower cost and being possible to customize them for repetition of techniques. The aim of this research was to evaluate the conservation of sets of viscera (lung and heart set - LHS -, and stomach, spleen, and intestines set - SSIS - of dogs) with two types of preparative solutions in relation to microbiology, biomechanics, or lung inflation for up to 4 months. Sixteen cadavers were used, 8 for group 1 (G1 - glycerin ethyl alcohol and curing salts) and 8 for group 2 (G2 - curing salts). For SSIS, changes in intestinal resistance were quantified, and measured in Newtons, during the traction test, at moments zero (prior to fixation), 30, 60, 90, and 120 days of vacuum storage, and for LHS, the viability was evaluated through lung insufflation. Microbiological analysis of the fluid, lung, and jejunum tissue fragment was performed to quantify aerobic and anaerobic mesophilic bacteria, yeasts, Enterobacteriaceae, total viable sporulates, and the presence of *Clostridium*. The maximum rupture force (FMR) for G1 and G2, and the elongation rupture (AR) of G1 and G2 for jejunum control samples were 19.21N, 9.68mm, 18.29N, and 13.76mm, respectively, and during storage, 23.34N and 9.06mm, 23.27N and 8.37mm (30 days), 16.79N and 6.15mm, 21.46N and 5.33mm (60 days), 23.02N and 5.02mm, 27.29N and 5.54 (D90), 28.07N and 5.39mm, 25.96N, and 4.51mm (120 days), respectively. There was no significant difference between the Time x Treatment interaction, and the factors were examined individually within each group. In G1, moments D60, D90, and D120 differed significantly from D0 (control). In G2, there is a significant difference at all times in relation to D0. There is no significant difference between treatments on D30, D60, D90, and D120; the difference observed on D0 is not statistically relevant. The microbial population did not exceed 9.2×10^3 CFU/mL in total aerobic bacteria and 1.8×10^3 CFU/mL in total anaerobic bacteria in G1 and 1.9×10^3 CFU/mL in total aerobic bacteria and 1.33×10^3 CFU/mL for total anaerobes in G2. Enterobacteriaceae was detected in the jejunum samples in 120 days at a concentration of 2.1×10^2 . The yeast count never exceeded 3.4×10^2 CFU/mL and sporulated, 2.3×10^3 CFU/mL. The biomechanics were not significantly affected and the microbiological count was low during the 120 days, demonstrating the effectiveness of both isolated viscera conservation protocols aimed at surgical training.

Keywords: anatomy, biomechanics, malleability, microbiology, pulmonary insufflation.

LISTA DE ABREVIACÕES

AE.....	Álcool etílico
AEG.....	Álcool etílico glicerinado
AR.....	Alongamento da Ruptura
CEBI.....	Conjunto estômago, baço e intestino
CEUA.....	Comissões de Ética Institucionais ao Uso de Animais
CFU.....	Colony Forming Unit
CPC.....	Conjunto pulmão e coração
CSS.....	Curing Salt Solution
D0.....	Dia zero
D30.....	Trinta dias
D60.....	Sessenta dias
D90.....	Noventa dias
D120.....	Cento e vinte dias
D300.....	Trezentos dias
EA.....	Ethyl Alcohol with glycerin
FCAV.....	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FMR.....	Força máxima de ruptura
G1.....	Grupo 1
G2.....	Grupo 2
kg.....	Quilogramas
LHS.....	Lung Heart Set
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
SSIS.....	Stomach, Spleen and Intestin Set

30% SCAS.....Curing Salt Solution

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Conservation of dog viscera aiming for clinical and surgical training - use of vacuum and curing salt

Table 1. Score of lung insufflation of the LHS chemically prepared.....	50
Table 2 Mean and standard deviation of Maximal Rupture Force (MRF) in Newtons (N) of SSIS chemically prepared and vacuum packed for 120 days.....	50
Table 3. MRF data from the jejunum of SSIS chemically prepared and kept under vacuum for up to 120 days.....	51
Table 4. RE data from the jejunum of SSIS chemically prepared and kept under vacuum for up to 120 days.....	51
Table 5. Mean and standard deviation of RE (mm) of SSIS chemically prepared and vacuum packed for 120 days.....	51
Table 6 Microbiological analysis of the lung tissue of the LHS chemically prepared and preserved for 300 days.....	52
Table 7 Microbiological analysis of LHS liquid from dogs chemically prepared and preserved for 300 days	52
Table 8 Microbiological analysis of jejunum tissue sample of SSIS chemically prepared and preserved for 300 days.....	53
Table 9 Microbiological analysis of the liquid sample present in the packaging of SSIS chemically prepared and preserved for 300	53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 - Conservation of dog viscera aiming for clinical and surgical training - use of vacuum and curing salt

Figure 1- Injection of preservative solutions in the SSIS of dogs.....	54
Figure 2- Injection of preservative solutions in the LHS of dogs	54
Figure 3- Assay machine used for the biomechanical analysis of the chemically prepared jejunum of dog cadavers.....	55
Figure 4- Chemically prepared dog lung being inflated. Images from A to E demonstrate the evolution of lung insufflation by the ambu.....	55
Figure 5- Comparison of MRF between G1 and G2 over time of the jejunum of SSIS chemically prepared for 120 days.....	56
Figure 6- Comparison of RE between G1 and G2 over time of the jejunum of SSIS chemically prepared for 120 days.....	56

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Utilizando os princípios humanitários de experimentação animal que foram sintetizados por Russell e Burch em 1959, métodos alternativos vêm sendo utilizados para minimizar o uso de animais vivos no ensino da Medicina Veterinária. Três palavras foram utilizadas para sintetizar esses princípios, denominados como os 3 Rs': replacement, reduction, e refinement (substituição, redução e refinamento). Esses três conceitos fundamentais buscam alcançar equilíbrio para substituir animais vivos em instituições acadêmicas. Assim, há necessidade da busca por métodos alternativos à utilização de animais vivos, visando reduzir o número de animais necessários em experimentação, assim como na pesquisa (Costa Neto et al., 2012, Rocha et al., 2019), e com possibilidade de repetição de treinamentos (Arluke, 2004, Tannenbaum e Bennett, 2015, Guaraná et al., 2021).

Técnicas de preparo de cadáveres com aspecto realístico têm sido descritas para a prática do treinamento cirúrgico (Rocha et al., 2019), radiológico (Kihara et al., 2023) e de exames e procedimentos, como o da colheita do líquido cerebrospinal e mielografia (Zero et al., 2022), com ótima avaliação acadêmica.

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

Objetivou-se, com este estudo, avaliar a conservação do conjunto pulmão coração (CPC) e conjunto estômago, baço e intestino (CEBI) de cães, e comparar as técnicas anatômicas empregadas em relação à microbiologia, biomecânica e insuflação

pulmonar por até quatro meses. Isso poderá gerar grande aplicabilidade na prática de treinamento cirúrgico, sem gerar resíduos tóxicos, diminuindo a quantidade de cadáveres enviados a aterros sanitários e diminuindo o acúmulo de carcaças, a contaminação do solo e dos lençóis de freáticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fixadores e conservantes em anatomia

Para a utilização de cadáveres no estudo da anatomia, é necessário usar métodos de fixação e conservação para preservá-los, e que possam ser utilizados pelo maior tempo, sem que haja a proliferação de microrganismos (Calamares Neto e Colombo, 2015). A conservação tem como objetivo preservar da maneira mais próxima possível, a morfologia e características das peças como, consistência, coloração e flexibilidade, mantendo os cadáveres reais como se fossem animais frescos (Kimura e Carvalho, 2010). Os meios líquidos mais utilizados para a conservação e que inibem crescimento de microrganismos são o formaldeído, álcool etílico, glicerina e o fenol (Rodrigues, 2010).

Devido ao baixo custo do formaldeído e possuir ação bactericida, fungicida, viricida, esporicida e penetrar nos tecidos rapidamente (6mm a cada 12h), ainda é o fixador e conservante mais utilizado, porém ele torna as peças escuras, friáveis e mais pesadas com o tempo, e produz vapores tóxicos irritantes às mucosas (Calamares Neto e Colombo, 2015), além de ser considerado cancerígeno e teratogênico, e um poluente ambiental caso descartado de forma imprópria (Who, 1991).

A solução de Thiel é utilizada para a fixação de cadáveres pois fornece textura e cor próximas dos animais vivos e apresenta muitas aplicações em cirurgia, ultrassonografia, anestesia regional e entubação das vias aéreas (Eisma et al., 2011, Eisma et al., 2013). Também preserva a flexibilidade e plasticidade dos órgãos e tecidos, e os pulmões mantêm capacidade de insuflação e as articulações dos membros continuam com mobilidade (Thiel, 2002, De Crop et al., 2012). Esta solução contém sais, como nitrato de amônio, nitrato de potássio e sulfito de sódio, com pequenas porcentagens de formaldeído, etilenoglicol, ácido bórico e p-clorocresol (Rodrigues,

2010, Hayashi et al., 2016). Com essa solução é possível manter as vias aéreas preservadas e utilizar os cadáveres para o treinamento de intubação endotraqueal, sendo essa a base da prática moderna da medicina de emergência, e é um dos componentes essenciais para os residentes se aperfeiçoarem (Sagarin et al., 2005). A cor vermelha obtida com esta solução ocorre devido a nitritos e mioglobina nos músculos que formam a nitrosomioglobina (Hammer et al., 2014).

O álcool etílico 96°GL também é um bom fixador e de fácil aquisição. Entretanto, se empregado em concentração acima de 70% endurece muito os tecidos. O fenol líquido ou em forma de cristais não endurece os tecidos e também protege o material da ação de fungos. Deve ser usado com cuidado pois é tóxico, e provoca queimaduras na pele (Rodrigues, 2010). Outra alternativa de conservação é a criodesidratação, que consiste em desidratar as peças causando retração dos tecidos (Freitas et al., 2009). As peças anatômicas podem ser mantidas fora de soluções e se tornam mais leves devido a perda total de água, auxiliando no transporte (Taylor e Van Dyke, 1995).

Foi utilizado 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 cheiro, a solução testada preservou com sucesso os cadáveres de cães, sem riscos ambientais e à saúde, com baixo custo efetivo (Janczyk et al., 2011).

Na Universidade de Ciências de Szent István, na Hungria, ao invés de formaldeído, foi utilizada 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 e Geric, 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. Na Universidade de Tóquio, foi utilizada solução composta de 20kg de cloreto de sódio, 1L de formaldeído a 20%, 0,2L de fenol, 0,5L de glicerina, 4L de álcool isopropílico e 19,3L de água totalizando 25L de solução. Foram realizados 21 procedimentos ortopédicos, ultrassonográficos, cateterização venosa central,

cultura bacteriana, fúngica e, mensuração da amplitude de movimento das articulações, concluindo-se que o método de preservação apresentou efeito antimicrobiano, preservando a flexibilidade das articulações dos cadáveres, e alta qualidade tecidual no quesito maciez e coloração, favorecendo todos os procedimentos realizados (Hayashi et al., 2014). 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 (Hayashi et al., 2016).

Em pesquisa realizada utilizando solução aquosa de cloreto de sódio a 30% para a conservação de peças anatômicas, anteriormente fixadas por formaldeído, foi reportado que durante cinco anos não houve contaminação visual, além de ausência de odores pútridos ou alteração na coloração e maciez (Oliveira, 2014). Em técnica utilizando álcool etílico para fixação e solução salina à 30% para conservação, testes biomecânicos do jejuno e da pele demonstraram manutenção da resistência e elasticidade tecidual durante 8 meses em cães (Rocha et al., 2018) e por 7 meses em gatos (Zero et al., 2020).

A utilização de AEG (álcool etílico glicerinado) para fixação e SC (sal de cura) para a conservação de cadáveres vem demonstrando ser ser um método eficaz, e de baixo custo, para a manutenção das características dos cadáveres quimicamente preparados, mantendo-os muito próximos aos animais frescos. Vários estudos vêm sendo realizados com o uso desse preparo anatômico em cadáveres para aulas de técnica cirúrgica, além de treinamento de punção do líquido cerebroespinal e mielografia (Zero, 2021) e mimetizando afecções como megaesôfago, efusão pleural, pneumotórax, e outros procedimentos como esofagograma e broncografia (Kihara, 2020), mantendo os cadáveres com coloração e textura próxima ao animal fresco (Del Ponti et al., 2021, Ferreira et al., 2021, Queiroz et al, 2022a, Queiroz et al, 2022b).

2.2 Uso de animais em pesquisa e ensino

Após o estabelecimento das CEUA e a criação da lei Arouca (nº 11.794), as quais controlam as atividades de pesquisas e ensino universitárias, houve necessidade da

busca por métodos éticos e alternativos para o ensino e pesquisa que envolva animais (Brasil, 2008).

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 vão 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).

Alternativas humanizadas, como a utilização de cadáveres em determinadas situações, promovem maior aprendizado, aumento da eficiência, diminui custos, além do potencial de customização e repetitividade do exercício. O aumento da confiança e satisfação do aluno devido à diminuição do estresse durante o procedimento cirúrgico com cadáveres beneficia o processo de aprendizagem desde que a fonte de aquisição desses animais seja ética, como por exemplo, advindo de eutanásia por razões médicas, morte natural ou acidentes (Knight, 2007).

Em levantamento realizado em 27 Universidades dos Estados Unidos, entre 1983 e 1984, estima-se que 16.655 animais, foram submetidos à eutanásia. Isso fez com que as universidades do Canadá e Estados Unidos procurassem métodos alternativos para diminuir o uso de animais vivos em treinamento cirúrgico (Balcombe, 2000).

No Brasil, foi realizado estudo envolvendo avaliação de graduandos na disciplina de Técnica Cirúrgica Veterinária na realização de treinamento cirúrgico com cadáveres quimicamente preparados com solução de Larssen modificada e, na sequência, treinamento em animais vivos (castração). Houve 93,29% de aceitação a favor do método de ensino, demonstrando a necessidade da criação e aprimoramento de métodos alternativos ao ensino no treinamento da técnica cirúrgica (Silva et al., 2004).

Outro estudo evidenciou a satisfação de 88,9% dos estudantes de medicina veterinária em relação ao aprendizado cirúrgico em cadáveres conservados quimicamente com solução de Larssen modificada, enquanto apenas 5,9% dos alunos acharam mais eficiente se o ensino fosse realizado em animais vivos. E, independente

do processo químico utilizado na conservação de cadáveres, 95,7% dos alunos aprovaram o uso de cadáveres no ensino da cirurgia (Silva et al., 2007).

A avaliação da prática cirúrgica veterinária por alunos de graduação, em cadáveres caninos preparados com álcool etílico (AE) e conservados em solução aquosa de cloreto de sódio à 30% (SACS 30%) obteve uma nota média de $7,32 \pm 1,63$ e, 75,67% dos alunos foram a favor do uso de cadáveres para o treinamento cirúrgico, sendo 80% a favor do uso de cadáveres quimicamente preparados (Rocha et al., 2019).

Estudantes de graduação avaliaram os animais quimicamente preparados com álcool etílico glicerinado (AEG), sais de cura (SC) e mantidos à vácuo e não houve diferença significativa entre em relação à maleabilidade da pele fresca ($9,05 \pm 1,05$) ou do animal quimicamente preparado ($8,45 \pm 0,83$). Ainda, 100% dos alunos foram a favor do uso de cadáveres para a realização de aulas de técnicas cirúrgica, preferindo, primeiro, o treinamento em cadáveres, seguido de aulas de cirurgia com animais vivos (Del Ponti et al., 2021).

2.3 Aspectos microbiológicos da degradação e conservação de peças anatômicas

A degradação de um cadáver é causado por uma associação de fatores bióticos, bactérias intrínsecas e extrínsecas, individualidade do animal, e fatores abióticos como tempo, clima, temperatura e umidade. As bactérias são descritas como a grande força motriz para que o processo de decomposição ocorra. Elas podem ser aceleradas, ou ser mantidas latentes de acordo com a temperatura em que estão agindo (Carter et al., 2008).

Os primeiros estágios de decomposição são marcados pelo inchaço induzido pelas bactérias. Elas começam a digerir o intestino e os tecidos circundantes, e começa a ocorrer a autólise dos tecidos. Durante a putrefação, as bactérias passam por processos anaeróbicos, produzindo gases como subproduto, são eles o hidrogênio, sulfeto, metano, cadaverina e putrescina. Neste momento, o cadáver libera esses gases e inicia-se a decomposição tardia. As etapas finais duram até a esqueletização, sendo consideradas os estágios mais secos do processo (Hyde et al., 2013).

Muitos estudos examinam os microorganismos da decomposição e o microambiente resultante, porém esses estudos são realizados no solo onde estão enterrados os cadáveres. Inicialmente, há desenvolvimento de bactérias aeróbicas (*Staphylococcus* e *Enterobacteriaceae*), as quais são substituídas por bactérias anaeróbicas (*Clostridio* e *Bacteroides*). Essa mudança das bactérias deve-se à falta de oxigenação dos tecidos. A primeira bactéria a aparecer é o *Staphylococcus*, seguido pelos coliformes e bactérias anaeróbias (Hyde et al., 2013).

Foi observado na decomposição de suínos em temperatura entre 23 e 30°C, que no início do processo, as bactérias lipolíticas estavam presentes em baixa concentração ($5,5 \times 10^3$ UFC/mL) enquanto as bactérias proteolíticas estavam aumentadas ($5,3 \times 10^5$ UFC/mL) e foram diminuindo durante o processo de decomposição. Foram isoladas bactérias do gênero *Acinetobacter*, *Bacilo*, *Kurthia*, *Brevibacterium*, *Anthrobacter* e *Serriatia* (Howard et al., 2010).

As bactérias mesófilas, como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Enterococcus* e *Bacillus*, sobrevivem a uma temperatura de 30 a 40°C. As termófilas, como *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoactinomyces*, se encontram em temperaturas de 50 a 60°C. A temperatura não é o único efeito sobre as bactérias. Outros fatores ambientais, como Ph, fontes de energia disponível, força iônica e nutrientes, também influenciam na diversidade e crescimento (Zeikus, 1979). A carcaça animal é composta de material microbiologicamente ativo que pode conter vírus, bactérias, protozoários, parasitas, príons, toxinas, resíduos de drogas e outros produtos químicos. Todos os materiais biologicamente ativos, precisam ser reduzidos a quantidades seguras, e eliminados para minimizar seu risco potencial (Berge et al., 2009). Boas práticas de fixação e conservação são necessárias para que não ocorra a deterioração e proliferação de patógenos causadores de doenças (Corrêa, 2003; Rodrigues, 2010).

A condição de temperatura elevada favorece o desenvolvimento da putrefação profunda, que é produzida na massa muscular interna da carne. A ausência de refrigeração após a morte resulta no desenvolvimento acelerado de bactérias anaeróbias, procedentes do trato intestinal do animal, sobretudo *Clostridium sp* (Ingram, 1972). Considera-se que os primeiros sinais de putrefação aparecem quando

o número de *Clostridium perfringens* alcança a contagem de 107 germes/grama de carne, considerando uma contaminação inicial de 102 germes/grama de carne. A refrigeração rápida evita estas duplicações fatídicas e a consequente putrefação profunda (Rosset, 1994). Então, a refrigeração da carne tem como objetivo, diminuir a temperatura a um valor em para que haja grande retardo na taxa de crescimento bacteriano, e no caso do congelamento, a sua interrupção. Desse modo há a eliminação do desenvolvimento de patógenos causadores de toxi-infecções, além de aumentar o prazo de validade, sem alterar a cor, sabor e odor da carne (Aidani et al., 2014).

A resistência microbiana foi testada em diversas concentrações com o uso do formaldeído para a fixação dos cadáveres. O *Staphylococcus sp.* mostrou-se mais resistente a esse fixador do que a *Samonella sp.*, *Pseudomonas* e *Klebsiella sp.* O *Aspergillus ninger* foi mais resistente que a *Candida albicans*, demonstrando também, que os fungos são mais resistentes que as bactérias (Solomon, 1975). Por esse motivo, podem ocorrer quadros alérgicos nos laboratórios de anatomia, pela exposição constante aos esporos suspensos, que dependendo da contaminação ambiental e a intensidade da exposição, podem ocasionar, aos profissionais e alunos, desordens respiratórias, imunes e no sistema nervoso central (Corrêa, 2003).

A ação antisséptica da glicerina, atua contra fungos e bactérias, desidrata as peças anatômicas e suprime odores prejudiciais à saúde, como aqueles liberados pelo formaldeído (Krug et al., 2011).

A utilização de AE na fixação e de SACS 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).

Cadáveres de gatos fixados com AEG, conservado com SC e mantidos a vácuo, foi avaliado diariamente a biomecânica dos tecidos por 7 dias e realizada a análise microbiológica que manteve-se baixa, nunca ultrapassando $6,0 \times 10^4$ UFC/mL para aeróbios totais e $4,8 \times 10^4$ UFC/mL para anaeróbios totais. Foram detectadas nas amostras *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.* e *Staphylococcus sp.* e os

cadáveres não apresentaram contaminação visual e odor desagradável (Queiroz et al., 2022a).

Para avaliar o efeito crônico da conservação de cadáveres de gatos com a mesma técnica anatômica (cadáveres conservados por até 120 dias) à temperatura de 0 a 4°C e mantidos a vácuo, observou-se, microbiologicamente, que a população microbiana em 12 das 16 amostras analisadas nunca ultrapassou $4,0 \times 10^2$ UFC/ mL nos aeróbios totais e $8,8 \times 10^2$ UFC/ mL nos anaeróbios totais. Foram identificados *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*, *E coli*, *Micrococcus sp* e *Klebsiella sp* (Queiroz et al., 2022c). Na conservação de cadáveres de cães por 120 dias com a utilização de AEG, SC e mantidos a vácuo, a contagem microbiológica manteve-se baixa, nunca excedendo $8,0 \times 10^2$ UFC/ mL para aeróbios totais e 5×10^2 UFC/ mL para anaeróbios totais e, 25% das amostras analisadas não apresentaram contaminação, foram identificados *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*. e uma amostra com levedura (Ferreira et al., 2021).

2.4 Conservantes e vácuo na indústria alimentícia

No caso da cura de carnes, são utilizados aditivos alimentares tais como sais de nitrato, nitrito, cloreto de sódio e açúcares, os quais fixam a cor avermelhada da carne curada, possuem ação bacteriostática, e mantêm suas características físicas e químicas (Iamarino et al., 2015). O nitrato é adicionado a carnes devido ao poder corante (cor rósea), resultado da reação da mioglobina e hemoglobina, unificando a coloração dos produtos. O nitrito também atua como agente bactericida, ao retardar o desenvolvimento do *Clostridium botulinum*, na produção de toxinas, e reduz a progressão da oxidação lipídica. O nitrito é essencial no processo de cura, pois além de preservar as funções dos produtos cárneos, contribui para o desenvolvimento de pigmentos e do sabor típico das carnes curadas (Pizza, 1999, Toldrá et al., 2001)

A embalagem a vácuo está ganhando grande importância como técnica de conservação para o prazo de validade de carnes e outros alimentos (Farber et al., 2003). Esse tipo de embalagem é considerado uma atmosfera modificada, pois nela há uma alteração da pressão do ar por redução do oxigênio, o que leva a uma diminuição da atividade respiratória normal do alimento e da população microbiana

(Young et al., 1988), pois há inativação de bactérias aeróbicas, o que evita sua deterioração e, conseqüentemente aumenta a validade e qualidade. Entretanto, ainda pode haver contaminação por bactérias anaeróbicas, sendo necessário o uso da refrigeração para minimizar esse problema (Mantilla et al., 2010).

O vácuo promove redução nos valores de oxidação e da força de cisalhamento muscular, proporcionando maior maciez do produto, além de que a ausência de oxigênio leva ao predomínio de bactérias láticas, as quais alteram pouco a qualidade das carnes (Leonel, 2008; Tesser, 2009).

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

As bactérias Gram positivas são mais resistentes quanto à inibição do CO₂ do que as Gram negativas, sendo os *clostrídios* os mais resistentes e as *pseudomonas* as mais sensíveis. O CO₂ provoca uma mudança considerável na microbiota das carnes durante o armazenamento prolongado, apresentando uma microbiota predominantemente formada por microorganismos Gram positivos, enquanto no produto fresco, é principalmente Gram negativos (Jay, 2005), sendo os fungos, leveduras e bactérias aeróbicas deteriorantes altamente suscetíveis ao CO₂, ocorrendo uma diminuição desses microorganismos na atmosfera modificada. As bactérias ácido-láticas e anaeróbicas são altamente resistentes, enquanto as facultativas podem ou não ser inibidas pelo CO₂ (Finne, 1982).

Na embalagem a vácuo a compressão causada no alimento pode aumentar a exsudação da carne e/ou diminuir a forma original do alimento, aumentando a quantidade de líquido presente na embalagem (Church e Parsons, 1995).

2.5 Descarte das peças anatômicas e carcaças

Com o crescimento da população mundial, o descarte de cadáveres passa a ser uma questão ambiental fundamental quanto ao uso do solo, emissão de poluentes, consumo de recursos e desperdício de materiais. Tornou-se uma fonte de preocupação pública no século XX, evidente no desenvolvimento de um “movimento funerário verde” no mundo ocidental (particularmente nos EUA), que busca um corpo menos impactante, e práticas de eliminação mais ecologicamente corretas (Olson, 2016).

Com o aumento crescente da consciência ambiental, é compreensível que tais preocupações também sejam transferidas para o campo funerário, criando uma tendência para produtos e serviços funerários “mais verdes” (Davies e Rumble, 2012). Devido ao “movimento funeral verde”, houve um aumento crescente de inovações menos impactantes, e mais sustentáveis do que a cremação e o sepultamento, essas alternativas, e o que elas oferecem em termos ambientais e públicos, trazem melhorias para a saúde pública (Green et al., 2014).

A biossegurança no descarte de carcaças é muito importante para a proteção da saúde ambiental, animal e pública contra potenciais ameaças microbiológicas. A carcaça animal é composta de material microbiologicamente ativo, que pode conter vírus, bactérias, protozoários, parasitas, príons, toxinas, resíduos de drogas e outros produtos químicos. Todos os materiais biologicamente ativos precisam ser reduzidos a quantidades seguras e eliminados para minimizar seu risco potencial (Berge et al., 2009).

Pensando nessa biossegurança, os laboratórios de anatomia, universidades e hospitais americanos e europeus, tem utilizado a hidrólise alcalina das carcaças, que é um processo no qual utiliza-se aquecimento e pressurização para dissolver e esterilizar, utilizando uma solução de hidróxido de sódio ou potássio. A hidrólise alcalina tornou-se de crescente interesse como uma inativação alternativa, método para resíduos orgânicos microbiologicamente contaminados, incluindo carcaças de animais. Sua eficácia, facilidade de uso, baixo impacto no meio ambiente e baixos custos operacionais tornam o método de escolha, comparado à compostagem, decomposição anaeróbica, incineração ou renderização (Kaye et al., 1998).

Vários métodos causam a decomposição de tecidos moles, como fervura, uso de produtos químicos, o uso de insetos, decomposição em água e decomposição por enterramento no solo. Todos estes métodos levam à esqueletização completa, e exceto a fervura, são eficazes para animais de médio e grande porte (Modi et al., 2014).

O clima úmido da estação chuvosa também é útil para acelerar a decomposição de peças anatômicas enterradas, levando à esqueletização precoce do cadáver, em aproximadamente 30 dias (Modi et al., 2014).

Geralmente, a decomposição de uma semana no ar é equivalente a duas semanas na água e oito semanas no solo. Para a obtenção de ossos, o animal pode ser fervido ou enterrado. No entanto, a decomposição do tecido mole é retardada em corpos embalsamados devido à presença de formaldeído, mas a fervura de tais espécimes antes do enterro, leva ao aumento da decomposição do tecido mole, devido à diminuição do formaldeído pós fervura (Modi et al., 2014).

O processo pelo qual um cadáver se transforma em esqueleto, por meio da destruição do tecido mole, é bastante complexo. O processo de decomposição, ocorre como tudo na biologia, não existe dois indivíduos iguais, nem dois processos de decomposição iguais (Pinheiro, 2006).

A decomposição de um corpo é um processo no qual ocorre a autólise celular iniciada pela morte. Os nutrientes intracelulares são derramados nos tecidos circundantes, facilitando a proliferação de populações bacterianas que causam a degradação tecidual, liberando gás (Hanglung e Sorg, 1997). O gás causa inchaço e libera fluidos pelos orifícios corpóreos, que vão atrair a fauna para a carcaça (moscas, besouros, mamíferos e aves necrófagas). Esses animais, juntamente com as bactérias, as enzimas e a ação física, quebram e removem os tecidos do corpo (Vass et al., 2002). A putrefação segue rapidamente, e ocorre uma rápida diminuição na biomassa, o ponto final é a esqueletização (Campobasso et al., 2001). A decomposição envolve autólise (destruição de células e órgãos por um processo químico asséptico), e putrefação (por causa de bactérias e fermentação) (Knight, 1996).

É um processo que varia muito de cadáver para cadáver, de ambiente para ambiente, circunstâncias da morte, o lugar onde se encontra e o clima. Sabe-se que

a putrefação ocorre muito mais rápido nos corpos que são deixados ao ar livre do que aqueles imersos na água, enquanto os corpos enterrados se decompõem em um ritmo muito mais lento (Gordon et al., 1988, Prieto et al., 2004). Fatores como o período de tempo antes do corpo ser enterrado (permitindo assim o início da putrefação), a temperatura no local, a presença ou ausência de oxigênio, a profundidade do corpo, a topografia do solo, afetam consideravelmente a velocidade de decomposição (Gordon et al., 1988).

Assim, para saber o impacto da decomposição, vários fatores devem ser levados em consideração. Esses fatores incluem temperatura, elevação, umidade, tipo de solo, vento, sombra, vegetação e estação do ano. Além dessas variáveis, existem outras que podem influenciar o processo de decomposição como intervalo pós morte, mumificação, insetos necrófagos e trauma (Haglund e Sorg, 2001).

Até a presença de sombra ou luz solar direta pode acelerar ou desacelerar os processos de decomposição, bem como o peso corporal, o tamanho do inchaço e o número de insetos. A profundidade em que um corpo está enterrado também afeta o nível de decomposição (Shean et al., 1993).

Após a morte, a maioria dos corpos que não foram embalsamados, começam a putrefação rapidamente e se liquefazem em pouco tempo, deixando apenas o esqueleto. Outros, no entanto, podem passar por alguns dos processos de preservação como a mumificação ou saponificação, que acabam por levar à esqueletização. Um corpo esqueletizado tenderá a se desintegrar ou a se fossilizar, um processo que pode levar milhões de anos (Prieto et al., 2004).

Embora vários estudos sobre decomposição tenham sido realizados em vários ambientes, poucos consideram a decomposição para corpos embalsamados. Os animais que são utilizados nos experimentos são os suínos, devido a semelhança com a decomposição humana (Campobasso et al., 2001). Em estudo sobre decomposição de porcos embalsamados enterrados em profundidades de 2 a 4 pés foi demonstrado que o formaldeído não afeta a lixiviação de ácidos graxos voláteis para o solo, e os restos embalsamados enterrados mumificaram (McQuinn, 2011). Os estudos que apresentam corpos embalsamados são de cemitérios e os conservantes utilizados pelos embalsamadores não são descritos (Rogers, 2004, Berryman et al., 1990).

Em outro estudo foram utilizados 3 porcos conservados com 1%, 5% e 10% de formaldeído com 5% fenol e 10% de glicerina. Os porcos embalsamados se decompuseram em uma taxa mais lenta em comparação aos porcos frescos. Moscas e seus ovos estavam presentes nos porcos frescos após 12 horas e a atividade dos vermes começou dentro de 24 horas, enquanto, nos porcos embalsamados, as atividades da mosca não estavam presentes até o 8º dia, e os ovos das moscas depositados permaneceram intocados. Os cadáveres com solução de formaldeído à 5% ou mais apresentaram crescimento de fungos e sinais de mumificação, e apenas no 50º dia, a mumificação estava completa e a pele começou a se deteriorar (Keaton, 2012).

2.6 Análise biomecânica de tecidos de animais

Para a realização de testes biomecânicos são utilizadas máquinas universais de ensaios mecânicos. Os testes biomecânicos podem ser realizados através da compressão de corpos de prova, flexão e tração gerando dados computacionais. Para os ensaios de tração, são analisadas as forças externas crescentes que promovem a deformação dos tecidos, medindo a resistência e alongamento do corpo de prova avaliado (Rocha et al., 2018). Foram realizados testes biomecânicos de tração do ligamento nugal de cães e comparada a resistência do ligamento integro (que contém duas bandas), com o ligamento com apenas uma banda funicular. Com esse estudo foi verificado que a ressecção de somente uma banda, poderia representar dano com relação à função biomecânica de sustentação do ligamento nugal (Rodrigues et al., 2021)

As propriedades biomecânicas são importantes e o interesse por elas vêm crescendo, para que possam ser comparados tecidos frescos e quimicamente preparados, verificando as alterações morfológicas causadas pela conservação e na busca de melhores condições para a implantação de materiais biológicos e novos modelos de experimentação, que sejam tão bons como os animais frescos (Camargo et al., 2014).

Pesquisas vêm sendo realizadas utilizando testes biomecânicos para determinar a elasticidade e resistência do pericárdio suíno fresco, e do pericárdio

bovino fresco e quimicamente conservado. A direção da coleta do pericárdio implica em uma mudança na resistência tecidual, que é muito importante para procedimentos cirúrgicos e utilização como implantes (Soares et al., 2021; Medeiros et al., 2022).

O peritônio de paca (*Cuniculs paca*) conservado em glicerina 98% e fresco houve melhora na propriedade tênsil do peritônio conservado, sendo mais uma opção de material biológico para o uso nas cirurgias reconstrutivas (Camargo et al., 2014). Também foi avaliada a conservação do peritônio de paca em solução hipersaturada de açúcar a 300%, demonstrando uma maior maleabilidade para o ato cirúrgico em relação à glicerina (Leal et al., 2014).

Foi realizada a análise biomecânica em cães fixados com formaldeído a 10% e conservados em SCAS 30% para quantificar alterações na resistência intestinal, durante 120 dias. Observou-se que não houve alteração na resistência tecidual entre os tecidos conservados e os frescos, justificando, assim, a utilização desses cadáveres nas aulas de técnica cirúrgica (Lippi et al., 2021).

O AEG como fixador e a SCAS a 30% como conservante de cães, em tanques, foram utilizados para avaliação biomecânica do jejuno e pele durante 8 meses. Concluiu-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 e baixa contaminação microbiológica (Rocha et al., 2018; Rocha et al., 2019; Pereira et al., 2019). Foi utilizada a mesma técnica anatômica para prática de suturas em veias jugulares externas (Pelógia et al., 2018) e artérias carótidas comuns de cães (Cerqueira et al., 2017), tendo sido demonstrados ótimos resultados em testes de tração, viabilizando esse tipo de material quimicamente preparado para a utilização em treinamento para microcirurgia. Cadáveres de gatos também foram preparados com esta mesma técnica anatômica e o jejuno e a pele mantiveram as características biomecânicas parecidas a dos animais frescos por até 7 meses (Zero et al., 2020).

Foi analisada a resistência da pele de cadáveres de gatos fixados com AEG e conservados com SC (20% de cloreto de sódio, 1% de nitrito e 1% de nitrato) e mantidos refrigerados por até 90 dias. Houve manutenção de valores dos valores biomecânicos durante toda a conservação e próximos daqueles dos cadáveres frescos, além dos cadáveres quimicamente preparados terem sido avaliados pelos

alunos com notas superiores a 8 (escala de zero a 10), recomendando o emprego dessa técnica anatômica visando treinamento cirúrgico (Fração et al., 2019). Cadáveres de cães e gatos submetidos à mesma técnica anatômica mas embalados a vácuo e mantidos refrigerados por até 120 dias, demonstraram ótima resistência tecidual ao longo de toda a conservação, com ótimas avaliações práticas dos alunos em treinamento de suturas, além de baixa contaminação microbiológica, o que é muito importante para o ensino da cirurgia (Del Ponti et al, 2021; Ferreira et al, 2021; Queiroz et al, 2022a; Queiroz et al, 2022b; Queiroz et al., 2022c)

3. REFERÊNCIAS

- Aidani E, Aghamohammadi B, Akbarian M, Morshedi A Hadidi M, Ghasemkhani N, Akbarian A (2014) Effect of chilling, freezing and thawing on meat quality: a review. **International Journal of Biosciences** 5:159-169
- Akhtar KSN, Chen A, Standfield, NJ, Gupte CM (2014) The role of simulation in developing surgical skills. **Current Reviews in Musculoskeletal Medicine** 7:155–160
- Arluke A (2004) The use of dogs in medical and veterinary training: understanding and approaching Student uneasiness **Journal of Applied Animal Welfare Science** 7:197–204.
- Asma B and Eddine BS (2014) Novel Approach to Teach Veterinary Orthopedic Surgery in Dogs. **Veterinary Science & Technology** 5:5.
- Balcombe J (2000) **The use of animals in higher education: problems, alternatives and recommendations**. The Humane Society Press. Washington. 104 p.
- Berge A, Glanville T, Millner P, Klingborg D (2009) Methods and microbial risks associated with composting of animal carcasses in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 234:47–56.
- Berryman HE, Bass WM, Symes SA, Smith OC (1990) Recognition of Cemetery Remains in the Forensic Setting. **Journal of Forensic Sciences** 36:230-237.
- Blakistone BA 1999. **Principles and applications of modified atmosphere packaging of Foods**. New York: Chapman & Hall.
- 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.

Calamares Neto JE e Colombo TE (2015) Isolamento e identificação de fungos filamentosos em peças anatômicas conservadas em formol. **Journal Health Science Institute** 33: 218-222.

Camargo DC, Camargo PC, Leal LM, Filho SPG, Martins LL, Shimano AC, Machado MRF (2014) Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (Cuniculus paca) a fresco e conservado em glicerina 98%. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 34:185-191.

Campobasso CP, Di Vella G, Introna F (2001) Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International** 120:18–27.

Carter DO and Tibbett M (2008) Temperature affects microbial decomposition of cadavers (Rattus rattus) in contrasting soils. **Applied Soil Ecology** 40:129–137.

Costa Neto JM, Martins Filho EF, Gomes Junior DC, Moraes VJ, Teixeira DM, Silva JJ, Silva VSC, Resende LS (2012) Bastidor Aplicado Ao Ensino Da Técnica Cirúrgica Veterinária- Síntese Dos Tecidos. Medvep. **Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação** 10: 16–21.

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 Advanced Research Journal of Medicine and Medical Science** 6: 292-295.

Church IJ and Parsons AL (1995) Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 67:143-152.

Corrêa WR (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.

Davies DJ and Rumble H (2012). **Natural burial: Traditional-secular spiritualities and funeral innovation.** London: Bloomsbury Publishing.

De Crop A, Bacher K, Van Hoof T, Smeets PV, Smet BS, Vergauwen M, Kiendys U, Duyck P, Verstraete K, D'Herde K, Thierens H (2012) Correlation of contrast-detail analysis and clinical image quality assessment in chest radiography with a human cadaver study. **Radiology** 262:298-304,.

Del Ponti I, Vieira GC, Soares LG, Rodrigues A, Costa NTB, Ferreira GC, Fechis ADS, Queiroz ABPS, Oliveira FS (2021) Vacuum packaged embalmed dogs for veterinary surgery practicing. **European Journal of Anatomy** 25: 473-480.

Eisma R, Lamb C, Soames RW (2013) From formalin to Thiel embalming: what changes? One anatomy department's experiences. **Clinical Anatomy** 26: 564-571.

Eisma R, Mahendran S, Majumdar S, Smith D, Soames RW. (2011) A comparison of Thiel and formalin embalmed cadavers for thyroid surgery training. **Surgeon** 9: 142-146.

Farber JN, Harris LJ, Parish ME, Beuchat LR, Suslow T V, Gorney JR, Garrett EH, Busta FF (2003) Microbiological Safety of Controlled and Modified Atmosphere Packaging of Fresh and Fresh-Cut Produce Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety** 2:142-160.

Ferreira GC, Costa NTB, Cardozo MV, Queiroz ABPS, Rocha TASS, Oliveira FS (2021) Cadáveres de caninos conservados com álcool etílico y sal de cura y embalados al vacío para la enseñanza de la cirugía veterinaria. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú** 32.

Finne G (1982) Modified and controlled-atmosphere storage of muscle foods. **Food Technology** 36:128-133.

Floros JD and Matsos KI (2005) Introduction on modified atmosphere packaging. In: HAN, J. H. **Innovations in food packaging**, p. 159-172.

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.

Freitas IB, Souza AM, Santos RMB (2009) Técnica anatômica aplicada na conservação de cortes segmentares em *Canis familiaris* e *Decapterus macarellus*. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, UFRPE, **Resumo** Recife, p. 1-3.

Gordon I, Shapiro HA, Berson SD (1988) **Forensic Medicine: a Guide to Principles**. 3rd Ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. p. 1-62,

Green LC, Crouch EAC, Zemba SG (2014). Cremation, air pollution, and special use permitting: A case study. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal** 20: 559-565.

Guaraná JB, Müller AF, Strefezzi RF, Oliveira FS, Machado LC, Ambrósio CE, Dória RGS, De Freitas SH (2021) Swine viscera preservation in hypersaturated salt solution after alcohol fixation as a preparation method for educational purposes. **Anatomia, Histologia, Embryologia** 00:1-11.

Hammer N, Löffler S, Bechmann I, Steinke H, Hädrich C and FEJAC (2014) Comparison of modified thiel embalming and ethanol-glycerin fixation in an anatomy environment: Potentials and limitations of two complementary techniques. **Anatomical Science Education** 8: 74-85.

Haglund WD and Sorg MH (1997) Method and theory of forensic taphonomic research, in: WD Haglund and MH Sorg. **Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains**, CRC Press, Florida, p. 13–26.

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, Su-zuki 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. **Anatomical Science International Journal** 91:1–7.

Howard GT, Duos B, Watson-Horzelski EJ (2010) Characterization of the soil microbial community associated with the decomposition of a swine carcass. **International Biodeterioration & Biodegradation** 64: 300–304.

Hyde ER, Haarmann DP, Lynne AM, Bucheli SR, Petrosino JF (2013). The Living Dead: Bacterial Community Structure of a Cadaver at the Onset and End of the Bloat Stage of Decomposition. **PLoS ONE** 8:10, e77733.

Iamarino LZ, Oliveira MC, Antunes MM, Oliveira M, Rodrigues RO, Zanin CICB, Schimile M, Lima AA (2015) Nitratos em Produtos Cárneos Enlatados e/ou Embutidos. **Gestão em Foco** Edição n.07.

Ingram M (1972) Meat chilling. The first reason why. Meat chilling - why and how?, **Longford** 1:1-13.

Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, 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,.

Kaye GI, Weber PB, Evans A, Venezia R (1998) Efficacy of Alkaline Hydrolysis as an Alternative Method for Treatment and Disposal of Infectious Animal Waste. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science** 37: 43-46.

Keaton MA (2012) **Effect of embalming on the decomposition of pigs**. LSU Master's Theses, 3350.

Kihara MT, Zero RC, Queiroz ABPS, Toscano CP, Jarrouge DH, Rocha TASS, Oliveira FS.(2023) **A new model for thoracic radiology teaching and research in cadavers of embalmed dogs**. *Ciência Rural*, (prelo).

Kimura AKE e Carvalho WL (2010) **Estudo da relação custo x benefício no emprego da técnica de glicerinação em comparação com a utilização da conservação por formol**. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso de Extensão em Higiene Ocupacional, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

Knight A (2007) The Effectiveness of Humane Teaching Methods in Veterinary Education. **ALTEX** 24:91-109.

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

Leal LM, Ferreira ARS, Reis ACG, Martins LL, Filho SPG, Machado RFO (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** 66:1383-1391.

Leonel FR (2008) **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.

Lippi ICC, Queiroz ABPS, Smargiassi NF, Fechis ADS, Rocha TASS, Oliveira FS (2021) Biomechanical analysis of the jejunum of dogs' cadavers preserved with formaldehyde in comparison with a solution of sodium chloride. **Acta Science Anatomical** 1:248-253,.

McQuinn BC (2011) **Impact of Embalming and Burial on Decomposition Rates and Diffusion of Volatile Fatty Acids in Kentucky**. M.S. Thesis, Department of Geography and Anthropology, Louisiana State University

Mantilla SPS, Borges SM, Vital H (2010) Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica Ciência Agrário Ambiente** 8: 437-448.

Medeiros ACSR, Oliveira FS, Queiroz ABPS, Soares LG, Fechis ADS, Rocha TASS (2022) Biomecânica do pericárdio suíno. *Medicina Veterinária em Foco*. **Anais Congresso Vetscience**. 57-59,

Megyesi MS, Nawrocki SP, Haskell NH (2005) Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains. **Journal Forensic Science** 50: 618–626.

Micozzi MS (1991) **Postmortem change in human and animal remains: a systematic approach**. Springfield (IL): Charles C Thomas.

Modi BS, Puri N, Patnaik V (2014) Evaluation of techniques for cleaning embalmed cadaver bonés. **International Journal of Anatomy and Research** 2:810-13.

Myburgh J, L'Abbe' EN, Steyn M, Becker PJ (2013) Estimating the post-mortem interval (PMI) using accumulated degree-days (ADD) in a temperate region of South Africa. **Forensic Science International** 229: 165.e161–165.e166.

Oliveira LN, Rodrigues GS, Gualdi CB, Feijó AGS (2013) A Lei Arouca e o uso de animais em ensino e pesquisa na visão de um grupo de docentes. **Revista Bioethikos** 2:139-149.

Olson PR (2016) Knowing “necro-waste”. **Social Epistemology** 30:326–345.

Patwa A and Shah A (2015) Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. **Indian Journal of Anaesthesia** 59:533-41.

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. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38: 1834-1837.

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. **Semina – Ciências Agrárias** 40: 3099-3106.

Pizza A (1999) Fate of nitrites added to media with different reducing powers during the main processing operations used in the preparations of cooked meat products. **Industria-Conserve** 74:211-222.

Pinheiro J (2006) Decay process of a cadaver. In: Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J (eds) **Forensic anthropology and medicine**. Humana Press, New Jersey, Chapter 5. P. 85–116.

Prieto JL, Magaña C, Ubelaker DH (2004) Interpretation of postmortem change in cadavers in Spain. **Journal Forensic Science** 49:918–923.

Queiroz ABPS, Rodrigues A, Cardozo MV, Costa NTB, Soares LG, Fechis ADS, Oliveira FS (2022a) Biomechanical and microbiological analysis of embalmed cats – acute effect of conservation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 94: e20201583.

Queiroz ABPS, Rodrigues A, Soares LG, Costa NTB, Ferreira GC, Vieira GC, Del Ponti I, Fechis ADS, Oliveira FS (2022b) Biomecânica em gatos quimicamente preparados. **Medicina Veterinária em Foco. Anais Congresso Vetscience**. pp. 8-11,.

Queiroz ABPS, Rodrigues A, Cardozo M V, Costa, NTB, Rocha TASS, Oliveira FS (2022c) Microbiologia de gatos quimicamente preparados. Medicina Veterinária em Foco. **Anais Congresso Vetscience**. pp. 99-102.

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

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, Queiroz ABPS, Zero RC, Oliveira FS (2022) Bone marrow quality in chemically prepared dogs. **European Journal of Anatomy** 26: 189-197.

Rodrigues IJ, Minto BW, Gonçalves Neto JA, Queiroz ABPS, Oliveira FS (2021) Avaliação biomecânica da resistência do ligamento nugal em cães. **XXXIII CIC Congresso de Iniciação Científica da Unesp**.

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

Rogers TL (2004) Recognition of Cemetery Remains in a Forensic Context. **Journal of Forensic Sciences** 50: 5-11.

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.

Sagarin MJ, Barton ED, Chng YM, Walls RM (2005) National Emergency Airway Registry Investigators. Airway management by US and Canadian emergency medicine residents: a multicenter analysis of more than 6,000 endotracheal intubation attempts. **Annals Emergency Medicine** 46:328-336.

Shean BS, Messinger L, Papworth M (1993) Observations of differential decomposition on sun exposed v. shaded pig carrion in coastal Washington State. **Journal of Forensic Sciences** 38:938–949.

Silva RMG, Matera JM, Ribeiro AACM (2004) Preservation of cadavers for surgical technique training. **Veterinary Surgery** 33: 606–608.

Silva RMG, Matera JM, Ribeiro AACM (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** 36: 220–224.

Soares LG, Oliveira FS, Queiroz ABPS, Medeiros ACSR, Bariari Junior AF, Fechis ADS, Rocha TASS (2021) Biomechanics of the fresh and conserved bovine pericardium. **Anatomia Histologia Embryologia** 50(3). DOI:10.1111/ahe.12665

Solomon WR (1975) Assessing fungus prevalence in domestic interiors. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 56: 235-242.

Tannenbaum J and Bennett BT (2015) Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. 54:120-32.

Taylor WR and Van Dyke GC (1995) Revise procedures for staining and clearing small fishes and others vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium** 9:107-119.

Tesser ES (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.

Thiel W (2002) Supplement to the conservation of an entire cadaver according to W. Thiel [in German]. **Annals of Anatomy**,184:267–269.

Toldrá F, Flores M, Sanz Y (2001) Meat fermentation technology. In.: Hui YH, Nip WK, Rogers RW, Young OA **Meat Science and Applications**. New York: Marcel Dekker, p. 537-561.

Vass AA, Barshick SA, Sega G, Caton J, Skeen JT, Love JC, Synstelien JA (2002) Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. **Journal of Forensic Science** 47: 542–553.

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

Young LL, Reviere RD, Cole B (1988) Fresh meats: a place to apply modified atmospheres. **Food Science Technology** 42: 65-69.

Zeikus JG (1979). Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. **Enzyme and Microbial Technology** 1: 243–252.

Zero RC, Shimano AC, Cardozo MV, Santos CCC, Fechis ADS, Rocha TASS, Oliveira FS (2020) Cadáveres de gatos preparados químicamente para la enseñanza de técnicas quirúrgicas: análisis biomecánico de piel y yeyuno. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú** 31: e1617,.

Zero RC, Queiroz ABPS, Toscano CP, Jarrouge DH, Rocha TASS, Cardozo MV, Oliveira FS. (2022) A Training Model for Cerebrospinal Liquid Collection and

Myelography in Embalmed Dog Cadavers. **Revista Brasileira de Ciências Veterinária**, 29:175-181.

¹CAPÍTULO 2 – Conservation of dog viscera aiming for clinical and surgical training - use of vacuum and curing salt

Conservation of dog viscera aiming for clinical and surgical training

Andréa B. P. S. Queiroz^{1*}, Laura G. Soares¹, Marita V. Cardozo², Gabriel M. do Nascimento², Alisson D. S. Fechis¹, Raphael C. Zero¹, Fabrício S. Oliveira¹

¹ Sao Paulo State University, School of Agrarian and Veterinary Science, Department of Animal Morphology and Physiology, Via de Acesso Paulo Donato Castelane, s/n, Campus Jaboticabal, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

² Sao Paulo State University, School of Agrarian and Veterinary Science, Department of Veterinary Animal Pathobiology, Via de Acesso Paulo Donato Castelane, s/n, Campus Jaboticabal, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

Correspondence

Andréa B. P. S. Queiroz email – andrea.queiroz@unesp.br

¹ Este capítulo corresponde ao artigo científico que será submetido à revista Journal of Anatomy

ABSTRACT

Using cadavers as an alternative resource to using live animals for surgical training promotes practical efficiency, improves learning, has lower costs, and can be customized for the repetition of training. This study aimed to evaluate the conservation of visceral sets (lung and heart set [LHS] and stomach, spleen, and intestine set [SSIS] of dogs) using two types of preparative solutions prior to analysis of biomechanics and pulmonary insufflation after preservation for up to 4 months and analysis of microbiology after preservation for 10 months. Sixteen cadavers were divided into two groups depending on the preservation method: eight for Group 1 (G1 - glycerin ethyl alcohol and curing salts) and eight for Group 2 (G2 - curing salts). For the SSISs, changes in intestinal resistance, measured in Newtons, were quantified during the traction test, at moments zero (D0 - before fixation), 30 (D30), 60 (D60), 90 (D90), and 120 (D120) days of storage under vacuum. For the LHSs, lung viability was evaluated through lung insufflation which was rated as bad, medium, good, and excellent. Microbiological analysis of the liquid contained in the individual plastic packaging of each set and of the pulmonary and jejunum fragments was performed to quantify mesophilic aerobic and anaerobic bacteria, yeasts, *Enterobacteriaceae*, anaerobic endospores, and *Clostridium* every month, and after 10 months. There were no significant differences in the time and treatment interactions, and the factors were examined individually within each group. In G1, D60, D90, and D120 differed significantly from D0 (control). G2 showed a significant difference at all time points on D0 and no difference between the treatments on D30, D60, D90, and D120. The microbial population did not exceed 9.2×10^3 CFU/mL for total aerobic bacteria and 1.8×10^3 CFU/mL for total anaerobic bacteria in G1 and 1.9×10^3 CFU/mL for total aerobic bacteria and 1.33×10^3 CFU/mL for total anaerobes in G2. *Enterobacteriaceae* were detected in jejunum samples after 120 days at a concentration of 2.1×10^2 . The yeast count never exceeded 3.4×10^2 CFU/mL and sporulated at 2.3×10^3 CFU/mL. *Clostridium* was not detected in more than half of the samples. The biomechanics of the tissues were not significantly affected for up to 4 months, and the microbiological count was low for up to 300 days, demonstrating the effectiveness of both isolated viscera conservation protocols aimed at conserving and providing cadavers for surgical training.

Keywords: anatomy, biomechanics, malleability, microbiology, pulmonary insufflation

1 INTRODUCTION

Alternative methods have been developed to minimize the use of live animals in veterinary medicine training. The humane principles of animal experimentation developed by Russell and Burch in 1959 synthesized three words known as the three R's: replacement, reduction, and refinement. Reduction refers to reducing the use of animals in classes and experiments, refinement refers to refining the techniques used while maintaining the repetitiveness of procedures, and replacement refers to replacing the live animals when there are no losses during the teaching process (Arluke, 2004; Tannenbaum & Bennett, 2015; Guaraná et al., 2021).

The use of animal corpses for the sake of training must always be ethical, whether cadavers are acquired as a result of veterinarian-recommended euthanasia, accidents, or natural deaths. Training with embalmed cadavers provides students with greater confidence and satisfaction prior to engaging in live animal care (Knight, 2007; Del Ponti et al., 2021; Guaraná et al, 2021).

Using fresh cadavers for teaching is the closest method to using real models; however, a timeline for the viability of the cadaver is short due to rapid putrefaction in the absence of freezing methods. However, preserving cadavers in saturated salt solutions has been shown as a good option for conservation/storage. Salt solution preservation is simple, relatively inexpensive, and can lower the risk of infection (Rodrigues, 2010).

This study aimed to evaluate the conservation/preservation of lung and heart (LHS) sets and stomach, spleen, and intestines (SSIS) set and the anatomical techniques used by analyzing the biomechanics and lung insufflation in specimens preserved for up to 4 months and the microbiology in those preserved for 10 months. Adequate preservation methods have excellent potential to improve cadaver use for surgical training with repeatability, and may even reduce the number of cadavers that is required. This may decrease the amount of biological material sent for sanitary disposal, thereby reducing the accumulation of carcasses, and subsequent potential soil and groundwater contamination.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 The animals

Sixteen adult male and female dog cadavers, whose deaths 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 by the Local Ethics Committee for use (process 2693/22). The animals were frozen (-18°C) after death and then transported to the Laboratory of Animal Anatomy at UNESP Jaboticabal, SP, located 50 km away. The animal body scores were between 4 and 5 on a scale of 1 to 9, which is considered the ideal body score for dogs by Wsava (2013).

2.2 Anatomical technique

The animals were thawed in water for 12 h and subsequently weighed. Next, they were placed in the dorsal decubitus position and the thoracic and abdominal regions were shaved. A ventral incision was made, and the musculature was dissected to enable sternal resection at the costochondral joint. A median ventral abdominal incision was made from the xiphoid cartilage to the pubic symphysis for the extirpation of the LHS and SSIS which were then weighed. The animals were divided into two groups: in group 1 (G1), 20% of the weight was in glycerin ethyl alcohol (EA, formed by 5% glycerin in pure alcohol) and 20% was in curing salt (CSS, formed by 200g/liter g/L sodium chloride, 10 g/L sodium nitrite, and 10g/liter g/L sodium nitrate); for group 2 (G2), only 20% of the CSS was used. The group samples were kept under vacuum storage and refrigerated between 0 and 4°C for 300 days.

For the SSISs in G1, the EA solution was injected, followed by CSS by intragastric application via the cardia. The intestines were injected at three points (25x0.8 mm needle) on the mesenteric surface for better distribution of the content and at three points in the spleen. Ligature of the cardia and rectum was performed to maintain the injected liquid inside the organ set (Figure 1). The stomach and spleen were retained to maintain the syntopy of the “stomach, spleen and intestines” set, in addition to the “heart and lung” set. The same procedure was performed for G2 using only the CSS. After injection, each set was placed in a transparent

plastic package; 10% of the weight in CSS was added inside each package, which was then sealed using a professional vacuum machine (DZQ600®).

For the LHSs of G1, the EA solution and CSS were injected into the trachea using a 60 mL syringe and into the myocardium at three points using a 25x0.8 mm needle (Figure 2). The trachea was obliterated with a string to maintain the fluid inside. The same procedure was performed in G2 using only CSS. After injection, each organ set was placed in a transparent plastic bag and 10% of the weight in CSS was added inside each package, which was then sealed using the professional vacuum machine (DZQ600®).

The vacuum causes liquid leakage due to the difference in pressure between the internal and external environments. This free liquid maintained in the packages is important to avoid drying of the material and to improve the conservation because of the properties of the agents used. This process also facilitates the collection of material for microbiological analysis.

All materials were stored in a horizontal refrigerator between 0 and 4°C, with a digital thermometer attached to the sealing cap from the outside for 300 days. The viscera were washed on days 2, 4, and 6; bloody fluid transudation occurs after preparation in the first few days due to vacuum compression (Church & Parsons, 1995). New CSS in the same amount as that used initially was added to the packages, placed under the vacuum, and sealed for storage.

Biomechanical analysis of the jejunum was then performed for the SSISs of the two groups (Figure 3). A rectangular mold of 1x5 cm stainless steel and a scalpel were used for collection. Three samples were collected from the duodenojejunal flexure in an aboral direction. The samples were immediately placed in identified flasks of water to prevent drying until the biomechanical analysis could be completed. The biomechanical analyses of the jejunum (due to sampling ease with excellent homogeneity) and microbiological analyses of the fluid and a sample of the intestinal tissue (selected at random) were performed on days 30, 60, 90, and 120. Fresh samples (considered as control samples) were collected before the introduction of the preservative liquids and immediately after removing each organ set (day zero, D0).

The LHSs of G1 and G2 were analyzed by measuring the insufflation capacity of the lungs on D0, before storage, and at 30, 60, 90, and 120 days of refrigerated and vacuum storage. Microbiological analyses of the fluid and a sample of the lung parenchyma were performed using a randomly chosen set.

2.3 Analysis of tissue resistance

An EMIC Universal Testing Machine (model DL-2000) was used to evaluate tissue resistance. A 500N load cell, 100 mm/min displacement speed, and 20 mm gap between the grips were applied. The equipment belongs to the Laboratory of Surgical Anatomy, Department of Animal Morphology and Physiology, FCAV – UNESP – Jaboticabal.

2.4 Analysis of lung insufflation

To assess the lung viability, an endotracheal tube was inserted into the trachea and attached to an ambu bag for lung insufflation. This inflation method was used in a study of thoracic radiographic image quality with human cadavers preserved in Thiel's solution, in which lung insufflation capacity, lung flexibility, and plasticity were maintained (De Crop et al., 2012). Another study of an anatomical model of chemically preserved cadavers for a chest radiological study was developed using the same anatomical technique as that used in our research (Kihara, 2020). Two veterinarians with at least 15 years of experience in anatomy and surgery were chosen as the project executors and evaluators in the current study. The 16 LHSs were evaluated before fixation (D0), and on D30, D60, D90, and D120 (days) of storage under vacuum in a refrigerator at a temperature between 0 and 4°C.

Assigned insufflation scores of the dog lungs are shown in Table 1. Canine lungs have six lobes (two in the left lung and four in the right lung).

All samples were removed from the vacuum packaging and the endotracheal tube was inserted into the trachea, the cuff was inflated, and an ambu bag was used for lung inflation (Figure 4). A sampling of all sets was filmed, and the videos were archived for later analysis if needed.

2.5 Statistics

A statistical analysis of the biomechanical traction test of the jejunum was performed. The data were analyzed using logarithmic transformation, and the normality of the residuals was ensured. The data were submitted to the mixed linear model without assuming sphericity;

therefore, the Geisser-Greenhouse correction was applied. The factors analyzed were time, treatment, and their interactions. When the difference was significant, Tukey's post hoc test was performed for intragroup analysis and Sidak's test for intergroup analysis.

This study aimed to determine which moment in time showed values of intestinal resistance/elasticity that were closer to those of the control samples. The control samples were considered ideal for surgical practice as they were retrieved from fresh animals and had not been prepared with any type of fixative/preservative.

2.6 Sampling

Eight samples were analyzed at D30, D60, D90, D120, and D300 for a total of 40 samples, including lung tissue (accessory lobe), jejunum, SSIS fluid, and LHS. All samples were collected monthly during the conservation period (4 months) with an additional collection after 10 months. One set was randomly chosen and 10 mL of liquid from the package was collected per group in previously sterilized bottles. Sterile tissue samples were collected from each set in which the liquid collection was performed. Prior to collection, Mayo scissors and rat tooth tweezers were sterilized to prevent contamination. One gram of tissue was collected, placed in autoclaved flasks, and sent to the microbiology laboratory of the institution.

2.6.1 Microbiological Analysis

Quantification analyses of the five bacterial groups were performed in addition to the detection analysis of *Clostridium* sp., Total Aerobic Mesophiles, Total Anaerobic Mesophiles, Total Yeasts, Enterobacteriaceae, and Anaerobic Endospores.

2.6.2 Quantification

Quantification was performed using the depth plating technique, also known as Pour Plate. In this technique, the sample is diluted up to five times; from each dilution, 1.0 ml is used as an innocuous sample in duplicate and distributed in previously sterilized plates. Then, the molten medium is poured and cooled to 45°C (in a water bath) onto a Petri dish containing the diluted sample suspension. The material is homogenized by rotating the plate in clockwise and counterclockwise circular movements, which are repeated approximately ten times. After the medium has solidified, the plates are incubated in ovens at the appropriate temperature and atmosphere.

The culture medium used for aerobic and total anaerobic mesophiles was plate counting agar (PCA). However, for anaerobes, incubation was performed after oxygen removal; for yeasts, potato dextrose agar (BDA) medium was used, for Enterobacteriaceae, MacConkey medium was used, for Anaerobic Endospores, Brain Heart Infusion agar (BHI) and thermal shock (80°C for 10 min followed by cooling prior to plating) were used. All counting plates were stored directly in a bacteriological oven and incubated at 37°C for 24 h. After this period, the colony-forming unit (CFU) was counted manually using a magnifying glass (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

2.6.3 Detection of *Clostridium* sp.

To isolate *Clostridium* bacteria, aliquots of the initial dilutions of each sample were transferred to empty and sterilized test tubes and then subjected to thermal shock. After heat shock, 1 mL of each sample was inoculated into Petri dishes containing Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) agar, and plating was performed using the depletion method. The plates were incubated in anaerobic jars with the Gas Pack system at 37°C for up to 72 h. Upon growth, the colonies were subjected to biochemical tests for sex confirmation (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

3 RESULTS

The mean and standard deviation of jejunal Maximal Rupture Force (MRF) for each chemically prepared set is shown in Table 2.

The average cadaver weights for G1 and G2 were 681.25 ± 361.13 g and 1081.25 ± 601.67 g, respectively.

Data were analyzed using a mixed linear model after outliers were removed. Two factors were analyzed: time and treatment, and the interaction between them in response. Residual normality and homoscedasticity were ensured after the logarithmic transformation of the data. Sphericity was not assumed; therefore, the Geisser-Greenhouse correction was used (Table 3).

For the MRF, there was no significant difference between the time and treatment interactions; therefore, the factors were examined individually. The different treatments did not alter the MRF obtained from the biomechanical tests. However, there was a significant difference ($p < 0.05$) between the values measured within the same group. The time of fixation

affected the MRF. MRF was significantly higher in G1 (EA+CSS) than that in the control (D0). In G2 (CSS), D90 and D120 differed significantly from D0 (control).

The same statistical analysis was used for rupture elongation (RE) (Table 4).

There was a significant difference between treatment and time interactions. However, the post hoc analysis revealed that the difference between G1 (EA+ CSS) and G2 (CSS) occurred at moment 0, which was taken as a control. This interaction and the results expressed the interaction between time and treatment. Therefore, each of these factors was evaluated individually.

Similar to the results for MRF, time was responsible for the variation in the stretching response variable (mm). There was no significant difference between the values obtained in G1 and G2; any differences were attributed to the conservation time (Table 5).

Tukey's post hoc analysis highlighted intragroup differences. In G1, D60, D90, and D120 differed significantly ($p < 0.05$) from D0 (control). Conversely, G2 showed a significant difference ($p < 0.05$) at all time points on D0. The Sidak test revealed no significant difference ($p > 0.05$) between treatments at D30, D60, D90, and D120. The differences observed in the fresh animals (D0) were not relevant to this analysis.

There was no difference between G1 and G2 in maximal strength and stretching response; however, significant differences were observed within each group over time, as shown in the graphs (Figures 5 and 6).

After removing the LHS, lung insufflation was performed by inserting an endotracheal tube into the trachea and ventilating it with an ambu bag. All lungs were viable on D0 (fresh) and after storage on D30, D60, D90, and D120. During conservation/fixation, the lung maintained its excellent insufflation capacity, making it possible to insufflate all lobes. There was no difference in insufflation between the two anatomical techniques.

Table 6 shows the data from the microbiological analysis of lung tissue. The Total Aerobe count never exceeded 3.7×10^2 CFU/mL for samples injected with CSS or 2.0×10^2 CFU/mL for samples injected with EA+CSS. These results were obtained at 60 days, and the total aerobe count decreased with conservation time. After 10 months of refrigeration, the anatomical specimens continued to show low levels of contamination.

The highest microorganism count was observed for Total Anaerobes at 120 days, reaching 7.1×10^2 CFU/mL for LHS injected with CSS; for LHS injected with EA + CSS, the count was 1.7×10^2 CFU/mL at D60. The total Enterobacteriaceae count was always $\leq 1.0 \times 10$,

indicating no microbiological growth. The highest Anaerobic endospores and Total Yeast counts were observed after 60 days of conservation, and there was a decrease in counts in the other collections. For specimens preserved in CSS, the highest yeast count was observed after 300 days of conservation. Of the 10 tissues analyzed during the conservation period, *Clostridium* was found Only in three.

The analysis of the liquid in the packaging was performed on the same samples as those used for tissue analysis. The results are shown in Table 7.

The Total Aerobe count in the liquid never exceeded 9.2×10^3 CFU/mL for SSIS preserved with EA+CSS and 4.5×10^2 CFU/mL for specimens preserved with CSS. Contamination was always higher in the specimens treated with the two preservatives. The Total Anaerobe count in the tissues conserved with CSS was higher at 30 days and for those conserved with EA+CSS was higher at 60 days. The samples did not show significant contamination by *Enterobacteriaceae*, and more Yeasts and Anaerobic Endospores were detected in the samples stored for 60 days. *Clostridium* was also detected in four samples.

Table 8 shows the microbiological analysis of the jejunal tissues. The Total Aerobe count never exceeded 5.7×10^2 CFU/mL in those tissues conserved with CSS and 2.14×10^3 CFU/mL in those conserved with EA+CSS, both at 30 days. Greater Total Anaerobe counts were detected after 60 days of conservation. At 120 days, a higher *Enterobacteriaceae* count was detected in tissues conserved using CSS, with the other samples being less than or equal to 1.0×10 CFU/mL. After 60 days of storage, the samples showed the highest counts of Yeasts, Anaerobic Endospores, and *Clostridium*.

Table 9 shows the microorganism counts in the liquid samples from packages containing SSIS. The highest Total Aerobe and Anaerobe counts were detected in the samples after 30 days of storage. The *Enterobacteriaceae* count was very low in all collections. The highest Anaerobic Endospores count was found in the samples stored for 60 days and samples preserved with EA+CSS also contained the highest Yeast count. The highest yeast count was observed with CSS conservation at 90 days. Only four samples did not contain *Clostridium*.

4 DISCUSSION

The 30% sodium chloride solution (SCAS 30%) has been studied for five years and proved to be as effective as the conservation of previously fixed tissues, without visual contamination, unpleasant odor, or loss of softness and color (Oliveira, 2014). This solution

was effective for use in embalmed dogs (Rocha et al. 2018) and cats (Zero et al., 2020) injected with EA for 120 days. 20% sodium chloride solution (SCAS 20%) is the main component of the pickling salt used in the conservation of dog and cat cadavers fixed with EA for 120 days (Del Ponti et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Queiroz et al., 2022a; Queiroz et al, 2022b). In all previous studies, the SCAS was equal or greater than 20% in concentration, as demonstrated by the conservation of human cadavers (Friker et al., 2007). These high concentrations make it difficult for microorganisms to survive due to their high osmoregulatory capacities, as observed by microorganism activity in the Dead Sea (Nissenbaum 1975).

Our results showed that EA and CSS were effective in embalming viscera and preventing deterioration for 300 days, similar to other reports demonstrating the preservation of dog (Rocha et al. 2018) and cat cadavers for surgical training (Fração et al. 2019, Zero et al., 2020). Diethylene glycol and mono ethylene glycol, which have been used as fixatives in human cadavers kept for six months to one year (Goyri-O'Neill et al. 2013), have also shown efficacy in preserving the integrity of the tissues similar to that of fresh tissues. A solution containing glycerin alcohol and thymol was found to maintain color, stiffness, and movement better than formaldehyde-fixed tissues (Hammer et al., 2011; Hammer et al., 2012).

Swine urinary bladders and intestines fixed in EA and preserved in tanks with SCAS 30% were used for surgical training with good efficacy (Guaraná et al., 2021), similar to the sets evaluated in the present study, retained for 120 days, packaged in a vacuum, and refrigerated. The visceral color was maintained without a putrid odor, similar to the results in cured meat. Sodium nitrite stabilizes the color of meat products and inhibits *C. Botulinum* (Leitão, 1978). Vacuum packaging promotes a reduction in oxidation values and muscle shear force and results in greater tenderness; the absence of oxygen leads to the predominance of lactic acid bacteria and preserves meat quality (Leonel, 2008; Tesser, 2009), leading to a reduction in deterioration (Young et al., 1988).

In the current study, using pickling salts for visceral preservation maintained the tissue color to that which was similar to that of fresh animals, and to those of a study using bone marrow of dog cadavers chemically prepared with CSS and EA (Rocha et al., 2022).

The conservation of isolated viscera facilitates storage and may eliminate the need for refrigeration, depending on the fixation process (Guaraná et al., 2021). Some whole-cadaver preservation protocols for surgical training cadavers may require refrigeration for up to four months (Del Ponti, 2021; Ferreira et al, 2021; Queiroz et al, 2022a; Queiroz et al, 2022b). In

our study, the sets were stored in plastic vacuum packages with pickling salts and kept in small spaces.

The use of corpses is a part of the history of surgery. Their use is secular and remains the most respected training method because of the preservation of anatomical features, allowing the surgeon to appreciate the dissection and handling of real tissues (Silva et al., 2007; Stirling et al., 2014). Our study using animal viscera from necropsies showed excellent conservation quality and viability for potential use in surgical training. The described protocols will generate less material for disposal, reduce the number of carcasses discarded in landfills, and be more environmentally friendly (Olson, 2016; Prieto et al., 2004).

The solutions used in this research are relatively inexpensive and do not contaminate the environment or release dangerous steam, such as occurs when using formaldehyde (Who, 1991; Cury et al., 2013). In addition, harmful products such as formaldehyde increase financial and environmental costs, making it necessary to search for alternative conservation methods (Janczyk et al., 2011).

The products used in this study enabled smooth intubation with an endotracheal tube. Lung insufflation remained significant for 120 days in sets kept refrigerated and under vacuum, which is different from the results after formaldehyde conservation, in which the lungs undergo profound changes in color and flexibility and become fragile (De Crop et al., 2012). Another study using the same anatomical technique in which the animals were radiographed with lung repletion also reported good insufflation (Kihara et al., 2023). Embalmed human cadavers preserved in Thiel's solution have been used to replicate lung movements in radiological studies, thus reducing the need to expose live models to excessive radiation (De Crop et al., 2012).

Using embalmed cadavers is an alternative to using live animals and can reduce cost, increase repeatability, and assist in training residents and students in cerebrospinal fluid puncture examinations, myelography, orotracheal intubation, and radiography to detect pneumothorax and pleural effusion (Kihara et al., 2023; Zero et al., 2022). Furthermore, the trend in universities worldwide is to avoid the euthanasia of animals (Balcombe, 2000).

Our results revealed little variation in intestinal biomechanics for up to four months, demonstrating the efficacy of the anatomical technique employed in this study. The values in the traction test were similar to those of fresh dog intestines or to those of dogs (Queiroz et al., 2019) or cat cadavers preserved using ethyl alcohol for fixation and SCAS for preservation

(Zero et al., 2020). These values were also similar to those of cat cadavers fixed with EA and CSS and kept under a vacuum for seven days (Queiroz et al., 2022a).

The elongation values for tissue rupture (elasticity) found in our study were higher than those reported in other studies. This may be due to the use of a vacuum and the preservative liquid present in each package, which increased the softness of the anatomical material, similar to that observed in cured products. The vacuum also decreases the amount of available oxygen, promoting a reduction in oxidation values and muscle shear force (Leonel, 2008; Tesser, 2009).

The maximum microorganism count observed in this study was 10^3 CFU/mL. Despite there being no minimum bacterial count for cadaver conservation, a comparison of our results with those of other studies illustrates that the number of microorganisms detected was low, proving that the method is effective. In an experiment conducted with a pathogen inoculum, the bacterial concentration causing disease in the host was 10^9 CFU/mL (Rigobelo et al., 2016). Furthermore, sanitary microbiological standards for foods limit the allowable counts of microorganisms in fruits, vegetables, meat, fish, milk, and their derivatives (Brasil, 2001). Tolerance varies according to the microorganism but can reach up to 10^3 CFU/mL.

The low count of CFU/mL in the liquid from the vacuum packaging of the viscera sets was similar to that found in the packages of embalmed cat cadavers and did not affect the quality of conservation. No unpleasant odor or putrefaction was observed during the evaluation period (Queiroz et al., 2022c), similar to that described for the conservation of anatomical specimens previously fixed and kept in tanks of 30% SCAS (Oliveira, 2014). This was also similar to results observed in the conservation of dog cadavers fixed by EA and preserved in 30% SCAS for up to 120 days (Rocha et al., 2018; Pereira et al., 2019), and in the conservation of canine pericardium for a minimum period of 90 days in hypersaturated sodium chloride solution for surgical purposes (Brun et al., 2002).

The Enterobacteriaceae concentration found in our study was always less than or equal to 1.0×10 CFU/mL, a very low concentration. These microorganisms are very sensitive to desiccation, temperature, pH, and bacterial control methods such as curing salts (Baylis et al., 2011).

In addition, the Total Anaerobe count never exceeded 7.2×10^2 CFU/mL under conservation treatment with EA and CS and 1.98×10^3 CFU/mL under treatment with CS from LHS. For total aerobe count, the counts under the same treatments were 9.2×10^3 CFU/mL and 4.5×10^2 CFU/mL, respectively.

For SSIS under EA and CS treatment, we found 2.5×10^2 CFU/mL of Total Anaerobes and 2.14×10^3 CFU/mL of Total Aerobes. Under CS treatment the counts were 9.1×10^2 CFU/mL and 5.7×10^2 CFU/mL, respectively. The bacterial count in this experiment was slightly higher than that shown in a study using dogs fixed with EA and conserved in tanks with 30% SCAS solution, in which the contamination did not exceed 9×10^1 CFU/mL for Total Aerobes and 7×10^1 CFU/mL for Total Anaerobes. Both values were considered too low to cause health issues in humans (Pereira et al., 2019). A different study reported that in cat cadavers conserved for 120 days using EA and SC, vacuum packaged, and refrigerated, the Total Aerobe count never exceeded 4.0×10^2 CFU/mL and the Total Anaerobe count never exceeded 8.8×10^2 CFU/mL (Queiroz et al., 2022c), similar to the results of the present study.

Anaerobic Endospores show high potential for the genus *Clostridium*, a bacterium that feeds on proteins. *Clostridium* is an important decomposer; therefore, it is found in cadavers. (Hyde et al., 2013). The low concentration of *Clostridium* found in our study demonstrates the effectiveness of the applied anatomical technique.

5 CONCLUSION

The preservation methods applied in our study for isolated viscera demonstrated minimal impact on intestinal biomechanics, maintained lung insufflation and low microbiological count for over 300 days. These findings underscore the efficacy of these preservation protocols in preparing cadavers for subsequent use in surgical and clinical training. As both methods were efficient, the curing salt solution is cheaper than the ethylic alcohol solution and should be chosen as the first choice.

6 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Capes 88887574854/2020 and Usina São Martinho, Pradópolis, SP. The authors have no conflict of interest to declare.

7 AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept and design by Andréa B.P.S. Queiroz and Fabrício S. Oliveira.

Acquisition of data and data analysis by Andréa B.P.S. Queiroz and Laura G. Soares.

Microbiological analysis by Marita V. Cardozo and Gabriel M. do Nascimento.

Statistical analysis by Alisson D.S. Fechis.

Drafting of the manuscript by Andréa B.P.S. Queiroz.

Revision of the manuscript by Fabrício S. Oliveira.

8 REFERENCES

- Arluke, A. (2004) The Use of Dogs in Medical and Veterinary Training: understanding and approaching student uneasiness. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 7(3), 197-204. https://doi.org/10.1207/s15327604jaws0703_6.
- Balcombe, J. (2000) The use of animals in higher education: problems, alternatives and recommendations. The Humane Society Press. Washington. 104 p.
- Baylis, C, Uyttendaele, M, Joosten, H & Davies, A. (2011) The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. The ILSI Europe Emerging Microbiological Issues Task Force. Belgium.31-34p.
- 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.
- Brun, M.V., Pippi, N.L., Dreimeier, D. et al. (2002) Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. *Ciência Rural*, 32: 1019-1025. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000600016>
- Church, I. J. & Parsons, A.L. (1995) Modified atmosphere packaging technology: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 143-152. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740670202>
- Cury, F.S., Censoni, J.B., Ambrósio C.E. (2013). Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal *Pesq. Vet. Bras*, 33, 688-696. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000500022>
- De Crop, A., Bacher, K., Van Hoof, T. et al. (2012) Correlation of contrast-detail analysis and clinical image quality assessment in chest radiography with a human cadaver study. *Radiology*, 262(1):298-304. <https://doi.org/10.1148/radiol.11110447>
- Del Ponti, I., Vieira, G.C., Soares, L.G. et al. (2021) Vacuum packaged embalmed dogs for veterinary surgery practicing. *European Journal of Anatomy*, 25(4), 473-480.
- Ferreira, G.C., Costa, N.T.B., Cardozo, M.V. et al.. (2021) Cadáveres de caninos conservados com alcohol etílico y sal de cura y embalados al vacío para la enseñanza de la cirugía veterinária. *Revista de Investigaciones Veterinárias del Perú*, 32(4): e19075.

- Fração, V.C., Zero, R.C., Rodrigues, A. et al. (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 Med*, 4: 1-8.
- Friker, J., Zeiler, E., & Mc Daniel, B.J. 2007. From formalin to salt. Development and introduction on a saltbased preserving solution for macroscopic anatomic specimens. *Tierärztl Praxis*, 35: 243-248. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1622624>
- Goyri-O'Neill, J., Pais D., Freire de Andrade, F. et al. (2013) Improvement of the embalming perfusion method: The innovation and the results by light and scanning electron microscopy. *Acta Medica Portuguesa*, 26: 188-194.
- Guaraná, J.B., Müller, A.F., Strefezzi, R.F. et al. (2021) Swine viscera preservation in hypersaturated salt solution after alcohol fixation as a preparation method for educational purposes. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 00:1–11. <https://doi.org/10.1111/ahe.12739>
- Hammer, N., Löffler, S., Feja, C., et al. (2011) Substitution of formaldehyde in cross anatomy is possible. *Journal of National Cancer Institute*, 103: 610-611. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr035>
- Hammer, N., Löffler, S., Feja, C. et al. (2012) Ethanol-glycerin fixation with thymol conservation: A potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. *Anatomical Science Education*, 5: 225-233. <https://doi.org/10.1002/ase.1270>
- Hyde E.R., Haarmann D.P., Lynne A.M. et al. (2013). The Living Dead: Bacterial Community Structure of a Cadaver at the Onset and End of the Bloat Stage of Decomposition. *PLoS ONE* 8:10, e77733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077733>
- Janczyk, P., Weigner J., Becker, A.L., et al. (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. . <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.08.003>
- Kihara, M.T.; Zero, R.C.; Queiroz, A.B.P.S.; et al. (2023) A new model for thoracic radiology teaching and research in cadavers of embalmed dogs. *Cienc. Rural* (prelo).
- Knight, A. (2007) The effectiveness of humane teaching methods in veterinary education. *Alternatives to animal experimentation*, 91-109.
- Leitão, M.F.F (1978) Microrganismos patogênicos na carne e derivados. *Boletim ITAL*, Campinas, 59:15-48.

<http://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL8050122889>

- Leonel, F.R. (2008) Irradiação e qualidade da carne de frango congelada e embalada a vácuo. [unpublished Ph.D Thesis]- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal.
- Nissenbaum, A. (1975) The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microbial Ecology*, 2: 139-161. <https://doi.org/10.1007/BF02010435>
- 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*, 225:118 - 121. <https://doi.org/10.1111/joa.12185>
- Olson, P.R. (2016) Knowing “necro-waste”. *Social Epistemology*, 30:326–345. <https://doi.org/10.1080/02691728.2015.1015063>
- 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*, 40(6): 3099-3106. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3099>
- Prieto, J.L., Magaña, C., Ubelaker, D.H. (2004) Interpretation of postmortem change in cadavers in Spain. *Journal of Forensic Science*, 49:918–923.
- Queiroz, A.B.P.S., Soares, L.G., Vieira, G.C. et al. (2019) Biomechanics Analysis of Duodenum, Jejunum and Colon of Dogs’ Cadavers. *CPQ Med*, 8:1-5.
- Queiroz, A.B.P.S., Rodrigues, A., Cardozo, M.V. et al. (2022a) Biomechanical and microbiological analysis of embalmed cats – acute effect of conservation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94: e20201583. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201583>
- Queiroz, A.B.P.S., Rodrigues, A., Soares, L.G., et al. (2022b) Biomecânica em gatos quimicamente preparados. *Medicina Veterinária em Foco. Anais Congresso Vetscience*, 8-11.
- Queiroz, A.B.P.S., Rodrigues A, Cardozo M V, Costa, NTB, Rocha TASS, Oliveira FS (2022c) Microbiologia de gatos quimicamente preparados. *Medicina Veterinária em Foco - Anais Congresso Vetscience*, 99-102.
- Rigobelo, E.C., Cardozo, M.V., Avila, F.A., et al. (2016) An evaluation of the use of probiotics and manure composting as strategies to reduce levels of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *African Journal of Microbiology Research*, 26:1011-1017. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8034>

- Rocha, T.A.S.S., Yanagihara, G.R., Shimano, A.C. et al. (2018) Biomechanical analysis of the skin and jejunum of dog cadavers subjected to a new anatomical preservation technique for surgical teaching. *Journal of Plastination*, 30:16 - 23.
- Rocha, T.A.S.S., Queiroz, A.B.P.S., Zero, R. C., Oliveira, F.S. (2022) Bone marrow quality in chemically prepared dogs. *European Journal of Anatomy*, 26, 189-197.
- Rodrigues, H. (2010) *Técnicas Anatômicas*. 4º edição. Vitória, ES: GM Gráfica e Editora.
- 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*, 36: 220–224. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2007.00759.x>
- 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*, 9: 126. <https://doi.org/10.1186/s13018-014-0126-z>
- Tannenbaum, J. & Bennett, B.T. (2015) Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *Journal of American Association Laboratory of Animal Science*, 54:120-32.
- Tesser ES. (2009) O uso de diferentes tipos de embalagem na conservação de carnes bovinas. [unpublished Ph.D Thesis] Univ. Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, Brasil, 35 p.
- Vanderzant, C. & Splittstoesser D.E. (1992) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3ªed. Washington: American Public Health Association, p.1219.
- WHO – World Health Organization (1991) - IPCS International Programme on Chemical Safety– Formaldehyde - Health and Safety Guide, 57. <<http://www.inchem.org>>.
- WSAVA – Global Nutrition Committee – (2013) Body condition score. <https://wsava.org/global-guidelines/global-nutrition-guidelines/>
- Young, L.L., Reviere, R.D. & Cole B. (1988) Fresh meats: a place to apply modified atmospheres. *Food Science Technology*, 42: 65-69.
- Zero, R.C., Shimano, A.C., Cardozo, M.V. et al. (2020) Cadáveres de gatos preparados químicamente para la enseñanza de técnicas quirúrgicas: análisis biomecánico de piel y yeyuno. *Revista de investigaciones veterinária del Perú*, 31(2): e16172. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i2.16172>

Zero, R.C., Queiroz, A.B.P.S., Toscano, C.P., et al. A Training Model for Cerebrospinal Liquid Collection and Myelography in Embalmed Dog Cadavers. Rev.Bras.Cien.Vet. 2022, 9(4), 175-181. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2022.0031>

TABLES

Table 1 – Score of lung insufflation of the LHS chemically prepared

Score	Insuflation lobes
Bad	Apenas 1 lobe
Medium	2 a 3 lobes
Good	4 lobes
Excelent	5 ou 6 lobes

Table 2- Mean and standard deviation of Maximal Rupture Force (MRF) in Newtons (N) of SSIS chemically prepared and vacuum packed for 120 days.

Time	G1 (EA+CSS)	G2 (CSS)
D0	19.21Aa±7.26	18.29Aa±18.02
D30	23.34Aa±9.70	23.27Aa±17.00
D60	16.79Aa±6,10	21.46Aa±18.45
D90	23.02Aa±8,30	27.29Ab ±3.56
D120	28.07Ab±8.40	25.96Ab±12.85

*Means followed by the same capital letter in the same line do not differ ($p>0.05$) from each other by the Sidak test.

**Means followed by the same lowercase letter on the same column do not differ ($p>0.05$) from each other by Tukey's test.

Table 3- MRF data from the jejunum of SSIS chemically prepared and kept under vacuum for up to 120 days.

Variation sources	F value	P value
Time	8.343	<0.0001
Treatment	0.01638	0.8987
Time x Treatment	1.620	0.171

Table 4- RE data from the jejunum of SSIS chemically prepared and kept under vacuum for up to 120 days.

Variation sources	F value	P value
Time	40.73	<0.0001
Treatment	0.4816	0.4912
Time x Treatment	5.411	0.0004

Table 5- Mean and standard deviation of RE (mm) of SSIS chemically prepared and vacuum packed for 120 days

Time	G1 (EA+CSS)	G2 (CSS)
D0	9.68Aa ±4.49	13.76Ba±4.61
D30	9.06Aa±4.17	8.37Ab ±5.05
D60	6.15Ab±3.40	5.33Ab ±4.50
D90	5.02Ab±1.96	5.54Ab ±2.87
D120	5.39Ab±2.22	4.51Ab ±1.79

*Means followed by the same capital letter in the same line do not differ ($p>0.05$) from each other by the Sidak test.

**Means followed by the same lowercase letter on the same column do not differ ($p>0.05$) from each other by Tukey's test.

Table 6- Microbiological analysis of the lung tissue of the LHS chemically prepared and preserved for 300 days

Collection	conservation	samples	Total Aerobes (CFU/mL)	Total Anaerobes (CFU/mL)	Enterobacteriaceae (CFU/mL)	Sporulate (CFU/mL)	Yeast (CFU/mL)	Clostridium
D30	CSS	A6	2.09×10^2	4.5×10^2	$< 1.0 \times 10$	$< 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A6	1.6×10^2	1.2×10^2	$< 1.0 \times 10$	$< 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	ausente
D60	CSS	A4	3.7×10^2	2.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	2.3×10^3	1.1×10^2	present
	EA+CSS	A8	2.0×10^2	1.7×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	1.4×10^3	3.4×10^2	present
D90	CSS	A2	3.1×10^2	2.0×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A4	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	present
D120	CSS	A4	2.0×10^2	7.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
D300	CSS	A5	1.1×10^2	1.0×10^2	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	2.1×10^2	absent
	EA+CSS	A3	1.3×10^2	1.0×10^2	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	absent

Table 7- Microbiological analysis of LHS liquid from dogs chemically prepared and preserved for 300 days

Collection	conservation	samples	Total Aerobes (CFU/mL)	Total Anaerobes (CFU/mL)	Enterobacteriaceae (CFU/mL)	Sporulate (CFU/mL)	Yeast (CFU/mL)	Clostridium
D30	CSS	A6	1.76×10^2	1.98×10^3	$< 1.0 \times 10$	$< 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A6	1.12×10^1	1.18×10^1	$< 1.0 \times 10$	$< 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
D60	CSS	A4	2.3×10^2	1.4×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$5,2 \times 10$	1.9×10	Present
	EA+CSS	A8	9.2×10^3	7.2×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$2,1 \times 10$	2.8×10	present
D90	CSS	A2	4.5×10^2	2.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	present
	EA+CSS	A4	5.7×10^2	1.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	1.1×10^2	1.0×10	present
D120	CSS	A4	1.0×10	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A2	1.0×10	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.0×10	absent
D300	CSS	A5	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	absent
	EA+CSS	A3	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	$\leq 1,0 \times 10$	absent

Table 8- Microbiological analysis of jejunum tissue sample of SSIS chemically prepared and preserved for 300 days

Collection	conservation	samples	Total Aerobes (CFU/mL)	Total Anaerbes (CFU/mL)	Enterobacteriaceae (CFU/mL)	Sporulate (CFU/mL)	Yeast (CFU/mL)	Clostridium
D30	CSS	A5	5.7×10^2	1.2×10^2	$< 1.0 \times 10$	2.01×10^1	$\leq 1.0 \times 10$	present
	EA+CSS	A1	2.14×10^3	2.09×10^3	$< 1.0 \times 10$	$< 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
D60	CSS	A6	1.4×10^2	9.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	6.7×10^2	2.1×10^2	present
	EA+CSS	A3	1.2×10^2	2.5×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	3.2×10^2	4.2×10^2	present
D90	CSS	A1	1.2×10^2	3.3×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.2×10^2	absent
	EA+CSS	A3	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	2.3×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	present
D120	CSS	A3	1.5×10^2	1.0×10^2	2.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	2.1×10^2	absent
	EA+CSS	A1	1.2×10^2	1.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent
D300	CSS	A8	2.0×10^2	2.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	2.0×10^2	absent
	EA+CSS	A6	1.1×10^2	1.0×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	2.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	present

Table 9- Microbiological analysis of the liquid sample present in the packaging of SSIS chemically prepared and preserved for 300 days.

Collection	conservation	samples	Total Aerobes (CFU/mL)	Total Anaerbes (CFU/mL)	Enterobacteriaceae (CFU/mL)	Sporulate (CFU/mL)	Yeast (CFU/mL)	Clostridium
D30	CSS	A6	1.9×10^3	1.33×10^3	$< 1.0 \times 10$	1.1×10^3	$\leq 1.0 \times 10$	present
	EA+CSS	A3	1.3×10^3	1.8×10^3	$< 1.0 \times 10$	1.9×10^1	$\leq 1.0 \times 10$	present
D60	CSS	A6	1.1×10^2	3.2×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	4.2×10^3	2.0×10	present
	EA+CSS	A3	1.7×10^2	1.6×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	2.5×10^2	7.2×10^2	present
D90	CSS	A5	2.0×10	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	3.0×10	absent
	EA+CSS	A3	3.2×10^2	6.2×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	present
D120	CSS	A3	1.0×10	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.0×10	absent
	EA+CSS	A1	$\leq 1.0 \times 10$	1.1×10^2	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.0×10	absent
D300	CSS	A8	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	1.0×10	$\leq 1.0 \times 10$	present
	EA+CSS	A6	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	$\leq 1.0 \times 10$	absent

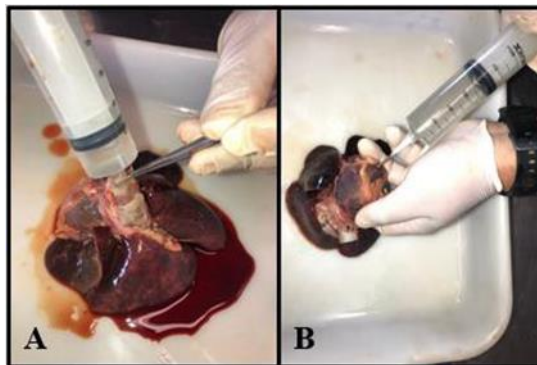
FIGURES LEGENDS

Figure 1- Injection of preservative solutions in the SSIS of dogs.



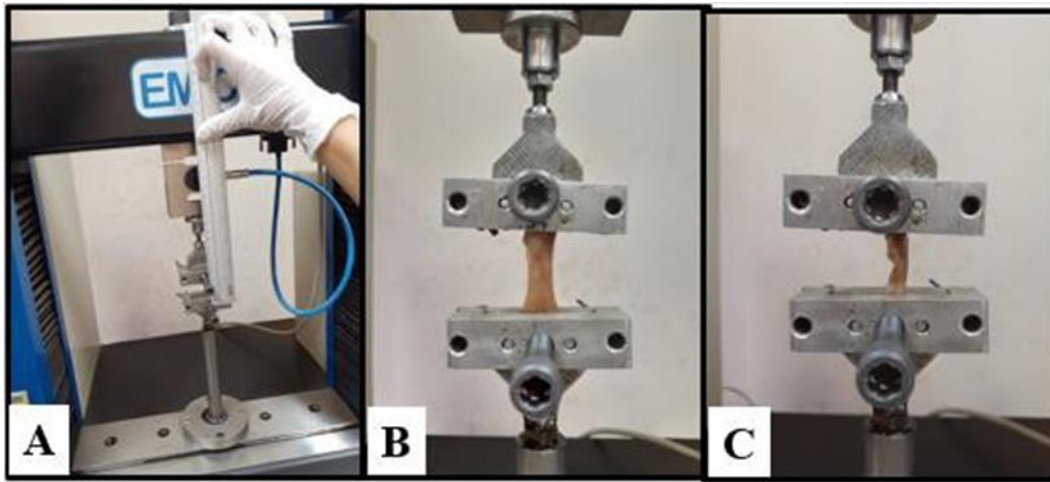
A-Injection of the solution via the cardia. B- injection of the solution into the mesenteric surface of the intestine. C- Injection of the solution into the spleen. D- Vacuum packed set and 10% of CSS weight inside the package

Figure 2- Injection of preservative solutions in the LHS of dogs.



A-Injection of the solution through the trachea B- Injection of the solution in 3 points of the myocardium

Figure 3- Assay machine used for the biomechanical analysis of the chemically prepared jejunum of dog cadavers.



A-Preparing the machine to start the analysis, free space of 2 cm for placement of the jejunum.
B- Start of the jejunal traction test C- Jejunal rupture during the traction test

Figure 4- Chemically prepared dog lung being inflated. Images from A to E demonstrate the evolution of lung insufflation by the ambu.

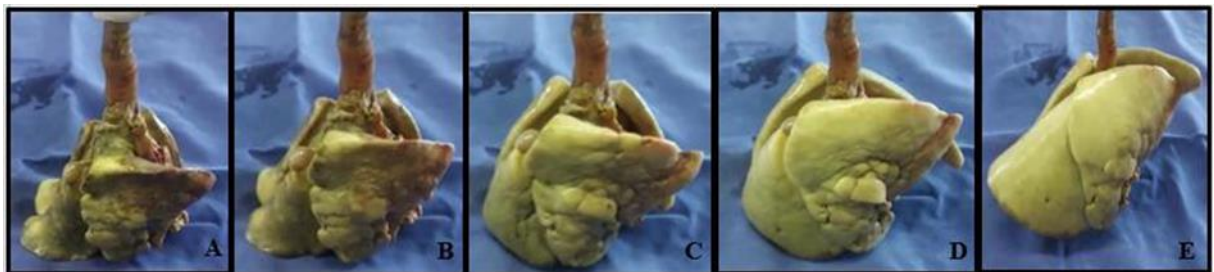


Figure 5- Comparison of MRF between G1 and G2 over time of the jejunum of SSIS chemically prepared for 120 days

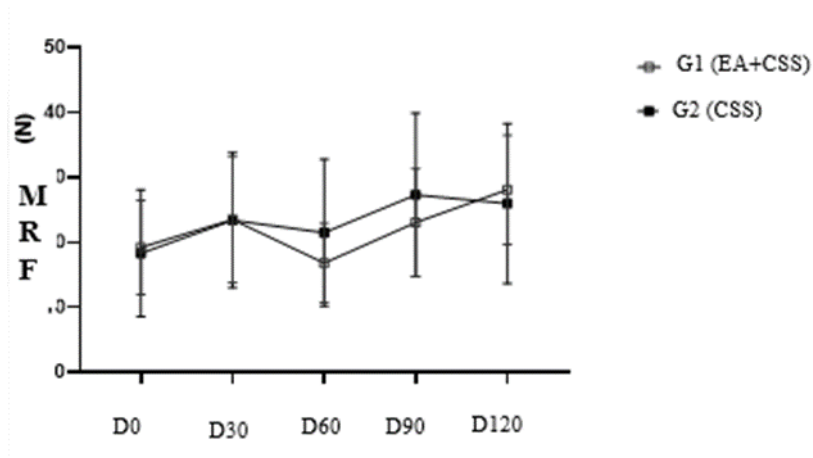


Figure 6- Comparison of RE between G1 and G2 over time of the jejunum of SSIS chemically prepared for 120 days

