

LIOFILIZAÇÃO DE VASOS DE ORIGEM SUÍNA PARA MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO

Guilherme Mesquita Soares¹
Nilza Nascimento Guimarães²

RESUMO

No presente trabalho foram testadas as técnicas de liofilização em vasos extraídos de suínos, para a verificação da integridade dos tecidos após a reidratação. Foram utilizados segmentos de artéria aorta e veia cava retirados de um suíno de pequeno porte, para compreender os processos de liofilização, e aplicar técnicas liofilização em vasos sanguíneos de suínos; analisara integridade e/ou possíveis alterações morfológicas e histológicas, antes e após a reidratação analisando posteriormente se os mesmos averiguação da viabilidade do mesmo para armazenamento em longo prazo, mantendo suas condições histológicas próprias para uso em transplantes e auto implantes e principalmente, para acervos de peças anatômicas naturais para estudo. A liofilização é um meio de conservação comprovadamente barato em relação à criopreservação, ela se dá como um processo de secagem de um produto previamente congelado, onde o solvente é removido por sublimação. Os vasos liofilizados sofreram perda de massa considerável vista a olho nu, suas estruturas se tornaram delgadas a nível celular, aumentando o espaço extracelular, porém não houve o comprometimento das estruturas primordiais celulares. Os vasos reidratados tiveram boa recuperação, tornando-se novamente pesados e maleáveis, com suas células de tamanho natural e redução do espaço extracelular, tornando o aspecto geral macroscópico e microscópico, muito similar ao de vasos *in natura*. O estudo demonstrou resultados favoráveis ao desenvolvimento da liofilização em relação a manutenção e conservação de tecidos biológicos, abrindo um leque de possibilidades para futuros estudos revistarem a técnica, podendo assim evoluir o procedimento, para que se possa obter peças com qualidade ainda mais superior.

Palavras chave: Liofilização, Vasos, Conservação, Peças, Naturais.

LIOPHILIZATION OF SWINE POTS FOR MAINTENANCE AND CONSERVATION

ABSTRACT

In the present work the freeze-drying techniques were tested in pots extracted from pigs, to the verification of the integrity of tissues after rehydration. Artery segments were used in aorta and inferior vena cava removed a small pig, to understand the processes of lyophilizing, freeze-drying techniques and application in blood vessels of pigs; analyze the integrity and/or possible morphological and histological changes before and after rehydration analyzing later if the same investigation of the feasibility for long-term storage, keeping your own histological conditions for use in transplants and implants and especially for collections of natural anatomical parts for study. Freeze-drying is a means of preservation arguably cheap in relation to cryopreservation, it occurs as a process of drying of a previously frozen product, where the solvent is removed by sublimation. The lyophilized vessels suffered considerable mass loss seen with the naked eye, its structures have become thin on the cellular level by increasing the extracellular space, but there was no commitment of primordial cell structures. The rehydrated vessels had good recovery, becoming heavy again and malleable, with in nature size cells and reduction of the extracellular space, making the macroscopic and microscopic General aspect, very similar to fresh vessel. The study showed favorable results for the development of freeze-drying in relation to maintenance and conservation of biological tissues, opening up a range of possibilities for future studies search technique, and thus develop the procedure, in order to obtain even more superior quality parts.

Key words: Lyophilizing, Vessels, Conservation, Parts, Natural.

Recebido em 12 de fevereiro de 2020. Aprovado em 06 de março de 2020.

¹ Biomedico – PUC - GO

² Professora, Fisioterapeuta – PUC - GO

INTRODUÇÃO

Existe uma grande dificuldade enfrentada por alunos, professores de anatomia e profissionais da saúde, que dependem da viabilidade de órgãos e tecidos conservados, para a realização de determinados procedimentos cirúrgicos e didáticos. Conservar cadáveres e peças naturais com qualidade é uma tarefa árdua e potencialmente perigosa para a saúde humana, pois as técnicas mais utilizadas atualmente exigem formaldeído em seu protocolo. Esse formaldeído, de odor forte, já tem seus efeitos tóxicos conhecidos como, por exemplo, a capacidade de irritar mucosas e risco de efeito carcinogênico já comprovado (VIEIRA *et al.*, 2013).

Segundo Taniguchi e colaboradores (2012), a liofilização é um processo de secagem de um produto previamente congelado, onde o solvente é removido por sublimação. Por meio desse processo podem ser obtidos produtos desidratados de alta qualidade, preservando-se as estruturas e minimizando a perda de produtos voláteis, que não são observados durante a secagem por meios convencionais. A técnica de liofilização, revisada neste trabalho visa mudar este cenário, com o intuito de melhorar a qualidade de vida das pessoas envolvidas nos estudos de anatomia e também melhorar a qualidade das peças. Além da utilização na preparação de peças anatômicas para estudo. A liofilização de tecidos tem um grande potencial na conservação de estruturas e órgãos para transplantes, como forma segura e barata de manutenção de tecidos em bancos de órgãos. O trabalho proposto por Dantas e Aguillar (2001) relata que a técnica de liofilização já está sendo usada com grande sucesso em transplantes ósseos.

A utilização de vasos sanguíneos é interessante para estabelecer protocolos e a viabilidade da liofilização, para a conservação de tecidos, pois estas são estruturas relativamente simples, de fácil entendimento anatômico e que possibilitam a padronização de métodos adequados para a manutenção de peças liofilizadas. A viabilidade das peças liofilizadas após a reidratação pode vir a ser de grande interesse para aplicações futuras em bancos de tecidos e para utilização em autotransplantes. Como em cirurgias de revascularização do miocárdio (CRM) por pontes de safena, que necessitam de vasos íntegros e saudáveis para sua execução (FILHO *et al.*, 1996).

Este tipo de cirurgia exige um período de recuperação pós-operatório ativo, no qual é recomendada atividade física regular, com boa movimentação e deambulação, para evitar a formação de trombos em veias profundas pela imobilidade dos membros inferiores (DANTAS e AGUILLAR, 2001). Nestas condições o paciente necessita executar as atividades de reabilitação com seus membros inferiores debilitados pela retirada de um vaso de calibre considerável e cicatrizes cirúrgicas de tamanho relativamente grande. A recuperação no pós-operatório torna-se um desafio para profissionais da saúde e para o próprio paciente, uma vez que, infelizmente para muitos pacientes a reincidência de obstruções em outros ramos coronários conduz à necessidade de novos procedimentos de revascularização e, conseqüentemente, em novas incisões nos membros e outra longa jornada de recuperação (FILHO *et al.*, 2010).

Neste contexto, o desenvolvimento de bancos de tecidos poderia suprir a necessidade de estruturas para autotransplantes, preservando os pacientes dos inconvenientes de uma nova incisão nos membros inferiores para a retirada de novos vasos.

Atualmente a criopreservação é um dos poucos métodos utilizados para manter células e tecidos viáveis para transplante, nos bancos de tecidos. Infelizmente, segundo Junior (2008), essa técnica apresenta dois grandes problemas: (i) os tecidos crio preservados podem sofrer interferências histológicas e morfológicas, no início do processo de congelamento e no processo de descongelamento, no ato de seu uso; (ii) o alto custo de manutenção, armazenamento e transporte do material em temperaturas muito baixas (em torno de -90 a -196°C), o que muitas vezes inviabiliza a crio conservação de determinados tecidos.

Deste modo, a liofilização pode vir a ser uma boa alternativa para a conservação de vasos e peças anatômicas para diversas finalidades.

O Trabalho teve como objetivo compreender como processos desidratação por meio da liofilização, afeta os vasos sanguíneos de suínos.

METODOLOGIA

A presente pesquisa foi realizada nos laboratórios de anatomia humana e laboratório de estudo e pesquisa de produtos naturais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Foi utilizado um segmento de 10 cm de vasos retirados de um suíno de pequeno porte. O animal utilizado na presente pesquisa foi doado pelo laboratório de técnicas operatórias da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. O projeto da pesquisa foi previamente apresentado ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) e aprovado, sendo registrado sob protocolo nº 009-1. Conforme a resolução nº 714, de 20 de junho de 2002 do comitê de ética em pesquisa animal, foi administrado no suíno drogas pré-anestésicas (Cloridrato de Cetamina + Acepromazina 33mg/kg + 1,1mg/kg IM) e anestésico (Pentoarbital 20-40 mg/kg IV 3-6 mg/kg/h em infusão contínua IV) para proporcionar maior conforto ao animal, que posteriormente foi sacrificado pela veterinária responsável pelos animais utilizados no curso de medicina, nas dependências do laboratório de técnica operatória, após a sua utilização nas aulas práticas de cirurgias.

Foram usados para esse procedimento luvas e máscaras descartáveis, bisturis, pinças cirúrgicas, lâminas para microscopia 26 por 72 mm, tubo de ensaio de vidro (diâmetro 20 a 150 mm), seringa descartável 5 ml e agulhas descartáveis tamanho 30 por 10 mm.

O processo de liofilização foi executado segundo o protocolo estabelecido por Taniguchi e colaboradores (2012). Para o procedimento de liofilização foi utilizado um Liofilizador de Bancada (Marca Terroni - 100% em aço inox LS3000) e um freezer comum para congelamento das peças e condicionamento do material pré e pós-liofilizado. A montagem das lâminas histológica seguiu o protocolo de TIMM (2005), e foi utilizado um microscópio binocular óptico, da marca Nikon, modelo eclipse E200 para observação das lâminas e comparação dos tecidos.

Após a retirada dos segmentos de vasos, as peças foram lavadas com soro fisiológico (solução de ringer 0,9%). Imediatamente após este procedimento os vasos foram divididos em segmentos menores, de aproximadamente 2,5 cm de comprimento, preenchidos com gaze ou algodão cirúrgico, mergulhados no soro fisiológico e acondicionados em freezer comum, para congelamento.

As amostras foram divididas em 2 grupos: um grupo para controle, que foi mantido apenas em congelamento até o momento da análise histológica e um grupo que foi desidratado pelo sistema de liofilização que foi reidratado com soro fisiológico e observado em microscópio.

Para o controle, as amostras foram descongeladas e, seguindo as diretrizes do processo de corte e montagem de lâminas histológicas, descrito por Timm (2005), foram processadas para a visualização e comparação no microscópio. As outras partes sofreram a desidratação no liofilizador, seguindo o protocolo de Taniguchi e colaboradores (2012). As amostras foram resfriadas a -41°C e acomodadas na câmara de vácuo para a liofilização. Para completar o processo foram necessárias 72 horas de no liofilizador, com pressão atmosférica de 160mTorr.

Em seguida os vasos foram armazenados em um freezer, por 30 dias, para avaliar a viabilidade do tecido submetido a um tempo de conservação prolongado. Após esse período os vasos foram encaminhados para o laboratório histológico para o preparo de lâminas histológicas. Uma parte dos vasos foi reidratada em soro fisiológico 0,9%, durante 2 horas e depois processada para a preparação das lâminas histológicas. A outra parte dos vasos foi processada sem nenhum tipo de reidratação, para a análise da estrutura liofilizada. No final foram obtidos 3 grupos de laminas histológicas: grupo do controle não liofilizado, grupo da

amostra liofilizada reidratada e grupo da amostra liofilizada sem reidratação. A análise histológica comparativa foi feita para averiguar as diferenças a nível celular entre as lâminas das amostras.

RESULTADOS

Após o processo de liofilização, pôde-se observar que os vasos estudados não sofreram grandes modificações na estrutura histológica, apresentando uma boa viabilidade na conservação dos mesmos.

O aspecto macroscópico das amostras liofilizadas se mostrou condizente com a realidade das mesmas *in natura* (fig. 1 e 2). As estruturas morfológicas não sofreram alterações, exceto pela massa diminuída observada a olho nu, em decorrência da ausência de líquidos nos compartimentos intracelulares e extracelulares.



Figura 1 – Estrutura macroscópica de uma artéria liofilizada.



Figura 2 – Estrutura macroscópica de uma veia liofilizada.

O aspecto dos vasos liofilizados que sofreram o processo reidratação com soro fisiológico, não se mostrou diferente, em termos morfológicos, com relação aos vasos em estado natural, pois grande parte do líquido perdido no processo de liofilização foi recuperado (fig. 3). Os compartimentos hídricos dos tecidos apresentaram uma aparência natural, muito semelhante aos vasos que não passaram pelo processo.

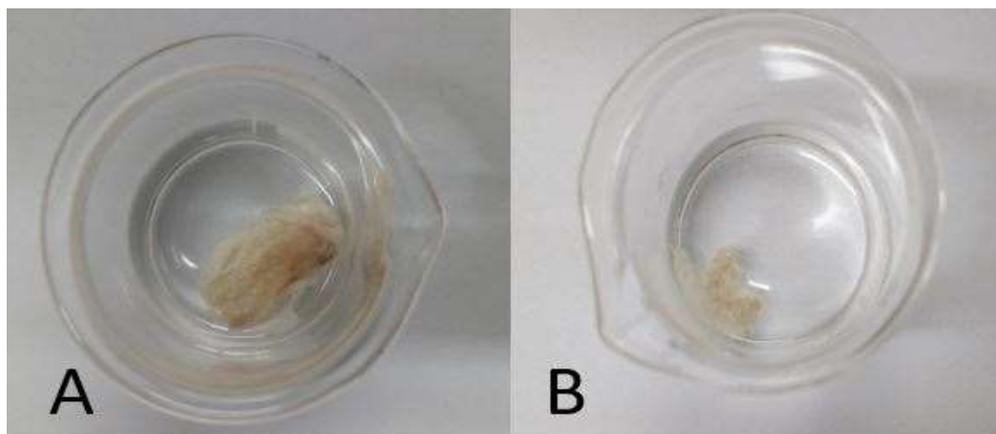


Figura 3 – Vasos liofilizados em processo de reidratação. A – Artéria e B – veia.

A conservação bem-sucedida das veias, para esse trabalho, é essencial, pois um dos objetivos dessa pesquisa é o desenvolvimento de um protocolo viável para o processo de liofilização, visando futuras técnicas de conservação de vasos para reimplantes.

A amostra de veias retiradas de um suíno jovem demonstra as características anatômicas e morfológicas usuais, com túnica íntima delgada, túnica média bem conservada e adventícia alongada, figura 4.

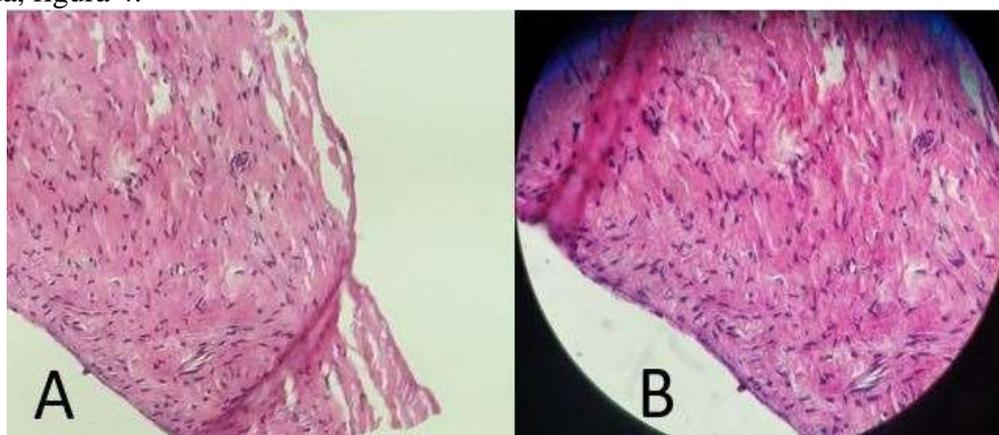


Figura 4 – Corte histológico de veia *in natura* corado H&E. Seção transversal. A – aumento de 40x e B- aumento de 100x.

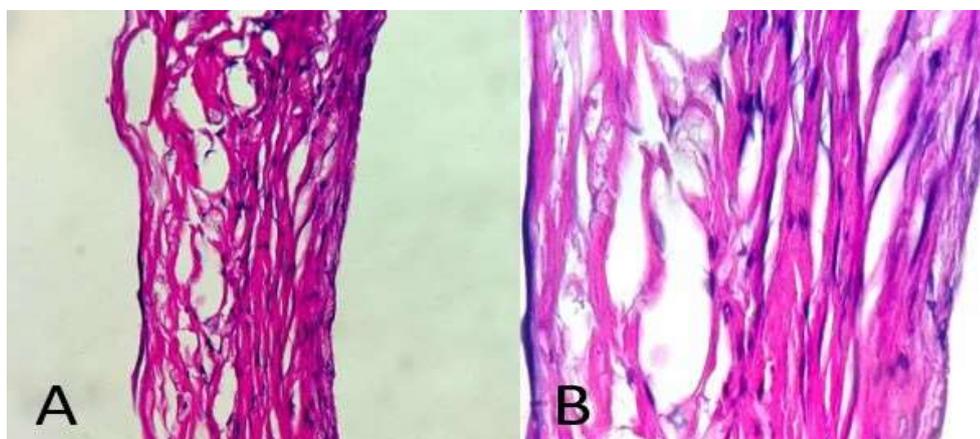


Figura 5 – Corte histológico de veia liofilizada corado H&E. Seção transversal. A – aumento de 40x e B- aumento de 100x.

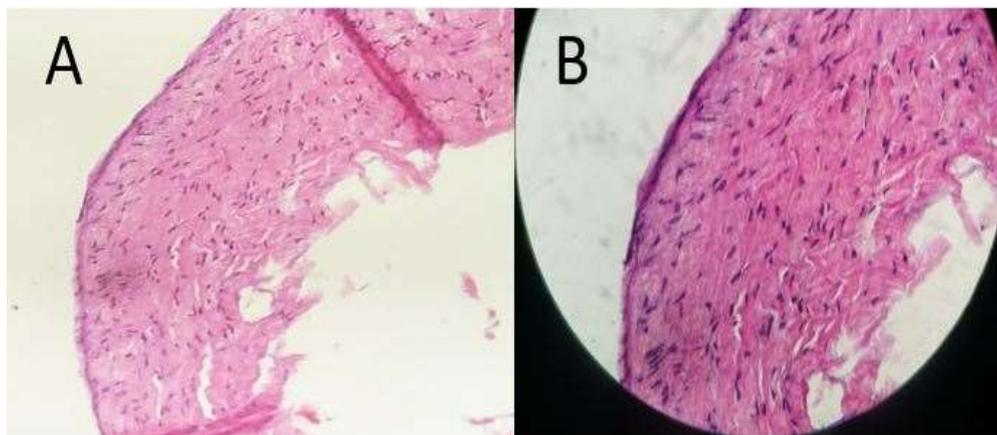


Figura 6 – Corte histológico de veia reidratada em soro fisiológico, corado H&E. Secção transversal. A – aumento de 40x e B- aumento de 100x.

A veia liofilizada apresentou as características morfológicas naturais dos vasos (fig. 5). Só que a nível celular, foi observada uma modificação nas suas células, que se tornam mais delgadas em virtude da retirada de líquidos, aumentando também o espaço extracelular. Alguns pontos do tecido mostraram perda de contato entre as células, sugerindo a perda das junções entre as membranas.

Após a reidratação com soro fisiológico (fig. 6) o vaso se tornou mais pesado e maleável, suas células retornaram ao tamanho natural e o espaço extracelular diminuiu, tornando o aspecto geral macroscópico e microscópico muito similar ao das veias *in natura*.

O resultado da liofilização nos segmentos arteriais foi muito semelhante em relação aos obtidos em veias. A figura 7 mostra um corte histológico arterial *in natura*, em que se evidenciam todas as estruturas morfológicas de uma artéria saudável, com túnicas íntima, média e adventícia bem delimitadas, células e espaço extracelular preservados.



Figura 7 – Corte histológico de artéria *in natura* corado H&E. Secção transversal. Aumento de 40x



Figura 8 – Corte histológico de artéria liofilizada, corado H&E. Secção transversal. Aumento de 40x

A figura 8 mostra um corte histológico da artéria aorta liofilizada, evidenciando a conservação dos aspectos morfológicos deste vaso, porém, com redução já esperada do volume das células e um aumento sutil do espaço extracelular.

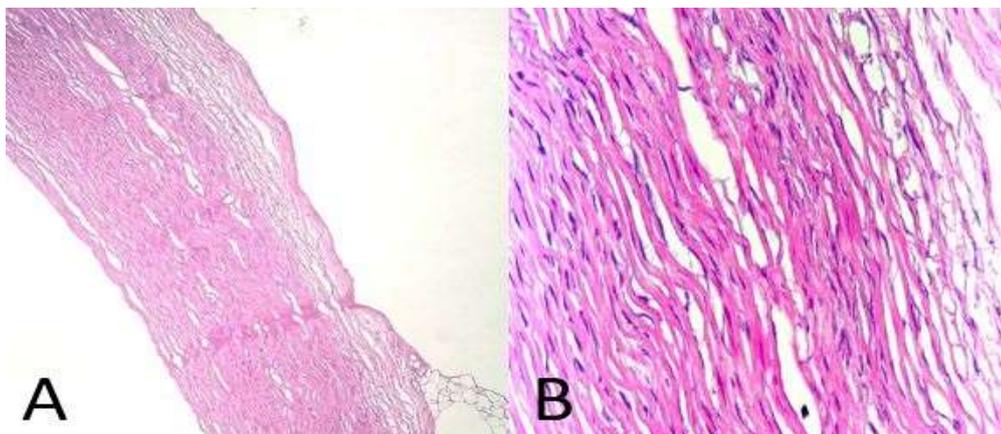


Figura 9 – Corte histológico de artéria reidratada, Soro fisiológico, corado H&E. Secção transversal. A – aumento de 40x e B- aumento de 100x.

Após todo o processo, seguido pela reidratação com soro fisiológico (fig. 9), o vaso tornou-se mais pesado e maleável, suas células recuperaram o volume natural e o espaço extracelular diminuiu, tornando o aspecto geral macroscópico e microscópico, muito similar ao vaso *in natura*.

DISCUSSÃO

Segundo Silva e colaboradores (2000), em um estudo comparativo sobre duas técnicas de armazenamento de enxertos de ossos, os enxertos homogêneos estão sendo utilizados na prática clínica com bons resultados. Alguns centros médicos criaram serviços específicos, denominados de “Banco de Ossos”, para o desenvolvimento dessa nova modalidade de reconstrução óssea. Isso demonstra a quão promissora é a técnica de liofilização.

Como um dos objetivos, o presente estudo visa disseminar o desenvolvimento da liofilização em relação à preservação de tecidos viáveis para bancos de armazenamento de tecidos. A ideia de um banco de dados para autotransplante e um acervo de peças que podem ser reidratadas a qualquer momento para estudos em anatomia, pode mudar o modo de conservação de peças anatômicas para estudos. No presente trabalho os resultados foram

positivos, uma vez que os vasos liofilizados mantiveram seu estado morfológico satisfatório, apesar da retirada de todo o compartimento líquido dos tecidos.

No trabalho, testou-se o protocolo proposto por Taniguchi e colaboradores (2012), com adaptações para o processo de liofilização de tecido vascular. O procedimento retirou até 95% da água, e proporcionou amostras desidratadas com qualidade. Em nosso estudo usamos soro fisiológico a 0,9% para lavar as estruturas e retirar o máximo de resíduos de sangue possível. As amostras foram acondicionadas em freezer comum e para preparar a reidratação das mesmas, após o processo de liofilização foi utilizado o soro fisiológico a 0,9%. No ato da execução dos trabalhos, foi percebido como foi demonstrado nos resultados o seu alto grau prosperidade, abrindo espaço para trabalhos futuros revisitarem a técnica e possivelmente alterar alguns aspectos da mesma como por exemplo o tempo de exposição da peça liofilizada em relação a solução hidratante, e o própria solução hidratante para procurar sempre aumentar a qualidade das peças.

CONCLUSÃO

Os vasos liofilizados sofreram perda de massa considerável, visível a olho nu, devido às estruturas que tornarem delgadas a nível celular, aumentando o espaço extracelular, porém não houve o comprometimento das estruturas primordiais celulares.

Porém a resposta dos vasos ao procedimento de reidratação foi muito interessante, correspondendo ao que se esperava dos experimentos, com aparência histológica muito similar ao de vasos *in natura*.

Com base nestas observações concluímos que o procedimento tem muito potencial no campo da produção de peças para estudo de anatomia e requer a continuidade em suas investigações, para avaliar as características fisiológicas das células após a reidratação, para a análise da viabilidade destes tecidos para o objetivo de autotransplante.

REFERÊNCIAS

- DANTAS, R.A.S., AGUILLAR, O.M. **Problemas na recuperação de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio: o acompanhamento pelo enfermeiro durante o primeiro mês após a alta hospitalar.** Rev latino-am enfermagem 2001 novembro-dezembro;9(6):31-6.
- SILVA, A.B.D., RODRIGUES, L., JORGE, T. T. I. W., BESTEIRO, J.M., FERREIRA, M.C., GONÇALVES, C.G., DOS REIS, L.M. **Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes.** Acta cir bras 2000, 15 (supl 3): 74-77.
- TANIGUCHI, F.P., MAIZATO, M.J.S., AMBAR, R.F., PITOMBO, R.N.M., LEINER, A.A., MOREIRA, L.F.P., CESTARI, I.A., STOLFN, A.G. **Estudo in vivo do comportamento de bioprótese liofilizada: seguimento de 3 meses em carneiros jovens.** Rev bras cir cardiovasc 2012, 27(4):592-9.
- FILHO, J.G. L., LOBO FILHO, H.G., MESQUITA, F.J.C., LINHARES FILHO, J.P.P. **Enxerto composto de artéria torácica interna esquerda e veia safena magna: estudo angiográfico após oito anos.** Rev bras cir cardiovasc 2010, 25(1): 118-121.
- FILHO, J.G. L., OLIVEIRA, F.M., CIARLINE, C., FEITOSA, J.A., ROLIM, A.V., FAÇANHA, J.E., LOBO, R.A.C.M., DANTAS, M.C.B.R., LIMA, R.C., ESCOBAR, M.A.S., MENDONÇA, J.T., WANDERLEY NETO, J. **Cirurgia de revascularização do miocárdio através de minitoracotomia ântero-iateral esquerda.** Rev bras cir cardiovasc 1996, 11 (3):143-7.

JUNIOR, V.T. (2008). **Etapas críticas na liofilização do pericárdio bovino**. São paulo, são paulo, brasil.

NEVES, M.F.T., SOUZA, J. F., OIGMAN, W. **Alterações morfológicas na parede de artéria muscular em pacientes hipertensas**. *Arq bras cardiol* 1998, volume 70 (nº 1), 19-23.

TIMM, L.L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas**. *Caderno lasalle xi2005 , canoas*, 231 - 239.

VIEIRA, I.I.F., DANTAS, B.P.A., FERREIRA, F.C.M., CARVALHO, R.B.A.C., FREIRE, I.B., NETO, E.J.S. **Efeitos da utilização do formaldeído em laboratórios de anatomia**. *Ciênc. Saúde Nova Esperança* 2013, 11(1):97-105.