



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Arlon Breno Figueiredo Nunes da Silveira

**ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E DA
DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS INDUZIDAS POR
BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇUCAR E POLIPROPILENO**

RECIFE
2014



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia

Arlon Breno Figueiredo Nunes da Silveira

**ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E DA
DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS INDUZIDAS POR
BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇUCAR E POLIPROPILENO**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Cirurgia.

Orientador
Dr. Salvador Vilar Correia Lima
Prof. Adjunto do Depto de Cirurgia, CCS-UFPE

Catálogo na Fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Bibliotecária: Mégine Cabral

S586e Silveira, Arlon Breno Figueiredo Nunes da.
Estudo comparativo da reação inflamatória e da deposição de
fibras colágenas induzidas por biopolímero da cana-de-açúcar e
polipropileno/ Arlon Breno Figueiredo Nunes da Silveira. . Recife: O
autor, 2014.
82 p.: il.

Tese (Doutorado em Cirurgia) - Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.

1. Inflamação. 2. Biopolímero. 3. Incontinência urinária. 4.
Colágeno. 5. Saccharum. I. Lima, Salvador Vilar Correia. II. Título.

616-002

Í ESTUDOS COMPARATIVO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E DA DEPOSIÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS APÓS O IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO MONOFILAMENTAR E BIOPOLÍMERO DA CANA-DE-AÇÚCAR NO SUBCUTÂNIO DE RATOS ADULTOSÍ.

ARLON BRENO FIGUEIREDO NUNES DA SILVEIRA

APROVADA EM: 28/02/2014

ORIENTADOR INTERNO: DRº. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFº. DRº. JOSÉ LAMARTINE DE ANDRADE AGUIAR (PRESIDENTE) CCS/UFPE

PROFº. DRº. FERNANDO RIBEIRO DE MORAES NETO - CCS/UFPE

PROFº. DRº. SÍLVIO DA SILVA CALDAS NETO - CCS/UFPE

PROFº. DRº. JOÃO LUIZ AMARO Ë FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU

PROFº. DRº. FÁBIO DE OLIVEIRA VILAR Ë CCS/UFPE

Universidade Federal de Pernambuco

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Saulo Monteiro dos Santos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto



Dedicatória

*A Miguel, fruto do amor mais forte e verdadeiro,
minha continuidade.*

*Com seu um ano e cinco meses cheios de vida e de graça, ensina-me a ser pai; e, ao
nascer, me deu a responsabilidade de nem pensar em desistir dessa tese. Porque
sempre quero te dar motivos para você ter orgulho de mim, meu filho amado.*



Agradecimientos

A *Marcela*, minha esposa, pela força e amor que nos une. Obrigado por sonhar comigo, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

À minha avó *Creusa*, pela sabedoria em me educar, por seus gestos solidários, pela sua espiritualidade, pelo amor e carinho de mãe que soube me proteger e me ensinar os limites da vida. Por ter me incentivado a trilhar os caminhos do conhecimento, capaz de transformar as pessoas sempre para melhor, mesmo sem a vida ter lhe dado chance disso. (*in memoria*)

Ao professor *Salvador Vilar*, exemplo de pesquisador, respeitado em todo o Brasil, orientador desta pesquisa, pelas valiosas colaborações, críticas e sugestões na elaboração desta tese. Obrigado Professor pela "porta aberta" há 4 anos quando eu tinha apenas algumas folhas escritas e um sonho a ser realizado.

Às minhas tias, *Vilma, Bia e todos os meus familiares*, ligados a mim da mesma forma, pela confiança depositada, apoio emocional nos momentos difíceis e por fazerem parte da minha família.

Aos meus sogros, *Mauro e Marcilene*, por me abraçarem em seu seio familiar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da UFPE, por partilharem seus conhecimentos.

À *Olávio Campos*, pela disponibilidade em compartilhar sua experiência na leitura das lâminas histológicas.

Aos colegas da turma de pós-graduação, pelas ricas trocas de experiências possíveis durante esse percurso.

À *Isabela*, assistente da pós-graduação em cirurgia, por sua disposição indefectível em ajudar, em administrar as inúmeras questões burocráticas e informativas.

À Médica Veterinária *Adriana Ferreira Cruz* pela dedicação e empenho que conduz o Biotério de Cirurgia Experimental Hospital das Clínicas.

Ao funcionário do Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, *Paulo Silva*, pela colaboração na execução deste projeto.

À *Mégine Cabral*, pela cuidadosa revisão das referências bibliográficas da tese.



Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
RESUMO	XXII
ABSTRACT	XXIV
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos gerais	02
1.2. <i>Slings</i> : a evolução do conceito	03
1.3. A busca por materiais alternativos: os <i>slings</i> artificiais	04
1.3.1. Materiais orgânicos	05
1.3.2. As telas sintéticas	06
1.3.3. Os <i>slings</i> de polipropileno	08
1.4. Biopolímero da cana-de-acúcar	12
1.4.1. Aplicabilidades clínicas e experimentais do biopolímero da cana-de-acúcar	14
1.5. Cicatrização de feridas	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Local de estudo	23
3.2. Tipo de estudo	23
3.3. População do estudo	23
3.4. Seleção	23
3.5. Procedimentos técnicos	24
3.5.1. Fluxograma de coleta de dados	27
3.5.2. Padronização dos procedimentos cirúrgicos	27
3.5.3. Sacrifício dos animais, coleta e preparo das amostras teciduais	29
3.6. Análises microscópicas	32
3.7. Procedimentos analíticos	34
3.7.1. Variáveis do estudo	34
3.7.2. Tamanho e expressão da amostra	35

3.7.3. Testes estatísticos utilizados	35
3.8. Aspectos éticos	36
4. RESULTADOS	38
4.1. Observações realizadas no período pós-operatório	39
4.2. Estudo anatomopatológico	39
4.2.1. Infiltrado inflamatório agudo	39
4.2.2. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário	41
4.2.3. Fibrose	42
4.2.4. Necrose e calcificação	45
4.2.5. Quantificação de células gigantes	45
4.2.6. Neoangiogênese	48
4.3. Quantificação das fibras colágenas através da histofotometria	50
5. DISCUSSÃO	53
5.1. Considerações sobre o modelo experimental	54
5.2. Considerações sobre a metodologia	55
5.3. Aspectos gerais da resposta tecidual	57
5.3.1. Considerações sobre aspectos específicos da integração das telas utilizadas no estudo	58
6. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	78
ANEXO1. PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS	79
ANEXO2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	80



Lista de Abreviaturas e Siglas

APEVISA	Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária
BPCA	Biopolímero da cana-de-açúcar
CEEA-UFPE	Comitê de Ética e Experimentação Animal
COBEA	Comitê Brasileiro de Experimentação Animal
HE	Hematoxilina Eosina
MMT	Dimetiltiazol
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoretileno
SIS	Submucosa intestinal suína
TVT	<i>%TensionFree Vaginal Tape+</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
VEGF	Fator de crescimento endotelial



Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Slings artificiais Æ classificação segundo os principais materiais	04
Tabela 2	Slings de polipropileno monofilamentar Æ erosão e extrusão	10
Tabela 3	Comparação de Células gigantes entre biopolímero e polipropileno sete dias após o procedimento	44
Tabela 4	Comparação de Células gigantes entre biopolímero e polipropileno 120 dias após o procedimento	45
Tabela 5	Valores obtidos através da análise histofotométrica comparando o biopolímero ao polipropileno quanto à deposição de fibras colágenas após sete e 120 dias do procedimento.	50



Lista de Figuras

		Página
Figura 1	Tela de polipropileno utilizada em cirurgia de <i>Sling</i> .	11
Figura 2	Estrutura microscópica da tela de polipropileno monofilamentar e macroporosa.	11
Figura 3	Esquema mostrando a interação entre a bactéria <i>Zoogloea sp.</i> , o melão da cana-de-açúcar e a formação da membrana de biopolímero.	13
Figura 4	Esquema do abdome dos ratos adultos com linha imaginária dividindo-o em dois hemicírculos direito e esquerdo. Notar também a indicação das incisões cirúrgicas em cada hemicírculo.	25
Figura 5	Implantes utilizados no experimento. Telas: biopolímero à esquerda e polipropileno à direita.	26
Figura 6	Esquema passo a passo do procedimento	29

cirúrgico de implante das telas de biopolímero e polipropileno.

Figura 7 Retirada da parede abdominal após sacrifício do animal. Este método permitiu a retirada uniforme dos cortes verticais. **30**

Figura 8 Foto da parede abdominal após dissecação, fixada a superfície rígida e colocada em recipiente para fixação histológica. Observar as extremidades presas por alfinetes em superfície rígida. **30**

Figura 9 Ilustração demonstrando a área retangular na qual contém o material a ser analisado de cada hemicírculo. **31**

Figura 10 Demonstração de um retângulo de 15x10mm de um dos ratos sendo dividido em outros cinco retângulos menores de 15x2mm. Observar também a identificação do retângulo. **32**

Figura 11 Comparação da intensidade do infiltrado **40**

inflamatório polimorfonuclear produzido pelo biopolímero e polipropileno após sete dias do implante.

- Figura 12** Reação inflamatória aguda com os materiais implantados. PP = polipropileno e BP=biopolímero. 40
- Figura 13** Comparação da intensidade da reação linfoplasmocitária produzida pelo biopolímero e polipropileno após sete dias do implante. 41
- Figura 14** Comparação da intensidade da reação linfoplasmocitária produzida pelo biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante. 42
- Figura 15** Corte histológico demonstrando formação de fibrose induzida pelos implantes. PP = polipropileno e BP = biopolímero. Aumento 200x. 43
- Figura 16** Comparação da fibrose produzida pelo 43

biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante.

- Figura 17** Gráfico mostrando a evolução da fibrose induzida pelo polipropileno entre sete e 120 dias após a sua implantação. 44
- Figura 18** Gráfico mostrando a evolução da fibrose induzida pelo biopolímero da cana-de-açúcar entre sete e 120 dias após a sua implantação. 44
- Figura 19** Comparação do número de células gigantes nos ratos sacrificados entre sete e 120 dias com implante de polipropileno. 46
- Figura 20** Comparação do número de células gigantes nos ratos sacrificados entre sete e 120 dias com implante de biopolímero. 47
- Figura 21** Análise Comparativa da presença de Células Gigantes entre sete e 120 dias para o biopolímero 47

e o polipropileno.

- Figura 22** Diferença, após 120 dias, da neoangiogênese induzida por polipropileno e biopolímero. 48
- Figura 23** Comparação da formação de novos vasos induzida por biopolímero entre grupos de animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento. 49
- Figura 24** Comparação da formação de novos vasos induzida pelo polipropileno entre grupos de animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento. 49
- Figura 25** Comparação entre o biopolímero e polipropileno após sete dias do implante para quantificação das fibras colágenas. Mostrando a diferença entre o polipropileno (valor zero no gráfico) e o biopolímero (losango no gráfico). 50

- Figura 26** Comparação entre o biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante para quantificação das fibras colágenas. Mostrando a diferença entre o polipropileno (valor zero no gráfico) e o biopolímero (losango no gráfico). 51
- Figura 27** Comparação da deposição de fibras colágenas induzidas pelo polipropileno após sete e 120 dias do implante. 52
- Figura 28** Comparação da deposição de fibras colágenas induzidas pelo biopolímero após sete e 120 dias do implante. 52



Resumo

Introdução: O *Sling* é considerado padrão ouro para o tratamento da Incontinência Urinária de Esforço. Essa técnica cirúrgica utiliza um material sintético no espaço suburetral para prover um arcabouço de fibrose e corrigir a perda urinária. A partir do melaço da cana-de-açúcar, por síntese da bactéria *Zoogloea* sp., obtivemos o biopolímero da cana-de-açúcar que pode ser processado em forma de membrana. Nosso objetivo é avaliar a ação do biopolímero da cana-de-açúcar comparando-o com o polipropileno, no tocante, a reação inflamatória e indução da formação de fibras colágenas.

Material e Métodos: Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, controlado, tipo ensaio clínico. Utilizamos 30 ratos Wistar, divididos em dois grupos de 15 animais, que tiveram uma tela de polipropileno e outra membrana de biopolímero da cana-de-açúcar implantadas no subcutâneo da parede abdominal. Os animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento. Analisamos e comparamos a reação inflamatória e a deposição de fibras colágenas induzidas pelos materiais utilizados. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

Resultados: A reação inflamatória aguda e linfoplasmocitária foram maiores, nos primeiros sete dias, induzidas pelo biopolímero. Sendo essas respostas semelhantes entre os materiais após 120 dias. A deposição de fibras colágenas foi significativamente maior quando induzida pelo biopolímero, tanto após sete dias, quanto após 120 dias. Não foi demonstrada rejeição, infecção, necrose em nenhum dos animais do estudo.

Conclusão: O biopolímero no subcutâneo dos ratos, em nosso experimento, estimulou uma resposta inflamatória e um acúmulo de fibras colágenas maiores que o polipropileno.

Palavras chave: inflamação, biopolímero, incontinência urinária, colágeno, cana-de-açúcar.



Abstract

Introduction: The Sling is considered the gold standard for the treatment of Stress Urinary Incontinence. This surgical technique uses a synthetic material in the sub urethral space to provide a framework of fibrosis and correct urinary loss. From the molasses of sugarcane by synthesis of bacteria Zoogloea sp is obtained the biopolymer from sugarcane that can be processed in the form of membrane. Our goal is to show the action of the sugarcane biopolymer compared with polypropylene, regarding the inflammatory response and induction of collagen fiber formation.

Material and Methods: This is an experimental study, prospective, controlled, clinical trial type. We used 30 Wistar rats, divided into two groups of 15 animals, one had a polypropylene mesh and the other biopolymer membrane of sugarcane implanted subcutaneously in the abdominal wall. The animals euthanized after seven and 120 days after the procedure. We analyzed and compared the inflammatory reaction and collagen deposition induced by the materials used.

Results: The acute inflammatory reaction and lymphoplasmocytary were higher in the first seven days induced by biopolymer. Being similar responses among these materials after 120 days. The collagen fibers deposition was significantly greater when induced by biopolymer, after seven days, and after 120 days. It was not demonstrated rejection, infection, necrosis of none of the animals in the study.

Conclusion: The biopolymer in subcutaneous of rats in our experiment, stimulated an inflammatory response and an accumulation of collagen fibers of larger than polypropylene.

Keywords: inflammation, biopolymer, urinary incontinence, collagen, sugarcane



1. Introdução

1.1. Aspectos gerais

A incontinência urinária foi definida pela Sociedade Internacional de Continência como qualquer perda involuntária de urina. Entre as várias formas de apresentação dessa condição há a incontinência urinária aos esforços, definida como a perda que ocorre em situações como durante tosse ou espirro.

1

A incontinência urinária determina impacto econômico significativo sobre a sociedade. Não apenas os pacientes e seus familiares são afetados, mas também toda a sociedade, visto que o estado detém, em última análise, a obrigação de prover o bem-estar dos seus cidadãos.

Estudos que abordam o custo-benefício dos tratamentos para a incontinência urinária ainda são relativamente raros, o que dificulta a criação de critérios objetivos para alocação de recursos no tratamento dessa condição. Apesar disso, já foi possível determinar, por meio de pesquisas com metodologia padronizada, que o tratamento da incontinência urinária tem impacto positivo sobre a sociedade.^{2,3}

Verificam-se, atualmente, os efeitos da pressão mercadológica da economia globalizada sobre o exercício da Medicina como um todo. Presenciamos um crescente número de tecnologias e dispositivos sendo oferecidos como a melhor opção para alívio ou cura dessa afecção no cotidiano médico. Dessa forma, é fundamental a execução de pesquisas sobre os tratamentos clínicos ou cirúrgicos disponibilizados para portadores de incontinência urinária; assim como, a validação clínica e científica de novos materiais usados nesses procedimentos.

Os estudos produzidos na academia têm por objetivo maior, aproximar a sociedade dos avanços científicos, adequando-se as necessidades e a realidade local. No tocante a incontinência urinária, precisávamos de um material que mantivesse a mesma eficácia, porém oriundo de uma matriz acessível e com um custo compatível à economia da nossa região.

Com a identificação desse material, surgiu o questionamento e a necessidade de investigação com o intuito de produzir evidências que indicassem ou desaconselhassem o uso na Incontinência Urinária. Esse estudo permitiu questionar, comparar e, por vezes, contrapor materiais existentes, a fim de orientar e prover subsídios para novas pesquisas clínicas no tratamento da Incontinência Urinária.

1.2. *Slings*: a evolução através do tempo

O emprego de *slings* suburetrais data do início do século XX. Giordano⁴ (1907) sugeriu o uso do músculo grácil ao redor da uretra. Logo a seguir, em 1910, Goebel⁵ descreveu a transposição do músculo piramidal sob a uretra, de maneira a formar uma alça. Em 1914, Frankenheim⁶ sugeriu a possibilidade de emprego do músculo reto do abdome como *sling* suburetral. Logo a seguir, Stoeckel⁷ (1917) sugeriu a combinação das propostas de Goebel (1910) e de Frankenheim (1914) e adicionou a plicatura do colo vesical.

Em seguida, surgiram propostas de aperfeiçoamento da técnica, com destaque para Aldrige⁸ (1942), que foi o primeiro a descrever o emprego de retalhos da aponeurose do músculo reto do abdome. Somente em 1978, McGuire e Lytton reintroduziram a técnica, desta vez utilizando as faixas de aponeurose do músculo reto abdominal na forma de enxertos, de maneira simples e padronizada, com o acesso combinado abdominovaginal.

O emprego dos *slings* disseminou-se na década de 90, com a apresentação da Teoria Integral da Continência, por Petros e Ulmsten⁹ (1990). Foi valorizada a participação do suporte conjuntivo pubouretral na manutenção da continência urinária, e seu reforço por meio de faixas sintéticas. Com base na Teoria Integral surgiram os *slings* minimamente invasivos da uretra média, tendo como precursor o *Tension-free Vaginal Tape*, que foi largamente popularizado¹⁰. A partir da experiência com os *slings* pubouretrais de uretra média, Delorme¹¹ (2001) propôs a ancoragem das faixas através do acesso transobturatório. No momento, vários pesquisadores dedicam-se a estudar as vantagens e desvantagens dessa abordagem^{12,13} cujo papel exato na cura da

incontinência urinária de esforço ainda está por ser definitivamente estabelecido.

1.3. A busca por materiais alternativos: os *slings* artificiais

A decisão primária acerca da escolha do material para confecção do *sling* suburetral envolve o emprego de material autólogo ou artificial (orgânico ou sintético). Formalmente, o *sling* artificial pode ser indicado à pacientes com reconhecida má qualidade das fâscias autólogas, nas idosas ou portadoras de outras condições que, reconhecidamente, possam alterar a resistência do colágeno¹⁴.

As contraindicações ao emprego de materiais artificiais para suporte suburetral incluem antecedentes de reações alérgicas ao material proposto, além de outras restrições relativas, como o uso simultâneo desses materiais em cirurgias que envolvam uretroplastias (fístula uretrovaginal, divertículo uretral) e nas pacientes com antecedentes de irradiação pélvica ou com vaginite atrófica acentuada¹⁴.

Do ponto de vista ideal, o material artificial a ser empregado como *sling* deve induzir resposta inflamatória o mais leve possível, não ser carcinogênico, permitir esterilização adequada e ser de fácil fabricação.¹⁴ Alguns dos principais materiais artificiais que já foram propostos para emprego na forma de *slings* suburetrais encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. *Slings* artificiais. É classificação segundo os principais materiais

Orgânicos	Sintéticos
• Preparados de colágeno	• <i>Nylon</i>
• Pericárdio bovino	• Mersilene
• Submucosa intestinal suína	• PTFE (Teflon, Gore-tex)
• Duramáter	• Silicone (<i>Silastic</i>)
• Derme suína	• Co-polímeros (Poligalactina)
• Fâscia cadavérica	• Polipropileno (Marlex, Prolene)

1.3.1. Materiais orgânicos

Vários materiais heterólogos, como os preparados de colágeno, pericárdio bovino, submucosa intestinal suína, derme suína, e duramáter foram propostos.

A esse respeito, na Unicamp, foi desenvolvido um *sling* de colágeno bovino altamente purificado. Os resultados iniciais com o emprego desse material em 20 pacientes evidenciaram 87% de cura ou melhora significativa entre três e 15 meses de seguimento¹⁵. Entretanto, a elevada taxa de recorrência, em médio prazo, motivou o estudo das características da integração desse enxerto e sua comparação com a fáschia autóloga, por meio de um estudo experimental em cães.¹⁶ Nesse experimento, verificou-se absorção completa do *sling* e substituição por fibrose após 90 dias do implante.

O pericárdio bovino foi utilizado em 13 pacientes com incontinência urinária de esforço. Verificou-se infecção vaginal em 38,5% dos implantes, disfunção miccional em 23,7% e recidiva precoce da incontinência urinária em 30,8% dos casos. A má evolução foi atribuída, particularmente, aos efeitos citotóxicos locais do glutaraldeído empregado para diminuir a antigenicidade do pericárdio.¹⁷

Palma et al.¹⁸ apresentaram 93,3% de cura ou melhora em grupo de 30 portadoras de incontinência urinária de esforço, nas quais foi utilizado o *sling* de matriz colágena, obtida da submucosa intestinal suína (SIS). O tempo de seguimento era de 13 meses, à época da publicação. O seguimento tardio desse mesmo grupo revelou que os resultados permaneceram inalterados em 76% das pacientes, após quatro anos do procedimento.¹⁹

A duramáter homóloga liofilizada,²⁰ derme suína,²¹ assim como a fáschia lata cadavérica²² já foram propostas para a confecção de *slings*. Não há estudos sobre seguimento tardio do *sling* de duramáter. Simsimanet al.²³ realizaram estudo retrospectivo, no qual foram comparados os resultados do *slings* de fáschia autóloga, de fáschia lata cadavérica e de derme suína. Verificou-se índice de falha de 13%, 36% e 46%, respectivamente. Assim, concluiu-se que a fáschia cadavérica e a derme suína não determinaram a formação de

suporte suburetral duradouro. Entretanto, não houve comparação dos índices de complicações, como hematoma, obstrução e disfunções miccionais, assim como dor e tempo de convalescença.

1.3.2. As telas sintéticas

As características favoráveis inerentes aos biomateriais sintéticos, comparados aos materiais biológicos, conferem-lhes vantagens adicionais para a reconstrução do assoalho pélvico. Os estudos têm claramente demonstrado maior durabilidade e maior eficácia em longo prazo dos materiais sintéticos, em relação aos enxertos de fásia.^{9,24} Dentre as vantagens dos materiais sintéticos, têm sido referidas: maior durabilidade, maior disponibilidade, capacidade de manutenção da força de tensão, baixa transmissão potencial de biopatógenos, biocompatibilidade, ausência de efeito carcinogênico, estímulo mínimo da reação inflamatória tecidual, porosidade e permeabilidade controladas, possibilidade de melhora da qualidade de vida e resistência à infecção.^{25,26,27}

O desenvolvimento de novas técnicas com o uso de material sintético tem sido responsável pelo renovado interesse no uso do *sling* para tratamento da incontinência urinária do que derivou o esforço da indústria de materiais para a manufatura de *slings* de diversos materiais e com características técnicas também diferentes.²⁴

A busca por materiais inorgânicos para a confecção de um *sling* se iniciou com Bracht (1951)¹ que propôs o uso de fios de *nylon*. Em seguida, Anselmino (1952)² e Zoedler (1961)³ propuseram técnicas semelhantes. Estes *slings* causaram obstrução e erosão uretral em decorrência da distribuição da pressão numa área muito reduzida, e foram abandonados.²⁸

¹Bracht *apud* Ghonein GM, Shaaban A. Sub-urethral *slings* for treatment of stress urinary incontinence. IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1994; 5:228-39, 1994.

²Anselmino *apud* Ghonein GM, Shaaban A. Sub-urethral *slings* for treatment of stress urinary incontinence. IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1994; 5:228-39, 1994.

³Zoedler *apud* Ghonein GM, Shaaban A. Sub-urethral *slings* for treatment of stress urinary incontinence. IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1994; 5:228-39, 1994.

Em 1968, Moir foi o primeiro a adaptar o uso de uma faixa de mersilene como *sling* suburetral, descrevendo índice de 83% de cura ou melhora significativa, porém sem menções às complicações. O uso de *slings* de mersilene voltou a ser relatado em várias casuísticas na década de 90, com índices de cura entre 73% e 96%, porém com elevado índice de complicações, o que motivou a interrupção do seu uso.²⁹

O emprego do politetrafluoroetileno expandido (Gore-tex) para confecção de *slings* foi descrito por Horbach³⁰ (1988). Embora os resultados quanto à continência tenham se assemelhado aos obtidos com outros *slings*, há relatos da necessidade de retirada do implante em 10,4% a 22% das pacientes devido às complicações locais, como cicatrização deficiente, extrusão vaginal ou dor.^{31,32}

Stanton et al.³³ foi o primeiro a propor o emprego de um preparado de silicone isolado para a confecção de *slings*. Os resultados tardios do emprego desses *slings* em 88 pacientes foram 10,2% de erosão uretral ou vesical, que determinaram a retirada da prótese. Korda et al.³⁵ relataram índice de revisão do *sling* de 24% e retirada em 4,5% das pacientes, apesar de 80,6% de cura subjetiva da incontinência. Palma et al.³⁶ apresentaram casuística de 11 pacientes nas quais foi implantado um *sling* de silicone. Três pacientes apresentaram extrusão do *sling* (27%) e 46% apresentaram disfunção miccional, que motivaram a interrupção do estudo.

Na década de 90, começaram a usar telas produzidas com copolímeros sintéticos absorvíveis, como a poligalactina, para a confecção de *slings* suburetrais e para reconstrução do assoalho pélvico. Apesar da baixa morbidade apresentada nas publicações, não há estudos posteriores com esses materiais.^{37,38}

1.3.3. Os *slings* de polipropileno

Morgan³⁹(1970) descreveu o emprego da tela de Marlex®, confeccionada originalmente para herniorrafias, na forma de *sling* suburetral. A tela de Marlex® é confeccionada com polipropileno monofilamentar de gramatura elevada, o que confere elevada resistência à tensão, a qual é desejável nas herniorrafias. Entretanto, àquela época, a aplicação de tensão sobre o colo vesical, onde a faixa era habitualmente disposta, e as características físicas desse material, determinaram elevado índice de disfunções vesicais e de erosão uretral.^{40,41,42} Palma et al.⁴³ (1992) apresentaram resultados semelhantes com o uso da tela de Marlex®, cujo emprego foi abandonado.

A partir da classificação das telas em três tipos, proposta por Amid,⁴⁴ 1997, quando classificou as telas em três tipos, nos possibilitando a conclusão de qual seria a melhor tela de polipropileno para uso vaginal. As telas do tipo I (um) são constituídas de polímeros tecidos de forma monofilamentar, com poros maiores que 75 μ m, as quais promoveriam microambiente facilitador da migração de macrófagos, leucócitos e fibroblastos. Dessa forma, nessas telas, o risco teórico de reação inflamatória persistente seria menor, resultando em melhor integração aos tecidos circunvizinhos.^{45,46}

As telas do tipo II (dois) são confeccionadas com polipropileno monofilamentar com poros menores que 75 μ m. Abdel-Fattah et al.⁴⁷ num estudo prospectivo em 316 pacientes, compararam um *sling* confeccionado com filamentos de polipropileno prensados e com poros de 50 μ m, denominado Obtape®⁴, com outro, composto de tela do tipo I. Verificaram que o índice de complicações diretamente relacionadas ao Obtape®⁹ foi significativamente maior que o observado com a outra prótese (7,29% versus 1,78%, respectivamente). Num estudo experimental, Slack et al.⁴⁸ verificou a formação de uma cápsula fibrótica bem definida com, apenas, pequenos septos de tecido fibroso no interior dessa tela, cuja comercialização foi suspensa recentemente.

⁴ Mentor-Porges, Le Plessis Robinson, França

Telas do tipo III (três) têm componentes multifilamentares nos quais o interstício entre os filamentos pode ser menor que 10 μ m. Estes espaços extremamente pequenos poderiam conferir proteção e permitir o crescimento local de bactérias invasoras, cujo tamanho é de cerca de 1 μ m, além de dificultar o acesso de células do sistema imune. Essa teoria foi empregada para justificar os efeitos adversos verificados com as telas multifilamentares e descritos por vários autores.^{49,50,51,52,53} De forma contrária, Birch, Fynes⁵⁴ observaram que leucócitos e macrófagos, cujo tamanho varia entre 9 e 20 μ m, teriam condições de permear poros menores que 75 μ m. Assim, postula-se, atualmente, que a principal vantagem potencial das telas com poros maiores seria a facilidade de desenvolvimento de tecido fibroso do hospedeiro no seu interior.

Os *slings* de polipropileno disponibilizados pela indústria, para aplicação na uretra média, tornaram-se cada vez mais empregados no tratamento da incontinência urinária de esforço. Dados europeus de 2003 mostraram que as chamadas faixas ~~sem~~ com tensão eram empregadas em 84,9% dos procedimentos de *sling* em portadoras de incontinência urinária de esforço, realizados no continente naquela época (*European Markets for Urological Devices, 2004*)⁵.

O primeiro *sling* minimamente invasivo de polipropileno monofilamentar proposto para uso clínico foi descrito por Ulmsten et al.¹⁰ e originou o *Tension-free Vaginal Tape* (TVT). O mesmo autor publicou o primeiro estudo prospectivo com esse material, no qual descreveu o emprego ambulatorial do TVT, sob anestesia local, em 131 pacientes com incontinência urinária de esforço. Após seguimento de 12 meses, os autores descreveram índice de cura de 91%, sem complicações significativas.⁵⁵

Seguiram-se inúmeras publicações sobre o TVT e outros *slings* de polipropileno monofilamentar similares. Kuuva, Nilsson⁵⁶ estudaram prospectivamente 129 pacientes submetidas a *sling* com TVT. Após seguimento mínimo de seis anos, observaram que 81% das pacientes

⁵ European Markets for Urological Devices *apud* Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral *sling* materials. *Int J Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005; 6: 56-9.

encontravam-se continentes, segundo critério objetivo (teste com absorventes). Houve exposição vaginal da tela em 3,1% das pacientes, e em 1,6% foi necessária ressecção cirúrgica. Não foram observados outros efeitos adversos importantes.

Outros estudos, envolvendo telas de polipropileno monofilamentar, apresentaram o índice de extrusão vaginal e de erosão uretral, que correspondem às complicações relacionadas diretamente com as características físico-químicas da tela (Tabela 2).

Tabela 2. Slings de polipropileno monofilamentar – Erosão e extrusão

Autor	Sling	Pacientes	Erosão (%)	Extrusão (%)
Karranet al. ⁵⁷ (2003)	TVT	350	0,3	0,6
Rodriguez e Raz ⁵⁸ (2003)	Artesanal	301	0	0,3
Kobashi e Govier ⁵⁹ (2003)	Artesanal	90	0	4,4
Levinet al. ⁶⁰ (2004)	TVT	313	0	1,3
Tsivianet al. ⁶¹ (2004)	TVT	200	0,5	2,5
Palma ⁶² (2005b)	Safyre VS	126	0	3,1
Silveira et al. ⁶³ (2007)	Artesanal	47	0	4,2

A partir da literatura disponível sobre biomateriais, parece claro que a tela de polipropileno é o material de primeira escolha para o implante suburetral, por: oferecer o melhor suporte para a fibroplasia assim como para a infiltração de macrófagos, reduzindo a frequência de infecções no sítio cirúrgico e erosão; permitir alta porosidade, sem prejuízo da força de tensão, da elasticidade e da durabilidade.²⁶

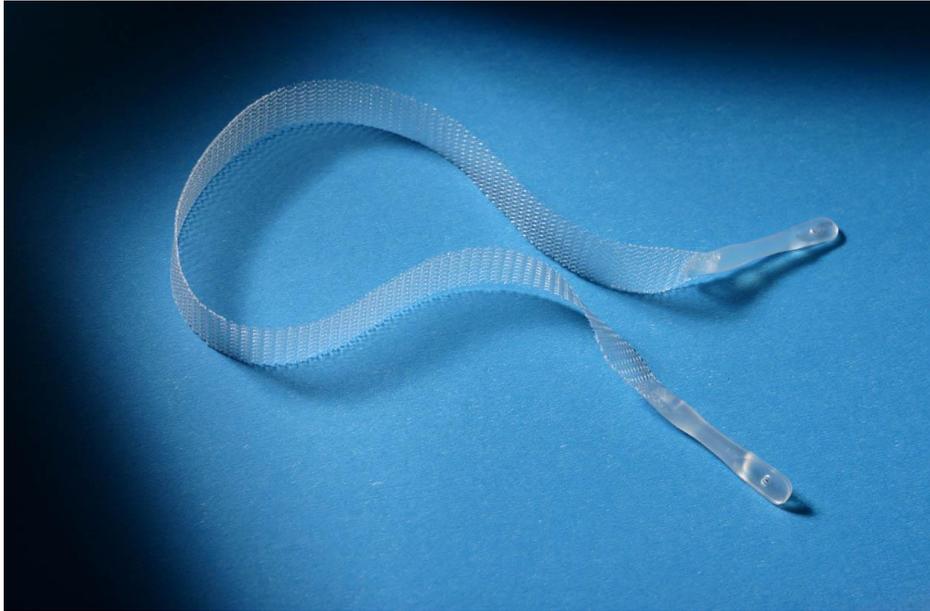


Figura 1. Tela de polipropileno utilizada em cirurgia de Sling

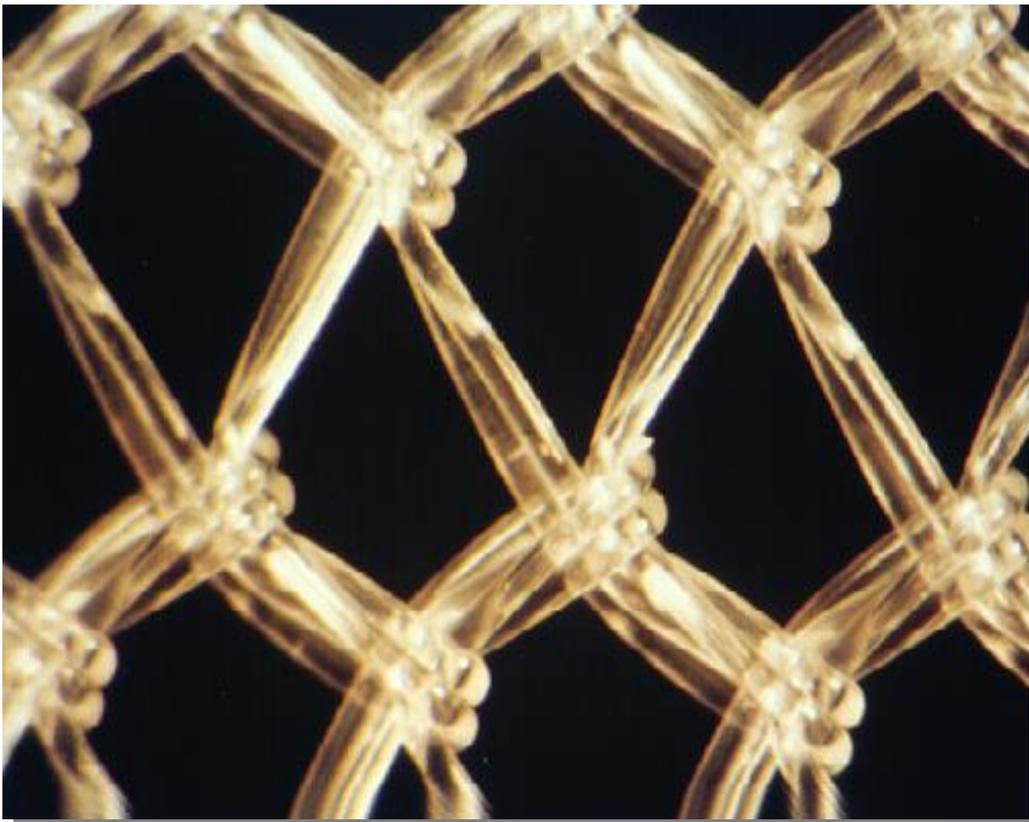


Figura 2. Estrutura microscópica da tela de polipropileno monofilamentar e macroporosa

Contudo as complicações associadas a esse material estão presentes no cotidiano do ginecologista e urologista, assim como nos artigos científicos relacionados à incontinência urinária e correção cirúrgica dessa

patologia. Devido a isso, sempre surgem novos questionamentos a respeito de novos materiais, que possam oferecer menos índice de complicação, com a mesma eficácia.

1.4. Biopolímero da cana-de-açúcar

O biopolímero da cana-de-açúcar, um polissacarídeo extracelular produzido por síntese da bactéria *Zoogloea* sp., a partir do melaço de cana-de-açúcar foi desenvolvido na Estação Experimental de cana-de-açúcar de Carpina da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A estrutura química do biopolímero puro foi determinada, e está constituída por diferentes monossacarídeos: glicose 87,57%, xilose 8,58%, ribose 1,68%, ácido glicurônico 0,83%, manose 0,82%, arabinose 0,37%, galactose 0,13%, ramnose 0,01% e fucose 0,01%.⁶⁴

As membranas formadas a partir desse biopolímero foram processadas para aplicação como prótese cirúrgica no Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Foram avaliadas através de testes laboratoriais e apresentaram flexibilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade e resistência à ruptura.⁶⁵ Essas membranas delgadas podem ser usadas como condutor celular, caracterizando-se como material adequado para ser usado em órtese no tratamento da incontinência urinária.⁶⁴



Figura 3. Ilustração da interação entre a bactéria *Zoogloea* sp., o melaço da cana-de-açúcar e a formação da membrana de biopolímero

Castro et al.⁶⁵ procedeu estudo de citotoxicidade do biopolímero da cana-de-açúcar com a exposição de macrófagos alveolares de ratos a esse material. A resposta inflamatória e a viabilidade celular foram semelhantes as do controle utilizados no estudo, telas de polipropileno e politetrafluoretileno (PTFE). Sendo assim, o biopolímero apresentou uma citotoxicidade baixa, credenciando-o para uso em estudos experimentais com segurança.

Lima et al.⁶⁶ comparou a resposta inflamatória intra-abdominal de implantes da membrana de biopolímero da cana-de-açúcar com a tela de polipropileno utilizando critérios macroscópicos como aderências entre órgãos, coleções, exsudato livre e intensidade de sinais flogísticos. O autor concluiu que os materiais se equiparam quanto aos critérios analisados podendo ser o biopolímero uma alternativa ao polipropileno.

1.4.1. Aplicabilidades clínicas e experimentais do biopolímero da cana-de-açúcar

Essa membrana tem sido utilizada em diversas áreas da cirurgia experimental: na cicatrização de feridas cutâneas, na reconstrução ureteral, como substituto da membrana timpânica.

No início da década passada, a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar foi utilizada, no Hospital Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em animais vítimas de atropelamentos, ferimentos com cicatrização por segunda intenção, queimaduras e após retirada de tumores neoplásicos. O autor observou que o biopolímero da cana-de-açúcar determinou controle da infecção pelo seu efeito bacteriostático ou bactericida e promoveu crescimento acelerado do tecido de granulação. Podendo ser usado na cicatrização de feridas cutâneas, levando em consideração o comportamento terapêutico, baixo custo econômico e simplicidade de aplicação.⁶⁷

Em 2006, no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, o grupo de pesquisa do biopolímero promoveu um modelo de perfuração timpânica em 10 *Chinchillas laniger*, tratando-as após 4 semanas. Em uma orelha foi aplicado enxerto de membrana de biopolímero da cana-de-açúcar e na orelha contralateral um enxerto de fáschia autóloga, com avaliação semanal do estado de cicatrização. Após há quarta semana, foi identificado que as perfurações estavam fechadas em nove orelhas tratadas com biopolímero e em oito orelhas do grupo controle. A conclusão do autor é que a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar não foi incorporada ao remanescente da membrana timpânica, porém serviu como um condutor para a formação de elementos responsáveis pela cicatrização.⁶⁸

Mayer et al.⁶⁹ demonstrou a reação histológica para o estudo anteriormente citado. Com desenho metodológico semelhante ao estudo anterior, foram utilizados 24 ratos, sendo realizada a análise histológica do implante da membrana de biopolímero da cana-de-açúcar. Observou-se reação inflamatória com presença de exsudato na maioria dos casos do grupo

experimental, com diferença estatisticamente significativa com o grupo da fáschia autóloga. Contudo a intensidade da inflamação diminuiu com o tempo e no final do experimento não apresentava exsudato e apresentava pouca fibrose, tendo a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar uma mais lenta absorção do que a fáschia autóloga.

Em 2012, o biopolímero da cana-de-açúcar foi utilizado, em forma de gel, aplicando-o em olhos eviscerados de coelhos em um modelo experimental. O autor analisou histologicamente a ação do gel intraocular após 7, 30, 60, 120 e 240 dias do procedimento, observando não toxicidade e boa compatibilidade; presença de neovascularização inflamatória crônica e resposta fibroblástica, gerando deposição de colágeno em todos os animais após 30 dias; e, ausência de resposta celular, novos vasos e fibras colágenas no centro do implante semelhante ao que acontece com outros materiais utilizados na evisceração ocular como o polietileno.⁷⁰

Falcão et al.⁷¹ comparou o politetrafluoretileno com a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar para correção de defeitos da parede abdominal em ratos. Foi utilizada uma membrana de biopolímero não porosa, a qual não permitiu a integração ao tecido do hospedeiro, promovendo um envoltório (capsulação). Esse envoltório apresentou infiltrado inflamatório agudo (neutrófilos), uma fase regenerativa (fibroblastos e colágeno) e presença de células gigantes em um período de 28 dias. Sendo assim, observamos a necessidade da presença de poros na membrana de biopolímero da cana-de-açúcar.

O biopolímero da cana-de-açúcar também foi utilizado como fio de sutura em comparação com fio de poligalactina (Vycril®). Neves, Aguiar⁷² realizaram uma incisão de 5 cm no abdome de 30 ratos e posteriormente suturaram com pontos separados, sendo realizada análise da tensão de ruptura e densidade de fibras colágenas da cicatriz. Não houve diferença significativa entre os dois materiais utilizados quanto aos critérios adotados.

Desde 2007, a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar vem sendo utilizada na arterioplastia femoral de cães. Oito cães foram submetidos a

arterioplastia femoral bilateral com prótese de politetrafluoretileno de uma lado e membrana de biopolímero da cana-de-açúcar do outro com análise da fluxometria Doppler, arteriografia e histologia. No estudo não foi observado trombose, aneurismas, infecção ou ruptura das próteses. A fluxometria e o diâmetro das artérias entre os grupos do estudo não apresentou diferença estatisticamente significativa. Quanto à análise histológica, a resposta inflamatória foi semelhante entre os grupos, apresentando invasão de fibroblastos no grupo do politetrafluoretileno. O autor concluiu que a membrana de biopolímero da cana-de-açúcar pode ser usada na arterioplastia femoral de cães.⁷³

Medeiros Júnior et al.⁷⁴ utilizou o biopolímero da cana-de-açúcar, em forma de gel, como carreador de proteínas formadoras de osso em reparos de defeitos na calota craniana de ratos. Foi observada, pelo autor, uma alta taxa de formação óssea, nos grupos que tinham o biopolímero, através da radiolucência de exames tomográficos. O biopolímero mostrou ser um excelente carreador da proteína formadora de osso, provavelmente por facilitar a liberação controlada dessas proteínas no processo de reparação óssea.

No entanto, quando o biopolímero foi usado na correção de defeitos nos côndilos femorais de coelhos bilateralmente, preenchendo um dos lados com gel de biopolímero da cana-de-açúcar não foi observado diferenças significantes entre o grupo de estudo e o grupo controle. A dimensão das áreas cicatrizadas tratadas com gel do biopolímero foi semelhante às áreas do grupo controle, que cicatrizaram naturalmente.⁷⁵

Na urologia o biopolímero da cana-de-açúcar vem sendo usado amplamente tanto em pesquisas experimentais, quanto na prática clínica. Carvalho Júnior et al.⁷⁶ avaliou a deposição de fibras colágenas e o potencial litogênico de enxertos de biopolímero da cana-de-açúcar. Foram colocados enxertos de biopolímero no interior da bexiga de 22 ratos em comparação com enxertos de poligalactina na bexiga de 20 ratos, demonstrando um maior potencial litogênico por parte da poligalactina e uma menor taxa de absorção do biopolímero. O autor demonstrou também que a reação inflamatória inicial foi maior no grupo do biopolímero, porém se tornando igual após 8 semanas do implante, sendo a deposição de fibrose equivalentes nos dois grupos.

Na prática urológica, desenvolveu-se um estudo randomizado com 60 pacientes portadores de hipospádia, submetidos à correção cirúrgica e posterior aplicação de curativo do biopolímero da cana-de-açúcar ou curativo feito de poliuretano (Tegaderm®). O grupo de pacientes que usaram o biopolímero se mostrou satisfeito com o curativo, não foi detectada nenhuma reação adversa na superfície peniana e uma cicatrização equivalente a apresentada no grupo do Tegaderm®.⁷⁷

1.5. Cicatrização de feridas

Após qualquer lesão tecidual, o processo de cicatrização é importante para que se recupere a integridade corporal. A cicatrização constitui-se em uma sequência complexa de eventos celulares e bioquímicos ordenados, com o objetivo final de restaurar os tecidos. A participação das células imunológicas no processo de cicatrização é conhecida com a migração de macrófagos, linfócitos e neutrófilos para o interior da ferida. Está claro que essas células possuem um papel no processo inflamatório, defesa imunológica da área lesada e secreção de moléculas sinalizadoras como citocinas, linfocinas e fatores de crescimento.⁷⁸

Podemos dividir a cicatrização, didaticamente, em três fases: hemostasia e inflamação, proliferação ou fibroplasia e maturação ou remodelagem. Após o ferimento inicia-se extravazamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e plaquetas. A coagulação sanguínea gera um tampão rico em fibrina que protege contra microrganismos, garante a hemostasia e serve como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados em fases seguintes do processo de reparação.⁷⁹ Nessa fase, também ocorre liberação de fatores de crescimento, proteínas adesivas da matriz extracelular provisória e fatores quimiotáticos que auxiliam o recrutamento das células inflamatórias.⁸⁰

Os neutrófilos e monócitos são as células inflamatórias inicialmente recrutadas. Desempenham a função de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, além de prepararem a ferida para a fase

proliferativa.⁷⁸ Os monócitos ativados pelos fatores de crescimento se transformam em macrófagos, sendo essas as principais células envolvidas no processo de reparo tecidual. Os macrófagos removem os componentes do tecido conjuntivo, produzem fatores de crescimento e recrutam outras células inflamatórias tendo como efeito final vasodilatação e estímulo para a formação do tecido de granulação.⁸¹

A fase proliferativa é a fase responsável pelo fechamento da ferida propriamente dito. Nessa fase vamos observar a reepitelização, movimentos de células epiteliais no intuito de fechar a lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o tecido de granulação. A formação de novos vasos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, correspondendo às células dos vasos sanguíneos a cerca de 60% do tecido de reparo.⁸²

Ainda na fase proliferativa temos uma estrutura de extrema importância que é a matriz extracelular. Essa matriz serve de plataforma que dá suporte a migração celular endotelial e desenvolvimento de novos vasos, além de armazenar fatores de crescimento.^{80,82}

A última fase é conhecida como remodelagem. Nessa fase do processo de cicatrização ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Acontece uma maturação da matriz extracelular com deposição de colágeno, ausência de vasos, fibroblastos e células inflamatórias. O colágeno torna-se a proteína predominante da cicatriz e a força de tensão dos tecidos depende das proporções variáveis de colágeno tipo I e tipo III. Por exemplo, colágeno tipo I tem fibras grossas e alta força de tensão, enquanto o colágeno tipo III é composto por fibras finas, isoladas, imaturas e de baixa força de tensão (presente no período inicial da cicatrização).⁸³

A derme intacta apresenta uma composição de 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno tipo III. O exame bioquímico mostra que o colágeno produzido no tecido de granulação é diferente do colágeno presente na pele íntegra; e que, mesmo após período de remodelação, as fibras colágenas do tecido cicatricial, não adquirem a mesma organização do colágeno original.⁸⁰

No tocante a fisiopatologia da Incontinência Urinária, a fase proliferativa é a mais importante devido à presença de macrófagos, fibroblastos e produção de fibras colágenas; estruturas celulares envolvidas diretamente na cura dessa patologia.⁸³



2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a resposta histológica do implante do biopolímero da cana de açúcar no subcutâneo de ratos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Comparar as características da reação inflamatória induzida por telas de polipropileno monofilamentar e biopolímero da cana-de-açúcar implantadas no tecido subcutâneo de ratos adultos.

2.2.2. Comparar densidade volumétrica de fibras colágenas em torno de telas de polipropileno monofilamentar e biopolímero da cana-de-açúcar implantadas no tecido subcutâneo de ratos adultos.



3. Materiais e Métodos

3.1. Local de Estudo

O estudo foi realizado no Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco. O Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco também foi utilizado para alojamento dos sujeitos da pesquisa.

3.2. Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, controlado, tipo ensaio clínico.

3.3. População do Estudo

A amostra foi composta por 30 ratos machos da raça Wistar, com peso de aproximadamente 300 gramas, e adultos jovens. Inicialmente, os ratos foram mantidos no biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental, em gaiolas apropriadas, individuais e conjuntas, permitindo a socialização dos animais ocupantes das diversas estantes, em ambiente climatizado, com temperatura mantida em torno de 23° C, e exaustão forçada. Foram alimentados com ração apropriada, e mantidos em ambiente livre de ruídos e estresse, com fotoperíodo de 12 horas, controlado por temporizador, respeitando-se os ciclos diurnos e noturnos, conforme os princípios que regem o Código de Ética Experimental e as leis de proteção aos animais de acordo com as normas vigentes no Brasil, e os princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4. Seleção

Critérios de Inclusão

Submetidos ao período de quarentena

Sem alterações clínicas

Ratos com bom estado nutricional

Critério de Exclusão

Ratos com afecções dermatológicas no local da abordagem cirúrgica

Ratos com cirurgia prévia

Ratos com DeficitPonderal

3.5. Procedimentos Técnicos

Os animais permaneceram em quarentena inicialmente, durante a qual receberam os cuidados necessários no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco, a fim de se excluir doenças próprias desta espécie. Em seguida, foram liberados para a realização dos procedimentos experimentais a que se propõe o referido projeto. Sendo alojados em gaiolas sobre condições semelhantes de alimentação, temperatura, umidade e luz.

O abdome dos ratos foi dividido em dois hemicírculos direito e esquerdo por uma linha imaginária em sentido crânio caudal. Foi realizada uma incisão de 2,0 cm, verticalmente, na região central de cada hemicírculo. Dissecção do tecido subcutâneo até a exposição da fáscia muscular subjacente e, posteriormente, colocação dos materiais estudados.

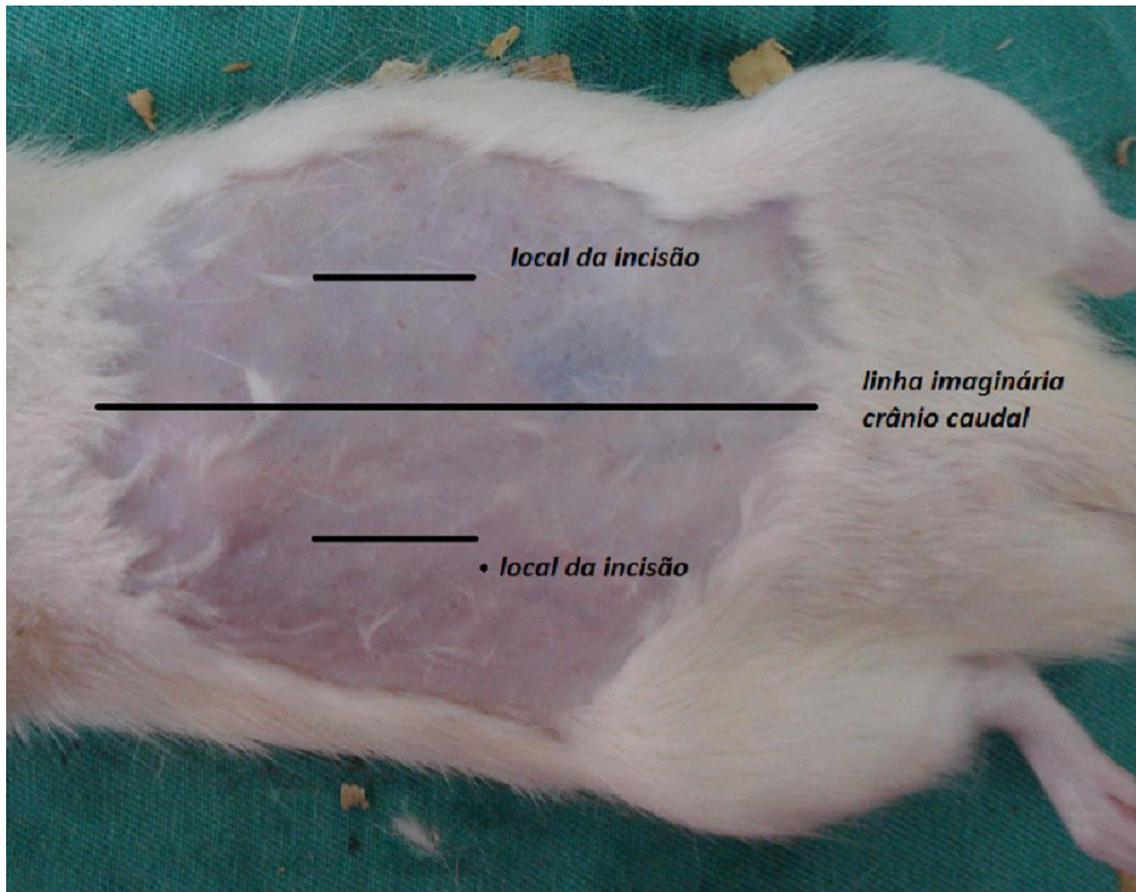


Figura 4. Esquema do abdome dos ratos adultos com linha imaginária dividindo-o em dois hemicírculos direito e esquerdo. Notar também a indicação das incisões cirúrgicas em cada hemicírculo.

Os hemicírculos direito e esquerdo, após incisão e dissecção receberam os seguintes materiais:

Hemicírculo direito . colocação da tela de polipropileno monofilamentar tipo I, com macroporos, de 15x10mm.

Hemicírculo esquerdo . colocação da tela de biopolímero da cana-de-açúcar de 15x10mm, com macroporos.

Os implantes utilizados foram esterilizados individualmente em óxido de etileno, seguindo as regras da Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária (APEVISA).

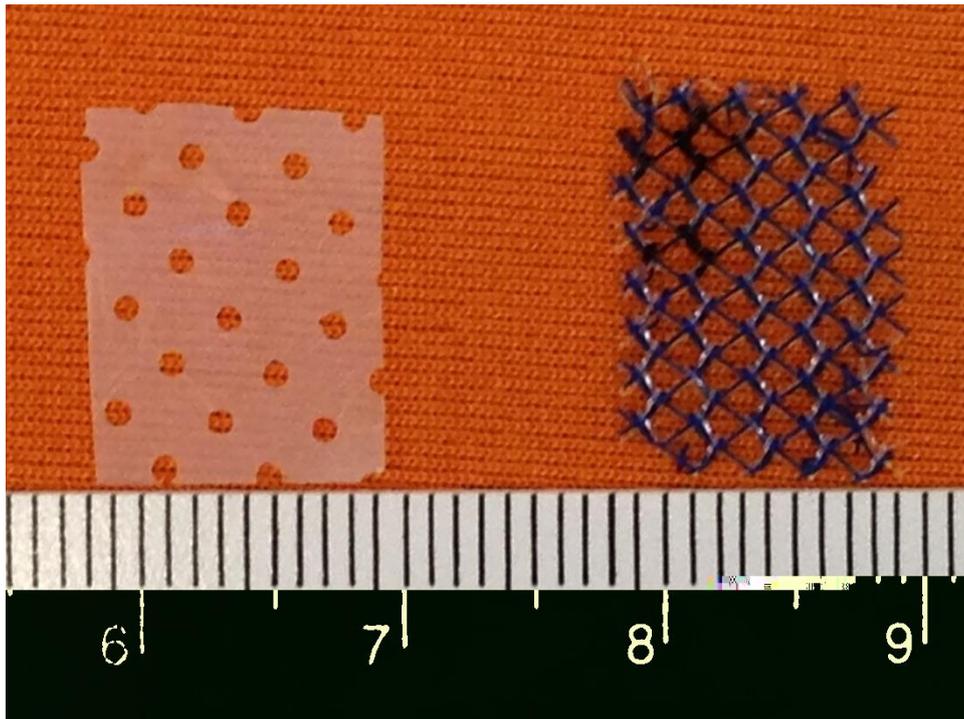
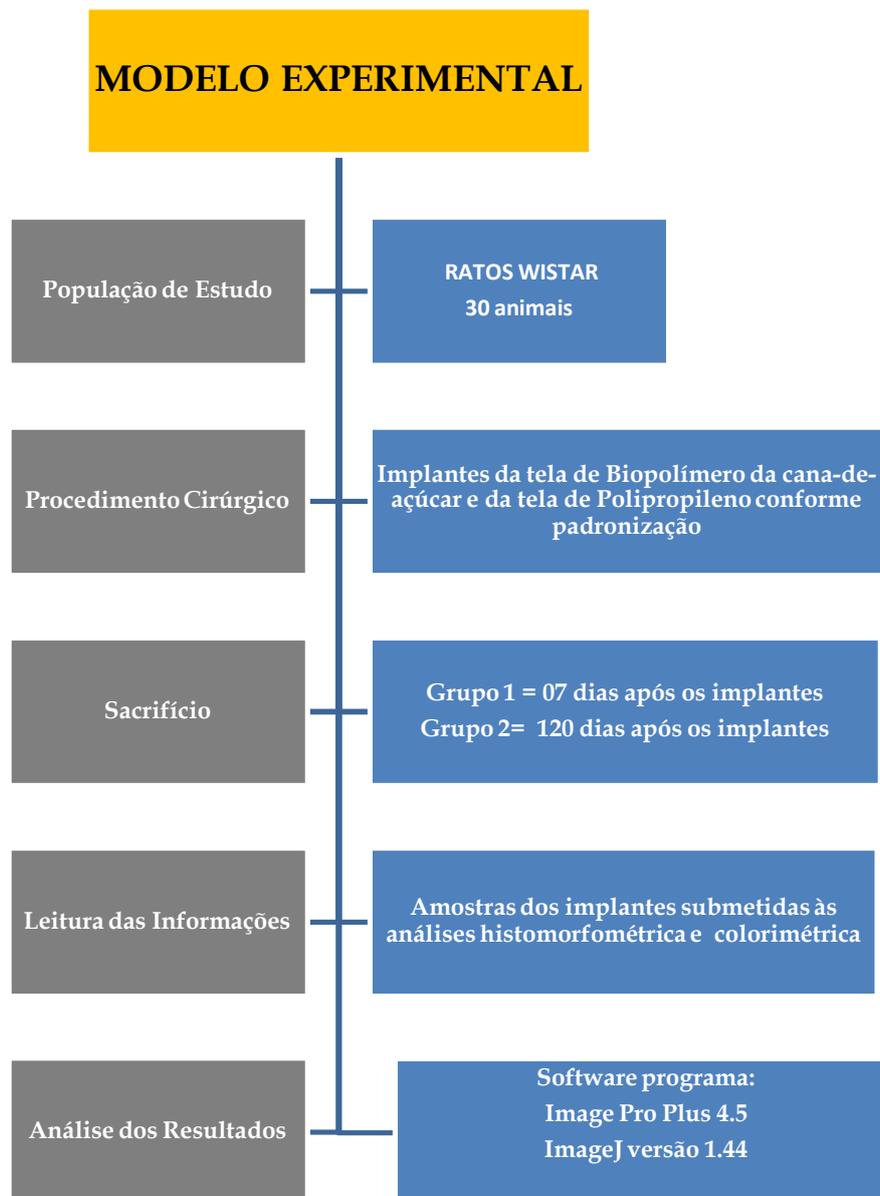


Figura 5. Implantes utilizados no experimento. Telas biopolímero à esquerda e a tela de polipropileno à direita

Os animais foram divididos em dois grupos contendo 15 animais cada grupo. Sendo estes animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico diferindo apenas, no número de dias em que foram sacrificados após o procedimento. O primeiro grupo (15 animais) recebeu a denominação de %Grupo 7+; e o segundo grupo recebeu a denominação de %Grupo 120+; lembrando quantos dias após o experimento foram sacrificados, respectivamente, sete e 120 dias após o implante.

3.5.1 Fluxograma de coleta de dados



3.5.2. Padronização dos procedimentos cirúrgicos

- Jejum pré-operatório com restrição alimentar de sólidos por 4 horas antes da cirurgia.
- Anestesia realizada com associação de cetamina com xilasina, proporção de 6mg (0,3ml) de cada substância, administrado por via intramuscular.

- c) Imobilização dos ratos em decúbito dorsal horizontal, seguida por tricotomia e antissepsia do abdome com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo (10%) e colocação de um campo estéril delimitando a área cirúrgica.
- d) Por meio de técnica asséptica, realização de incisões verticais de 2,0 cm, em cada quadrante, seguindo-se de divulsão do subcutâneo, obtendo-se, assim, a exposição da fáscia da musculatura abdominal. Procedendo-se o que foi preconizado anteriormente para cada hemicírculo.
- e) Os fragmentos de polipropileno e biopolímero foram implantados livres de tensão e sem fixação.
- f) Síntese da pele com fio de sutura absorvível *CatGut*® 4-0 com pontos separados.
- g) Espera até o despertar do animal e transferência para a gaiola de recuperação pós-anestésica. A analgesia pós-operatória foi realizada com solução de dipirona intramuscular, na dose de 15 mg/kg por dose.

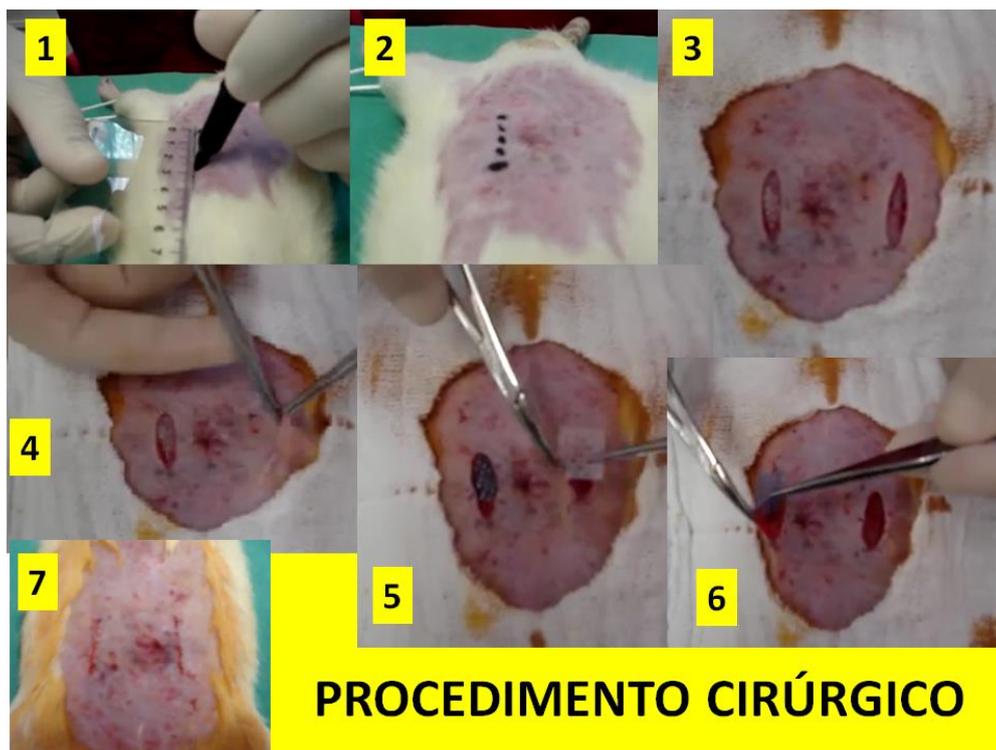


Figura 6. Esquema passo a passo do procedimento cirúrgico de implante das telas de biopolímero e polipropileno. (1) Medição do tamanho da incisão 2cm. (2) Local da incisão demarcado em um dos hemicírculos. (3) Incisão cirúrgica realizada bilateralmente com mesmas dimensões. (4) Dissecção do tecido celular subcutâneo. (5) Colocação da membrana de biopolímero (6) Colocação da membrana de polipropileno. (7) Aspecto final após síntese da pele com fio absorvível.

3.5.3. Sacrifício dos animais, coleta e preparo das amostras teciduais

Os ratos foram sacrificados com dose letal de anestésico, seguindo-se da retirada, em bloco, da parede abdominal, de forma asséptica, e de maneira a preservar as relações anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio parietal. Neste primeiro momento, foi realizada a análise macroscópica do tecido, procurando-se evidenciar sinais de eritema, necrose, tumefação e coleções. (Figura 7)



Figura 7. Retirada da parede abdominal após sacrifício do animal. Este método permitiu a retirada uniforme dos cortes verticais.

Em seguida, as amostras de tecido tiveram suas extremidades presas, com alfinetes, em placas de material rígido, de forma a impedir retrações e dobras durante a fixação e desidratação do material, o que poderia dificultar a análise anatomopatológica adequada. Sendo todo esse material identificado adequadamente. (Figura 8)

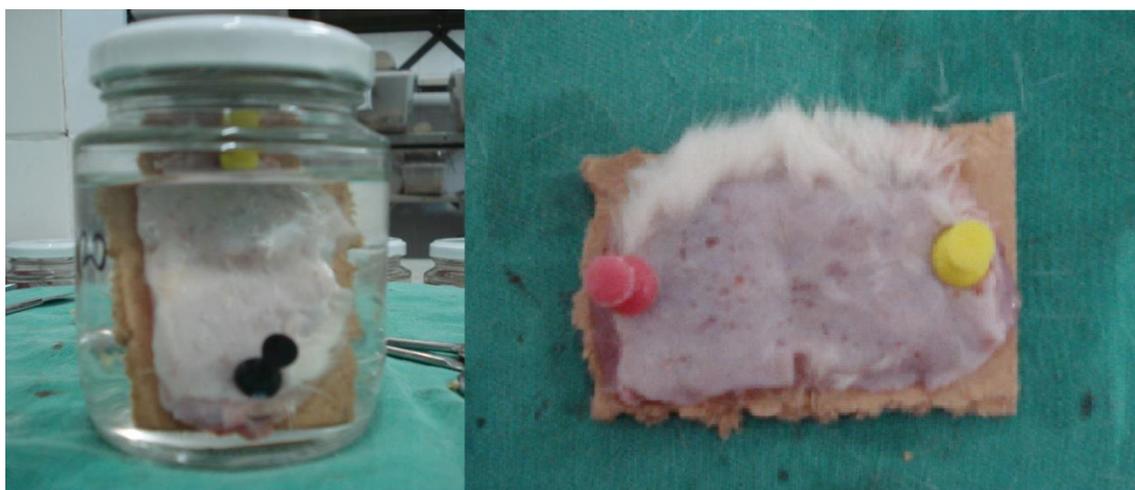


Figura 8. Foto da parede abdominal após dissecação, fixada a superfície rígida e colocada em recipiente para fixação histológica. Observar as extremidades presas por alfinetes em superfície rígida.

A fixação tecidual foi realizada depositando-se as amostras em recipiente contendo formaldeído 10%, no qual permaneceram por 24 horas. Após esse período, as peças foram transferidas para solução de álcool a 70%. A seguir, as regiões com os implantes foram identificadas e separadas, de forma a se obter retângulos de 15 mm por 10 mm, no sentido do maior eixo do implante. (Figura 9)

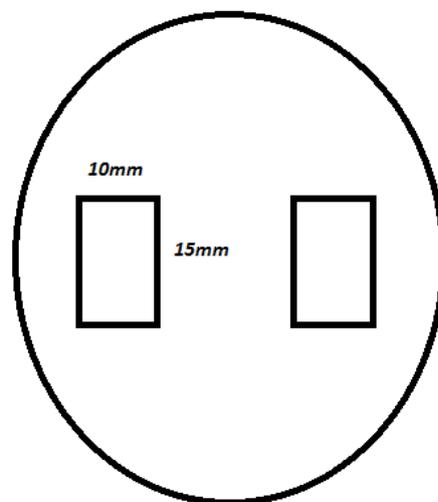


Figura 9. Ilustração demonstrando a área retangular na qual contém o material a ser analisado de cada hemicírculo.

Cada fragmento retangular foi, então, cortado em retângulos menores, de 15 mm por 2 mm. Estes fragmentos menores foram depositados em caixetas plásticas apropriadas para posterior inclusão em parafina. Cada caixeta foi identificada com um número do rato correspondente em algarismos arábicos; seguido por uma sigla correspondente ao material implantado, %BP+. polipropileno e %BP+ biopolímero; e o número do grupo ao qual pertencia (sete ou 120 dias). Dessa forma tinha-se, por exemplo, bloco de parafina do animal número 3, BP, de 7 dias.

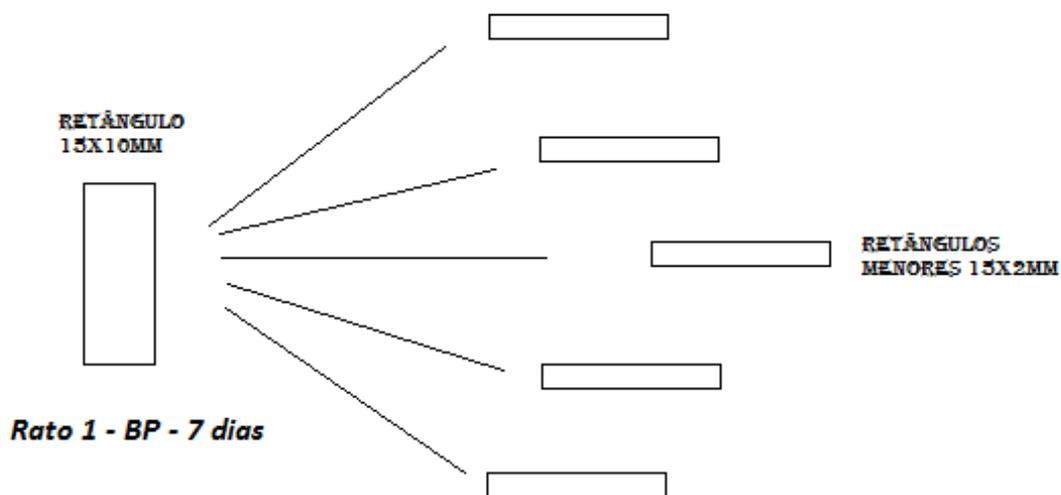


Figura 10. Demonstração de um retângulo de 15x10mm de um dos ratos sendo dividido em outros cinco retângulos menores de 15x2mm. Observar também a identificação do retângulo.

Após essa etapa, foram confeccionadas lâminas com 5 μ m de espessura, coradas com Hematoxilina-Eosina e Tricrômico de Masson. De cada área do implante foram confeccionadas cinco lâminas. Os blocos e lâminas foram confeccionados pelo Laboratório de Histologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em cooperação com o Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas - UFPE.

3.6. Análises Microscópicas

Para realizar as dimensões e quantificações do material implantado e das estruturas biológicas advindas da reação do implante com o tecido do hospedeiro utilizamos conceitos de histofotometria e morfometria. Pela observação de corte com imagens bidimensionais (corte histológico, por exemplo) é possível determinar a porcentagem de determinada estrutura.

As avaliações e quantificações dos componentes com elevado grau de precisão fornecem valores numéricos. Por exemplo, quantidade de células gigantes contidas na perifeira do implante, ou ainda, área de fibras colágenas

induzidas pelo implante. O conhecimento dos valores numéricos contribui para a aplicação de modelos matemáticos, fornecendo uma medida isenta de viés de informação; de fácil replicabilidade por outros pesquisadores; e que permite a promoção de diagnóstico, embasado em conhecimentos anatômicos e fisiopatológicos.

Todas as lâminas foram analisadas pelo mesmo pesquisador. O estudo microscópico teve por objetivo avaliar a presença de: infiltrado inflamatório agudo (neutrofílico), linfoplasmocitário, número de células gigantes, grau de fibrose e neoangiogênese. Analisamos ainda, a densidade de fibras colágenas induzidas pelos materiais implantados, biopolímero e polipropileno.

O processo inflamatório e o grau de fibrose foram classificados, quanto à sua intensidade, em: ausente, leve, moderado ou intenso. As amostras também foram analisadas quanto à presença de necrose e calcificação, sendo cada qual classificada em ausente, leve, moderada ou intensa. Essa classificação foi realizada considerando-se os critérios a seguir:

- (0) Ausente: mínima reação observada, até no máximo 5% da área do corte
- (1) Leve: a reação encontrada envolvia entre 5% e 25% do corte
- (2) Moderada: comprometimento de 25% a 70% do corte
- (3) Intensa: área do corte comprometida superior a 70%.

Na análise da neoangiogênese e número de células gigantes, utilizamos ferramentas e parâmetros advindos da estereologia. A quantificação dos vasos foi feita em imagens digitais de cortes corados por Hematoxilina Eosina (HE) e observados com aumento de 200x. Após carregar a imagem no programa ImageJ versão 1.44 (NIH, Bethesda, USA), uma região contígua do implante foi manualmente delimitada, e o número de células gigantes ou o número de novos vasos ao redor do implante, quantificado. Quando o implante ocupava todo o campo, a área da imagem era utilizada. O resultado final foi então expresso em número absoluto, ou seja, número de vasos que estavam presentes naquela área. Cinco regiões aleatórias e de tamanho semelhante foram analisadas por corte, e cinco cortes foram examinados por animal.

Para medirmos a densidade de fibras colágenas utilizamos princípios de histofotometria (medida de área). Foram usados cortes, também com 5 μm cada, corados com Tricrômio de Massom. As imagens foram capturadas pelo Image Pró Express(versão 5.0). As imagens digitalizadas foram enviadas para o programa Image Pró-plus 4.5® e as áreas de colágeno foram selecionadas por meio da distribuição de cor como parâmetro discriminante. Após a definição do intervalo de cor por meio de tentativa e erro foi selecionada a área em azul que representa a quantidade de colágeno em cada campo. Em seguida, foi realizada no próprio programa Image Pró-plus 4.5® a máscara que oferecia a área e a porcentagem de colágeno induzida pelo implante. (VER ANEXO1)

3.7. Procedimentos analíticos

3.7.1. Variáveis do estudo

Variáveis independentes

Nome da variável	Definição / categorização
Implante	Tela biopolímero da cana-de-açúcar
	Tela de Polipropileno monofilamentar

Variáveis dependentes

Nome da variável	Definição / categorização
Quantificação do colágeno	Densidade por volume médio de fibra visualizada em campo de microscopia expressa em porcentagem (%) calculada através da técnica histofotométrica.
Número de células gigantes por campo	Quantidade de células gigantes por campo de grande aumento

Número de neovasos por campo	Quantidade de neovasos por campo de grande aumento
Infiltrado Inflamatório Agudo	Caracterizado por uma maior quantidade de neutrófilo. Categorizado por ausente, leve, moderada e intensa.
Infiltrado Inflamatório Linfoplasmocitário	Caracterizado por células como macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Categorizado por ausente, leve, moderada e intensa
Grau de Fibrose	Análise da presença de fibras colágenas induzidas pelo implante. Categorizado por ausente, leve, moderada e intensa.
Necrose	Sim/Não
Calcificação	Sim/Não

3.7.2 Tamanho e expressão da amostra

Devido à escassez de estudos nessa área e devido à prática restritiva dos comitês de ética animal, no tocante, a redução do número de animais utilizados em estudos, o pesquisador realizou um estudo com a amostra composta por 30 ratos da raça Wistar, com peso de aproximadamente 300 gramas, e adultos jovens.

3.7.3. Testes estatísticos utilizados

Foram avaliadas as diferenças entre os dois implantes no mesmo animal, distribuídos em dois grupos iguais de 15 ratos, de acordo com o momento do sacrifício. Como a prática em cada semicírculo será realizada em todos os animais, consideraremos as amostras de cada material no mesmo rato como independentes.

Primeiramente, foi realizada análise exploratória dos dados, por meio da observação da frequência das variáveis, anteriormente discriminadas, para cada hemicírculo abdominal do rato, no mesmo grupo e ao longo do tempo, ou seja, nos grupos diferentes. As avaliações foram expressas em frequência absoluta.

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo também o uso de algumas medidas descritivas como mínimo, máximo, média e desvio padrão. Para testar a suposição de normalidade das variáveis envolvidas no estudo foi aplicado o teste de Shapiro Wilk. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi utilizado t-student quando observado o pressuposto de normalidade; quando não, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para as análises independentes.

No entanto, para as análises onde as variáveis foram dependentes, também foi realizado o teste de normalidade, tendo o teste t-student pareado quando observado o pressuposto e, quando não, o teste de Wilcoxon. Para a análise comparativa entre as variáveis qualitativas foi aplicado o teste qui-quadrado de proporções e qui-quadrado, e quando necessário, o teste de Fisher. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% para rejeição da hipótese de nulidade. Os softwares utilizados foram o Excel 2000 e o R v2.10.0.

3.8. Aspectos éticos

Esta pesquisa obedeceu aos princípios que regem o Código de Ética Experimental e às leis de proteção aos animais de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente à Lei 9.605 . art. 32 e o Decreto nº 3.179 . Art. 17 de 21/09/1999, que trata da questão e normas para prática científica de vivisseção de animais, e o princípios éticos da Experimentação Animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Esta pesquisa foi aprovada em 17/11/2010 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) processo nº 23076.037579/2010-68.



4. Resultados

4.1. Observações realizadas no período pós-operatório

Durante o período de observação, não foram verificados sinais sugestivos de comprometimento sistêmico ou complicações relacionadas, especificamente, com o procedimento realizado. Nenhum animal apresentou extrusão de algum dos fragmentos do material implantado, polipropileno ou biopolímero. Não houve óbito de nenhum animal e o biopolímero estava presente em todas as amostras mesmo após 120 dias do implante.

4.2. Estudo anatomopatológico

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos para cada parâmetro anatomopatológico estudado, quanto ao tipo de material implantado e o tempo decorrido do implante, no momento da análise. Houve um problema técnico na coloração da lâmina de um animal pertencente ao grupo 120, com implante de polipropileno, sendo essa lâmina excluída da amostra.

4.2.1. Infiltrado inflamatório agudo

Ocorreram diferenças significativas entre os materiais nos animais sacrificados após sete dias, com relação à intensidade do processo inflamatório agudo, ou neutrofílico ($p=0,0016$), sendo o biopolímero indutor dessa maior resposta inflamatória. O grau leve foi preponderante na reação inflamatória desencadeada pelo polipropileno. E reação inflamatória intensa foi observada em dez ratos com implantes de biopolímero (Figura 11).

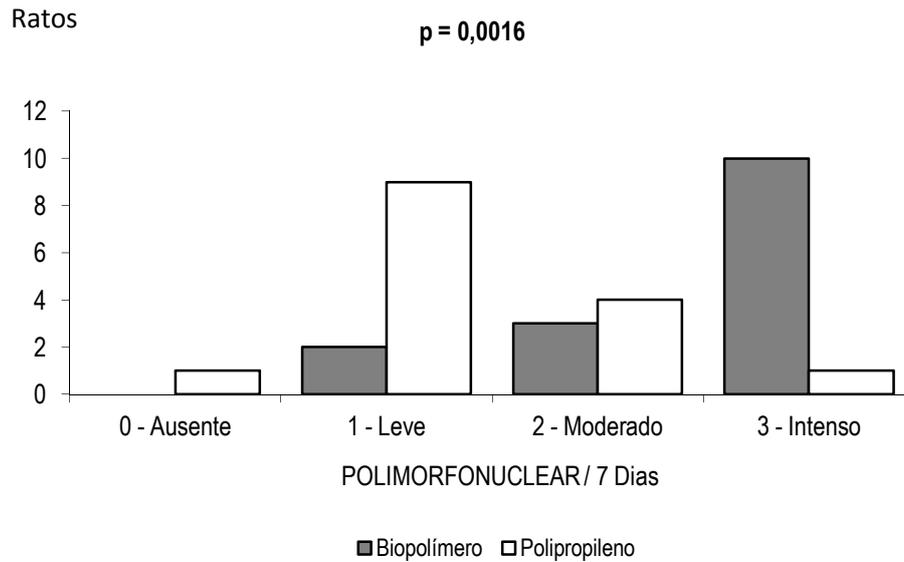


Figura 11. Comparação da intensidade do infiltrado inflamatório polimorfonuclear produzido pelo biopolímero e polipropileno após sete dias do implante.

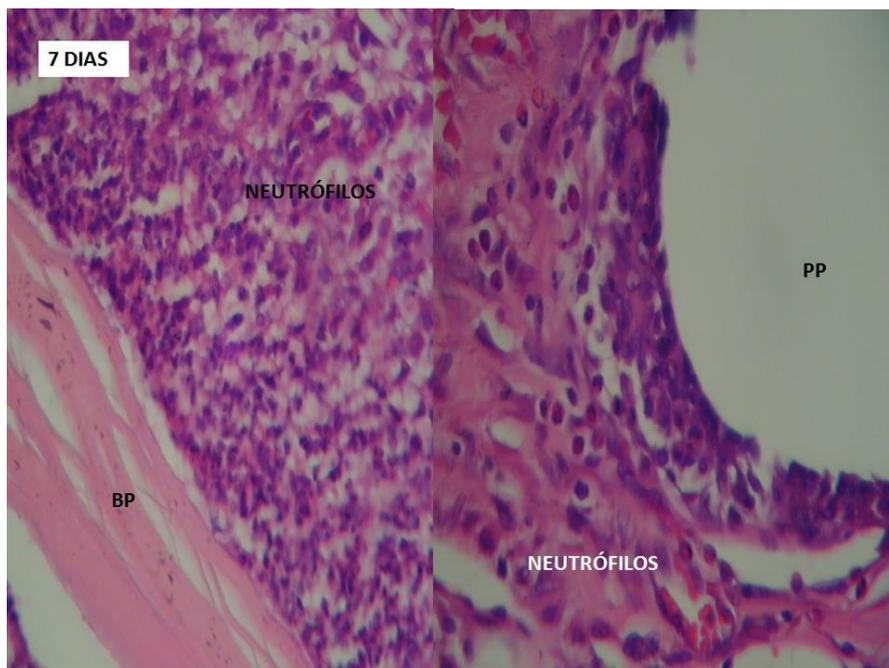


Figura 12. . Reação inflamatória aguda com os materiais implantados. PP = polipropileno e BP = biopolímero

A reação inflamatória aguda, ainda que residual, não foi observada em nenhum animal no grupo sacrificado após 120 dias do implante. Neste sentido, não ocorreram diferenças significativas entre as telas, com relação a essa variável, nas amostras avaliadas nesse momento ($p=1,000$).

Verificou-se que a inflamação aguda ocorreu com mais frequência e maior intensidade quanto mais precoce foi a observação dos animais. O biopolímero desencadeou reação inflamatória aguda em 66% dos indivíduos, enquanto o polipropileno desencadeou 7%. Contudo a observação após 120 dias mostrou que ambos os materiais apresentavam reação inflamatória aguda imperceptível.

4.2.2. Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário

Ocorreram diferenças significativas entre as telas após sete dias do implante com relação à intensidade da reação inflamatória linfoplasmocitária ($p=0,0092$). No grupo do biopolímero, o grau moderado da inflamação foi preponderante. Doze indivíduos (80%) do grupo do biopolímero apresentaram reação inflamatória moderada, em comparação com quatro indivíduos (26%) do polipropileno. (Figura 13)

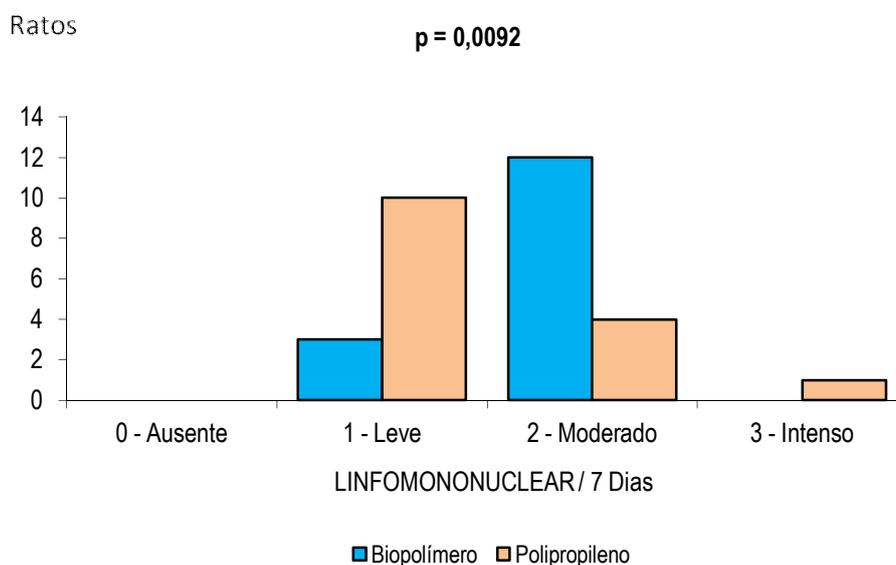


Figura 13. Comparação da intensidade da reação linfoplasmocitária produzida pelo biopolímero e polipropileno após sete dias do implante.

Não houve diferença entre as telas nas amostras avaliadas após 120 dias ($p=0,3898$), com relação à intensidade da reação linfoplasmocitária. Nos grupos analisados não houve reação inflamatória ausente ou

intensa, as reações inflamatórias, leve e moderada foram preponderantes, guardando-se a proporcionalidade entre os grupos.

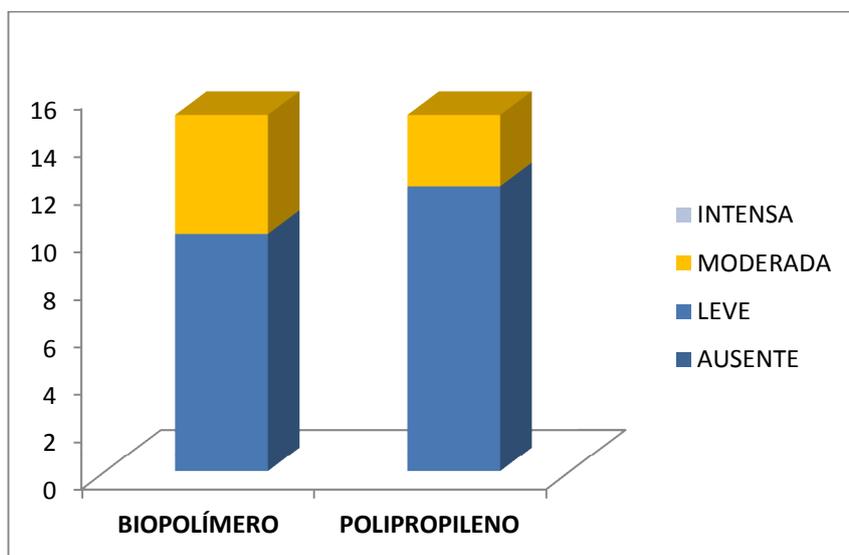


Figura 14. Comparação da intensidade da reação linfoplasmocitária produzida pelo biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante.

Na análise desse parâmetro, ao longo do tempo, foram evidenciadas diferenças significativas, relacionadas com o biopolímero ($p=0,0253$), ou seja, a reação inflamatória linfomononuclear ocasionada pelo biopolímero, apresentou um decréscimo significativo após 120 dias do implante. O mesmo não aconteceu com o polipropileno, não havendo diferença significativa após 120 dias, com identificação de infiltrado linfoplasmocitário semelhante ao inicial ($p=0,5149$). Nos casos do biopolímero, quanto maior o tempo, menor a incidência e a intensidade da reação inflamatória linfoplasmocitária.

4.2.3. Fibrose

As amostras avaliadas aos sete dias pós-implante não apresentaram diferença significativa entre os materiais, com referência à análise qualitativa da fibrose ($p=0,6999$). Quando observada, a fibrose foi incipiente, representada por fibroblastos e feixes colágenos esparsos. (Figura 15)

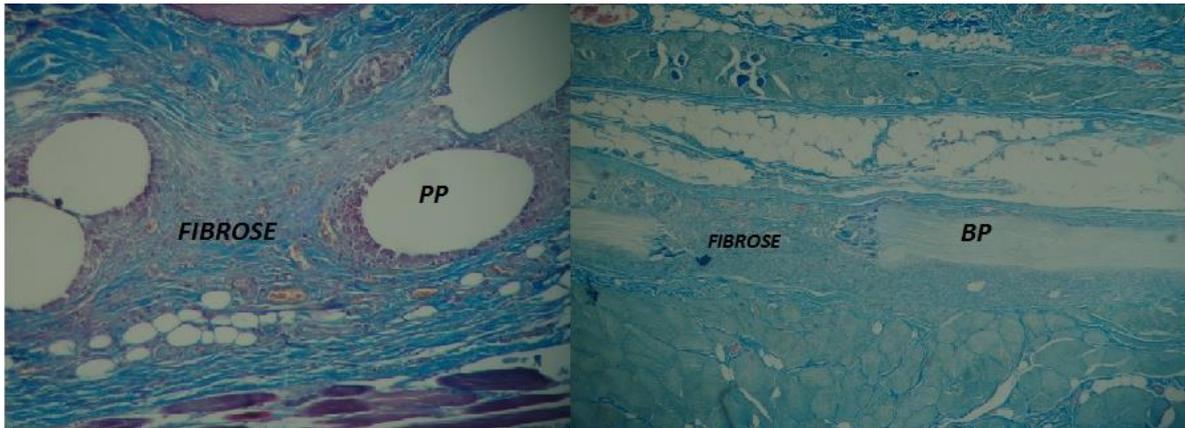


Figura 15. Corte histológico demonstrando formação de fibrose induzida pelos implantes. PP = polipropileno e BP = biopolímero. Aumento 200x.

Aos 120 dias, nos testes estatísticos não foram demonstradas diferenças entre os materiais ($p=0,5057$). Contudo, observou-se fibrose de intensidade leve e moderada em 93% do total de amostras do biopolímero, em comparação com 78% do polipropileno. Assim como, o biopolímero não apresentou ausência de fibrose após 120 dias do implante.

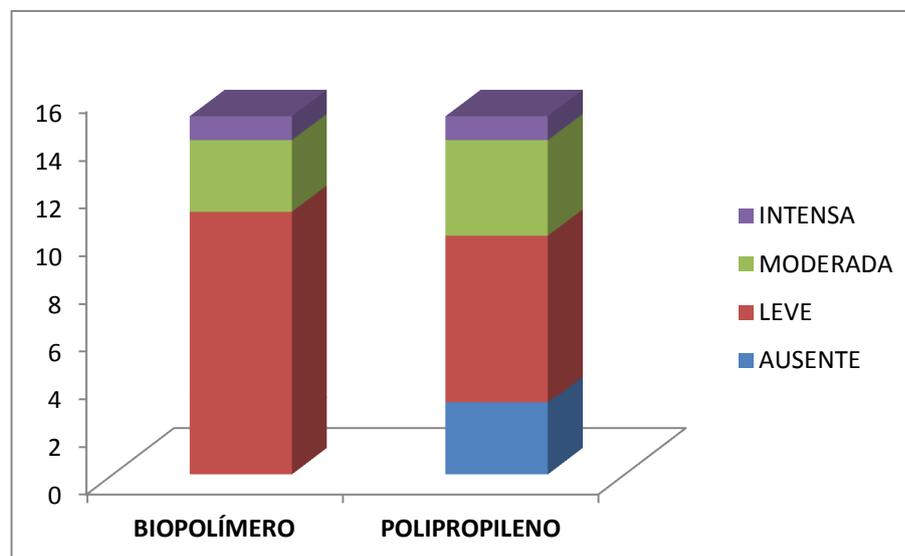


Figura 16. Comparação da fibrose produzida pelo biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante.

Quando comparamos a fibrose induzida por polipropileno após sete dias de implante com a fibrose após 120 dias de implante observamos uma diminuição dessa fibrose com diferença significativa ($p=0,0393$), traduzindo uma atenuação qualitativa dessa fibrose(Figura 17). Observe no gráfico abaixo que a fibrose moderada presente após sete dias de implante diminuiu drasticamente na análise após 120 dias. Assim como houve aumento da ausência de fibrose nas amostras analisadas após 120 dias quando comparadas com amostras de sete dias de implante.

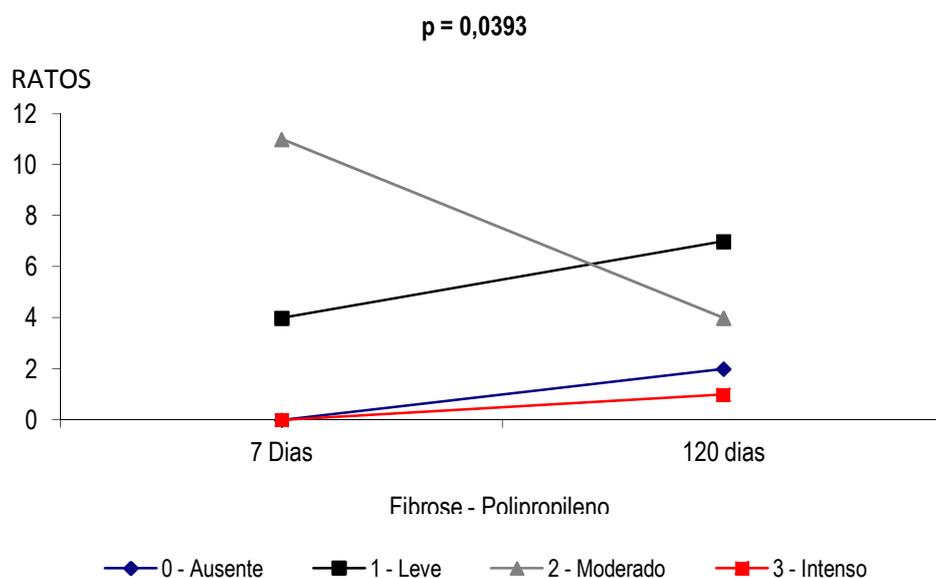


Figura 17. Gráfico mostrando a evolução da fibrose induzida pelo polipropileno entre sete e 120 dias após a sua implantação.

Na tela do biopolímero não ocorreram diferenças significativas em função do tempo, no que se refere à fibrose ($p=0,0604$), de acordo com a análise qualitativa. No biopolímero, a exemplo do polipropileno, houve uma diminuição qualitativa da fibrose. Contudo, essa diminuição apresentada foi não significativa.

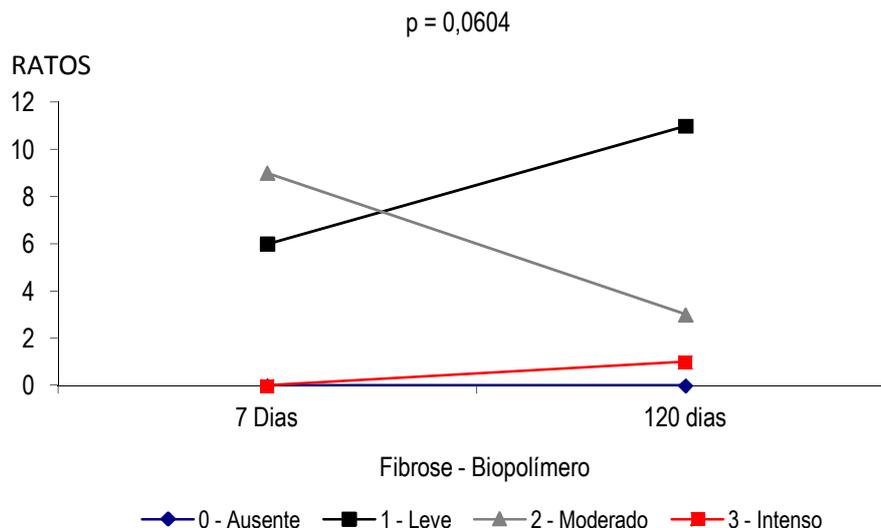


Figura 18. Gráfico mostrando a evolução da fibrose induzida pelo biopolímero da cana-de-açúcar entre sete e 120 dias após a sua implantação.

4.2.4. Necrose e calcificação

Todos os materiais apresentaram parte das amostras sem evidências de necrose e calcificação na análise realizada após sete e 120 dias.

4.2.5. Quantificação de células gigantes

Realizamos uma contagem do número de células gigantes por campo de grande aumento (aumento 200 vezes) em todas as amostras. Quando analisamos o grupo de ratos sacrificados após sete dias do implante, não observamos diferença significativa entre o polipropileno e o biopolímero ($p=0,0870$) quanto ao número de células gigantes.

Tabela 3. Comparação de Células gigantes entre biopolímero e polipropileno sete dias após o procedimento

Variável	N	Min	Max	Media	Mediana	Desvio	EP	p-valor
Células Gigantes								
Biopolímero(7 dias)	15	2	32	18,80	20,00	6,32	1,63	0,0870
Polipropileno(7 dias)	15	13	40	22,93	21,00	8,47	2,19	

Quando quantificamos o número de células gigantes no grupo de animais sacrificados após 120 dias do procedimento, constatamos um maior número no biopolímero em relação ao polipropileno, sendo esta diferença significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Comparação de Células gigantes entre biopolímero e polipropileno 120 dias após o procedimento

Variável	N	Min	Max	Media	Mediana	Desvio	EP	p-valor
Células Gigantes								
Biopolímero 120 dias	15	41	118	68,21	63,5	23,73	6,34	0,0001
Polipropileno 120 dias	14	12	51	26,86	26,5	12,69	3,39	

Ao analisarmos o mesmo material e comparando o número de células gigantes entre os animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento, registramos que o polipropileno não mostrou diferença significativa.

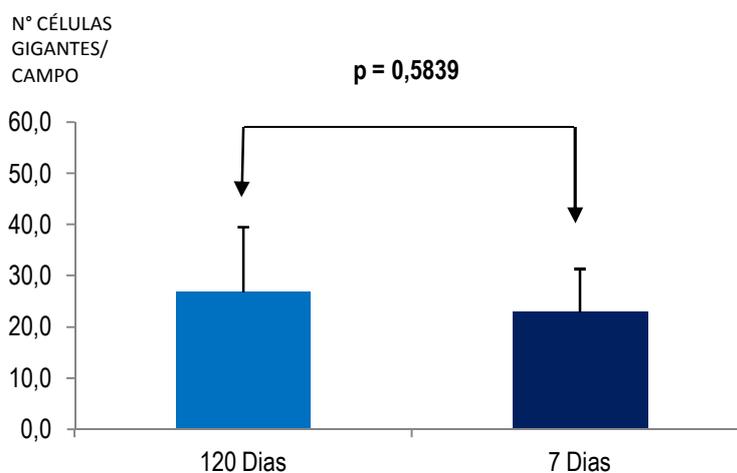


Figura 19. Comparação do número de células gigantes nos ratos sacrificados entre sete e 120 dias com implante de polipropileno.

Enquanto que a mesma análise anterior, realizada com os ratos que receberam implantes de biopolímero, mostrou uma superioridade numérica e significativa de células gigantes nas amostras após 120 dias do procedimento em relação aos animais sacrificados após sete dias do material implantado ($p < 0,0001$).

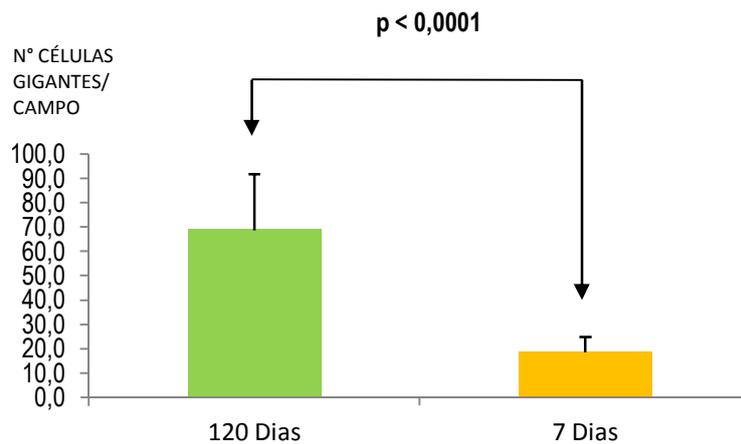


Figura 20. Comparação do número de células gigantes nos ratos sacrificados entre sete e 120 dias com implante de biopolímero.

Quando comparamos animal a animal divididos em grupos de sacrifício (sete e 120 dias) podemos observar a superioridade numérica do biopolímero após 120 dias na contagem de células gigantes de corpo estranho.

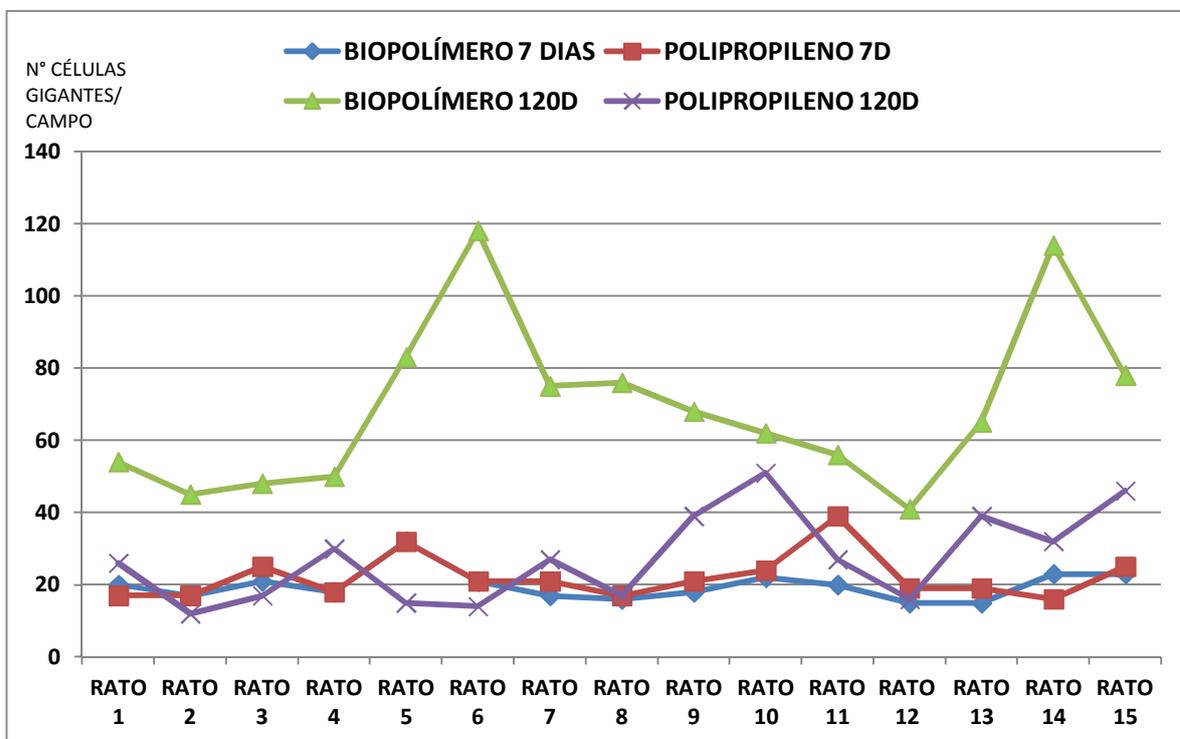


Figura 21. Análise Comparativa da presença de Células Gigantes entre sete e 120 dias para o biopolímero e o polipropileno.

4.2.6. Neoangiogênese

A neoangiogênese foi quantificada com a mensuração do número de vasos sanguíneos por campo de grande aumento (aumento 40 vezes) em todas as amostras. No grupo de animais sacrificados após sete dias do procedimento, comparamos a formação de novos vasos promovida pelo biopolímero e pelo polipropileno, não havendo diferença entre os materiais ($p=0,1439$).

Após 120 dias do implante, a diferença entre os materiais tornou-se evidente e significativa quanto à formação de novos vasos. Foi observado um maior número de vasos nas amostras que continham polipropileno, sendo essa superioridade significativa ($p=0,0001$). (Figura 22)

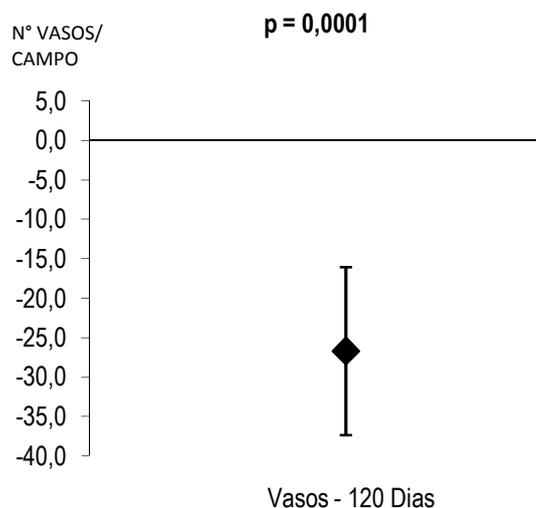


Figura 22. Diferença, após 120 dias, da neoangiogênese induzida por polipropileno e biopolímero.

Ao compararmos amostras contendo biopolímero, dividindo-as em dois grupos (animais sacrificados após sete dias e animais sacrificados após 120 dias do implante) notamos uma diferença significativa nas amostras obtidas após 120 dias do implante para a formação de novos vasos ($p=0,0380$). (Figura 23)

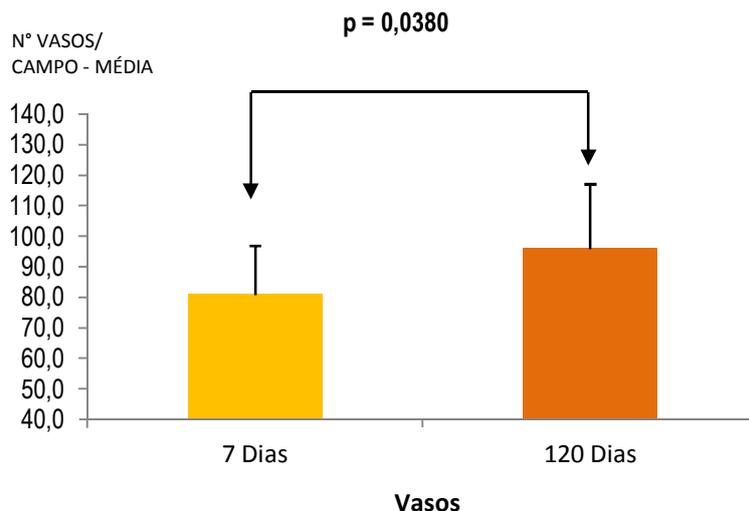


Figura 23. Comparação da formação de novos vasos induzida por biopolímero entre grupos de animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento.

Na comparação da neoangiogênese induzida pelo polipropileno houve uma maior formação vascular nas amostras de animais sacrificados após 120 dias do procedimento, sendo essa diferença significativa ($p= 0,0292$).

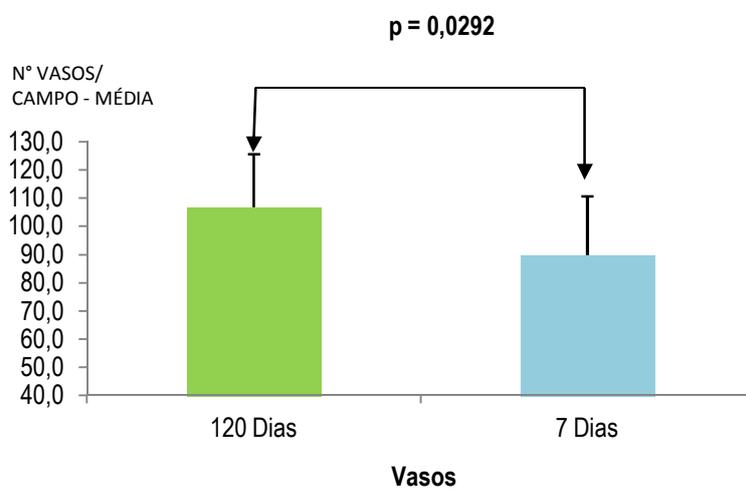


Figura 24. Comparação da formação de novos vasos induzida pelo polipropileno entre grupos de animais sacrificados após sete e 120 dias do procedimento.

4.3. Quantificação das fibras colágenas através da histofotometria

Realizamos a análise pareada dos materiais implantados, biopolímero e polipropileno, no grupo 7 e no grupo 120. Após sete dias do procedimento, quando comparamos os implantes, observamos uma diferença significativa tendo o biopolímero induzido a uma deposição maior de fibras colágenas do que o polipropileno ($p < 0,0001$). Fato semelhante ocorreu quando confrontamos os mesmos materiais, só que agora, após 120 dias do implante ($p < 0,0001$). Observem os gráficos abaixo:

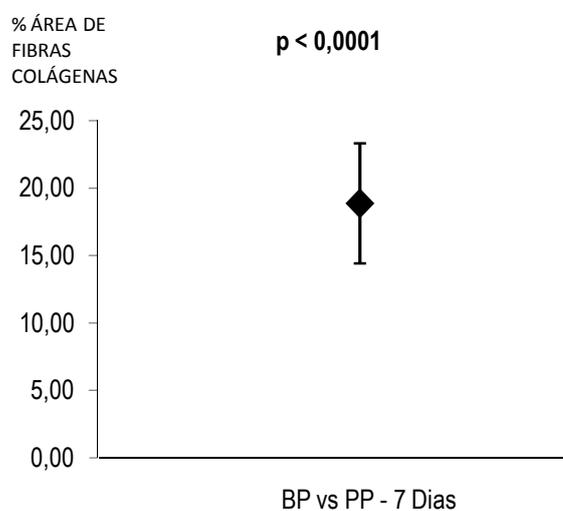


Figura 25. Comparação entre o biopolímero e polipropileno após sete dias do implante para quantificação das fibras colágenas. Mostrando a diferença entre o polipropileno (valor zero no gráfico) e o biopolímero (losango no gráfico).

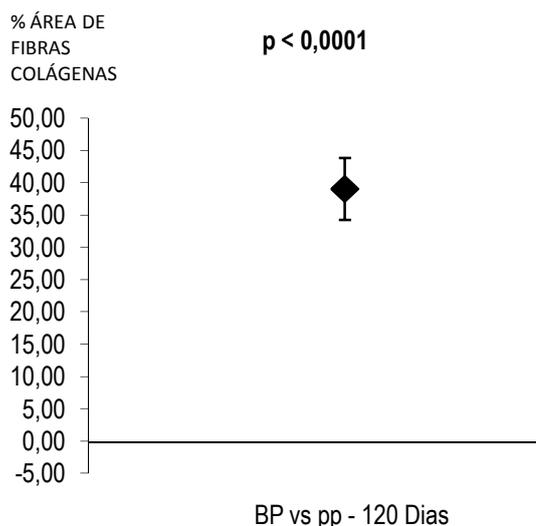


Figura 26. Comparação entre o biopolímero e polipropileno após 120 dias do implante para quantificação das fibras colágenas. Mostrando a diferença entre o polipropileno (valor zero no gráfico) e o biopolímero (losango no gráfico).

Nos gráficos acima, observamos uma superioridade do biopolímero na indução de deposição de fibras colágenas pelo hospedeiro. Porém podemos observar esses valores, em mais detalhes, na tabela abaixo:

Tabela 5. Valores obtidos através da análise histofotométrica comparando o biopolímero ao polipropileno quanto à deposição de fibras colágenas após sete e 120 dias do procedimento.

Variáveis	dif	Inf	Sup	Media	Mediana	Desvio	EP	p-valor	Teste
7 Dias									
BP	18,89	23,34	14,43	31,13	31,13	7,01	1,40	< 0,0001	TP
PP				12,24	12,94	6,63	1,33		
120 Dias									
BP	39,11	34,31	43,92	52,93	52,33	10,66	2,13	< 0,0001	TP
PP				13,81	13,00	5,15	1,03		

Quando analisamos os materiais isoladamente, levando em consideração o avanço temporal, não observamos diferença significativa na deposição de fibras colágenas induzidas pelo polipropileno ($p= 0,3542$). O acúmulo de fibras colágenas após 120 dias é maior do que após sete dias do implante, contudo essa diferença não tem significância estatística.

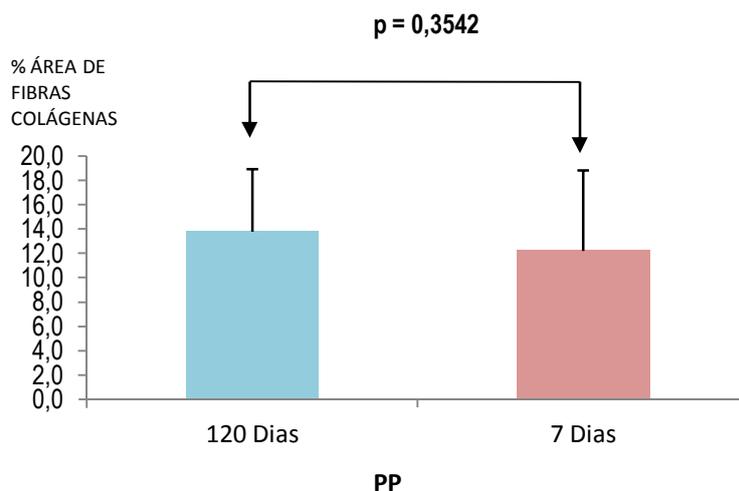


Figura 27. Comparação da deposição de fibras colágenas induzidas pelo polipropileno após sete e 120 dias do implante.

E por fim, o biopolímero mostrou uma deposição de fibras colágenas maior nos implantes analisados após 120 dias do procedimento, quando comparados com os implantes analisados após sete dias da cirurgia ($p < 0,0001$). A deposição de fibras colágenas induzidas pelo biopolímero foi, significativamente, maior após 120 dias da cirurgia.

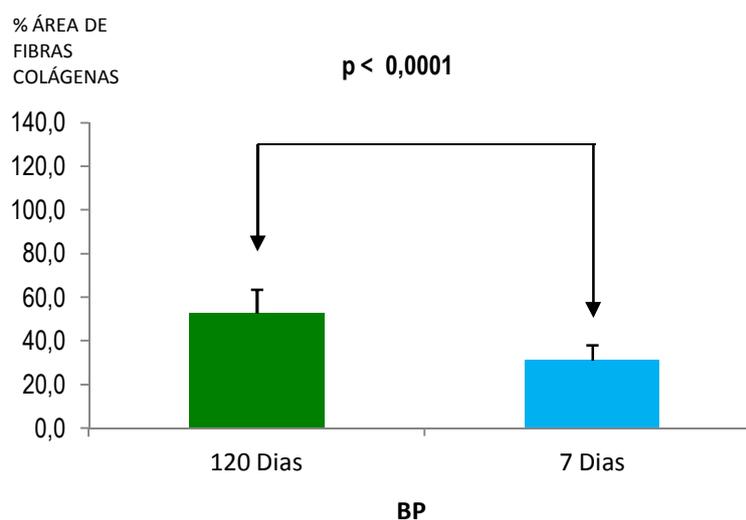


Figura 28. Comparação da deposição de fibras colágenas induzidas pelo biopolímero após sete e 120 dias do implante.



5. Discussão

5.1. Considerações sobre o modelo experimental

Modelo experimental semelhante ao do presente estudo tem sido empregado para avaliar a integração de enxertos e próteses. Assim, Slack et al.⁴⁸ compararam a reação tissular de três diferentes *slings* de polipropileno, implantados no tecido subcutâneo de ratas. Thielet al.²⁷ utilizaram o mesmo modelo para estudar as reações do hospedeiro após implantes subcutâneos de fragmentos de polipropileno monofilamentar, matriz colágena preparada com submucosa intestinal suína (SIS), silicone e prótese de copolímero policaprolactona e ácido polilático. Yildirimet al.⁸⁴ estudaram aspectos histológicos da integração de telas sintéticas e da fâscia lata cadavérica implantadas no abdome de coelhas.

Nesses estudos não foram descritas limitações da análise proposta, decorrentes do modelo experimental empregado. Por analogia aos modelos anteriores, utilizamos a tela de polipropileno tipo 1, considerada atualmente padrão ouro para tratamento de Incontinência Urinária de Esforço, e a tela biopolímero da cana-de-açúcar. Buscamos criar subsídios para corroborar ou afastar o uso do biopolímero no tratamento da Incontinência Urinária de Esforço em ensaios clínicos futuramente.

No presente experimento, considerou-se o modelo descrito apropriado aos objetivos da pesquisa. Entretanto, deve-se referir que a disposição das suturas sob a incisão cutânea, pode ter influenciado, ainda que levemente, a intensidade da reação inflamatória verificada nesse local. Apesar disso, temos que considerar também que a incisão, realizada para colocação do material implantado foi idêntica, igualando o efeito fibrótico exercido nos dois materiais implantados.

Considerou-se que a ausência de tecido adiposo e o contato direto entre o tecido epitelial da pele e a fâscia da musculatura abdominal, tornaram a parede abdominal do rato particularmente vantajoso para o estudo proposto, pois os materiais testados possuem a proposta de serem interpostos entre um

tecido de natureza epitelial (vagina) e outro de natureza conjuntiva, representado pela fásia pubocervical.

Modelos que reproduzem a vagina humana são pouco acessíveis. Riccetto et al.⁸⁵ propuseram um modelo para treinamento da técnica de *sling* em ovelhas da raça Santa Inês. Modelo esse, bem aceito por urologistas e ginecologistas, que observaram boa correlação de vários aspectos da anatomia vaginal, uretral, e dos parâmetros endoscópicos vesicais daquele modelo em relação à anatomia feminina. Entretanto, a infraestrutura necessária para manutenção de animais de grande porte, por tempo prolongado, limita o emprego desse modelo em estudos semelhantes ao presente.

Existem, também, modelos desenvolvidos com material sintético que mimetiza a textura, relações anatômicas e consistência da pelve humana, porém não teríamos a reação tissular fundamental para o nosso estudo. Então, fizemos uso de um modelo de estudo com o mínimo de infraestrutura, no que se refere a modelos animais experimentais, sem, no entanto, perder a qualidade e a excelência metodológica para o cumprimento dos objetivos propostos na tese.

5.2. Considerações sobre a metodologia

A graduação da intensidade da resposta inflamatória corresponde a uma das dificuldades dos estudos anatomopatológicos. Embora a definição explícita de cada categoria de intensidade e a análise das lâminas pelo mesmo pesquisador determine menor variabilidade na interpretação dos achados. No presente estudo buscaram-se formas de se obter a quantificação mais precisa possível. Para tanto, foi empregado o método de captura de imagem e análise quantitativa para analisar as fibras colágenas induzidas pelos implantes. Isso foi realizado porque se considerou esse parâmetro como o de maior relevância para inferências clínicas. A resposta inflamatória foi avaliada de forma qualitativa e semiquantitativa, a exemplo da metodologia empregada

previamente em estudos experimentais semelhantes na Universidade Estadual de Campinas^{86, 27} e por outros pesquisadores.⁸⁴

A Histofotometria tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos de estruturas anatômicas, a partir de cortes bidimensionais. A maior parte dos estudos de histofotometria obtém dados diretamente da microscopia óptica ou da microscopia eletrônica. De forma contrária às técnicas morfométricas, nas quais as estruturas anatômicas são medidas com escalas métricas conhecidas, a histofotometria baseia-se em princípios fotográficos e colorimétricos. Assim, nos estudos histofotométricos nem sempre se busca determinar as dimensões das estruturas em unidades absolutas, mas sim as dimensões relativas ao todo que está sendo analisado. Dessa forma, no presente estudo, buscou-se determinar a concentração relativa de fibras colágenas em torno do enxerto, em padrões percentuais, o que se denominou densidade volumétrica de fibras colágenas. Outra vantagem dessa forma de análise foi eliminar eventuais influências da técnica anatomopatológica, pois independente do tamanho do fragmento analisado, a densidade volumétrica apresentaria menor variabilidade que medidas absolutas.^{87, 88}

Para a eficácia do método histológico, o preparo das lâminas deve oferecer ao pesquisador a melhor coloração para a estrutura em estudo, a fim de que esta possa ser plenamente reconhecida e, assim, a acurácia seja a melhor possível. No presente estudo, utilizou-se o Tricromio de Masson para coloração das fibras colágenas. Essa escolha foi motivada pela ótima exposição das fibras colágenas por meio dessa coloração, uma vez que precisaríamos identificar as fibras colágenas inequivocamente através do Image Pró-plus 4.5®.

A graduação da intensidade da resposta inflamatória corresponde a uma das dificuldades dos estudos anatomopatológicos. Hunt, Williams⁸⁹ discutiram criticamente os métodos de quantificação da reação do hospedeiro a biomateriais. As avaliações qualitativas e semiquantitativas devem ser reservadas às situações nas quais há dificuldades técnicas na quantificação de estruturas. Além disso, quando se trata de comparação entre diferentes

materiais ou tratamentos, o erro inerente ao observador se repetirá ao longo do estudo.

Outra possibilidade levantada pelos autores é o uso de técnica de processamento e análise de imagens, com objetivo de tornar mais ágil e rigorosa a quantificação proposta. No entanto, Hunt, Williams⁸⁹ lembram que o manuseio de imagens não substitui a técnica adequada de preparo e obtenção da amostra e captação de imagens. Além disso, muitos erros relacionados à automação do processo de análise podem existir e não serem identificados. Portanto, para avaliação da incorporação das telas em tecidos biológicos, vários autores têm utilizado avaliação da infiltrado inflamatório ao redor da tela e aferição da angiogênese e da formação colágena no sítio do implante.^{86, 90, 91}

5.3. Aspectos gerais da resposta tecidual

As fases de reparação tecidual podem ser classificadas em: fase precoce ou de hemostasia e inflamação; fase intermediária, ou de proliferação; e fase final, na qual ocorre a maturação do colágeno.⁹² Na integração das telas sintéticas pode-se considerar a ocorrência de processo semelhante.

Assim, a reparação local após o implante de uma tela sintética se inicia com as plaquetas, que interrompem o sangramento e desencadeiam a resposta imunológica. Nessa fase há liberação de histamina e de prostaglandinas, que aumentam a permeabilidade capilar e permitem a migração de células inflamatórias. Após 24 horas, segue o início da reposta inflamatória, com a presença dos neutrófilos, macrófagos e plasmócitos no local. Essas células têm a função de remover o tecido necrótico e impedir proliferação bacteriana no local. Simultaneamente, há produção de fatores de crescimento tecidual e de fatores quimiotáticos para fibroblastos, entre outras substâncias. A fase de proliferação se inicia 24 horas após o implante. Caracteriza-se por granulação e angiogênese, epitelização (no caso das feridas em contato com o meio externo) e síntese de colágeno. No tecido de granulação, formam-se novos capilares, que fornecem os nutrientes locais. Nessa fase inicia-se a formação da matriz colágena local, que servirá de

suporte para o crescimento do tecido conjuntivo e será responsável, também, por sua força de tensão. Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese, deposição e remodelação da matriz. Na fase de maturação, há redução da concentração do colágeno por redução do estímulo de sua síntese. Nessa fase há substituição do colágeno tipo III pelo tipo I.⁴⁴

Com base nessas informações, pode-se inferir que, para qualquer implante, a duração de cada etapa poderá variar em função de diversos fatores, tais como: as condições do sistema imune do hospedeiro; grau de contaminação bacteriana local; e biocompatibilidade do material implantado. Verificou-se, também, que a resolução completa da resposta inflamatória, representada pela reconstituição do tecido nativo, poderá, eventualmente, não ser possível, em virtude da manutenção de fatores de agressão relacionados às propriedades físico-químicas do material implantado. Denomina-se integração o resultado final da interação entre o implante e o hospedeiro, a qual é, habitualmente, representada por graus variados de fibrose.

O tecido conjuntivo contém elementos fibrosos (colágeno e fibras elásticas) e a matriz viscoelástica de proteoglicanas. A relação das fibras com os componentes da matriz determina as propriedades físicas do tecido. Ulmsten, Falconer⁵⁵ relataram a importância das fibras colágenas do tipo I e III na força e tensão dos tecidos do assoalho pélvico feminino. O colágeno do tipo I é o principal componente da fibrose que se desenvolve em torno das telas de polipropileno monofilamentar e multifilamentar.⁴⁴

5.3.1. Considerações sobre aspectos específicos da integração das telas utilizadas no estudo

As propriedades físico-químicas das próteses podem relacionar-se com seu desempenho clínico. Dessa forma, Amid⁴⁴ estudou as telas empregadas nas herniorrafias abdominais e classificou as próteses de polipropileno em três tipos, com base nas suas características. Propriedades essas expostas anteriormente na introdução dessa tese. As telas de

biopolímero foram comparadas as telas de polipropileno, padrão ouro para cura da incontinência urinária, através das reações teciduais desencadeadas por esses implantes.

Após sucessivas pesquisas, está estabelecido que a tela de preferência para o tratamento da incontinência urinária de esforço é confeccionada com o polipropileno monofilamentar e macroporosa. O monofilamento impede o abrigo de microorganismos patógenos entre os fios; enquanto que, o macroporo possibilita o livre fluxo de macrófagos no combate a esses microorganismos.^{44,45,46}

Dessa forma, as respostas do hospedeiro às telas podem variar desde um extremo, no qual a prótese sofreria a formação de uma cápsula fibrosa ao seu redor, sem crescimento significativo do tecido conjuntivo entre seus filamentos, até a integração completa, na qual haveria desenvolvimento do tecido conjuntivo fibroso do hospedeiro entre os filamentos da tela, com resposta inflamatória mínima ou ausente.

No presente experimento, as fases da resposta inflamatória, descritas anteriormente, foram verificadas de forma diversa nas telas monofilamentares e nas telas do biopolímero. A reação inflamatória aguda esteve presente em ambos os tipos de tela, sendo mais intensa essa reação na tela do biopolímero. Essa mesma reação inflamatória aguda não foi aferida após 120 dias em nenhum dos dois implantes.

As telas de polipropileno monofilamentares tipo I, por serem macroporosa, apresentam maior permeabilidade molecular e, conseqüentemente, mais rápida fixação fibrinosa entre os tecidos adjacentes, funcionando assim, como cola biológica. A análise histológica demonstra uma diminuição da reação inflamatória e fibrose quando utilizadas telas de maior porosidade.⁹³ As telas utilizadas no experimento possuem poros de 75 μ m (macroporo) e em bem maior quantidade quando comparados com a quantidade de poros da tela do biopolímero. Devido ao maior número de poros, possibilitando um maior fluxo de células de defesa entre os fios do polipropileno, verificamos uma menor reação inflamatória aguda desse último material em relação ao biopolímero. A reação inflamatória aguda apesar de ter

sido mais significativa com o biopolímero não trouxe dano tecidual ao hospedeiro.

Essa reação inflamatória aguda, mais intensa, do biopolímero, atrai uma maior quantidade de neutrófilos e monócitos que, posteriormente, se transformaram em macrófagos. Esses macrófagos iniciam estímulos para produção de tecido de granulação com angiogênese e fibroplasia. Após 120 dias do implante não observamos reação inflamatória aguda em nenhuma das próteses analisadas, corroborando a boa incorporação do polipropileno ao tecido hospedeiro e mostrando que o biopolímero incorpora-se de forma similar, por ser uma matriz acelular, e mesmo tendo um infiltrado neutrofílico mais abundante nos primeiros sete dias após o implante.

Na quantificação do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, houve comportamento similar ao infiltrado inflamatório agudo. O biopolímero desencadeou uma reação inflamatória mais significativa do que o polipropileno após sete dias do procedimento, e após 120 dias não houve diferença entre os materiais analisados.

A inflamação crônica acontece dentro de semanas ou meses e é caracterizada por inflamação ativa (infiltrado de células mononucleares), com destruição tecidual e tentativa de reparar os danos (cicatrização). Outras células também estão envolvidas na inflamação crônica, como linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, mastócitos e neutrófilos. As causas da inflamação crônica são . principalmente: infecções persistentes, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, corpo estranho, como é o exemplo dos implantes utilizados nesse experimento.

A destruição tecidual ocorre inevitavelmente na inflamação crônica. Contudo essa destruição tecidual é responsável pelo recrutamento dos macrófagos que irão liberar citocinas e recrutar leucócitos, além de ocorrer a produção de anticorpos específicos pelos plasmócitos. Os macrófagos, linfócitos e plasmócitos, em conjunto, causam destruição tecidual e fibrose. A fibrose ocorrerá porque os macrófagos produzem ainda fatores de crescimento

(PDGF, TGF, TGF- β), citocinas fibrinogênicas, fatores de angiogênese (FGF) e colagenases de remodelamento.

Essa resposta inflamatória, em nosso experimento, foi subclínica, pois não tivemos registro de sinais clínicos de inflamação. O biopolímero apresentou uma reação inflamatória crônica não danosa aos animais, ao mesmo tempo em que, essa reação inflamatória foi suficiente para gerar uma neoformação vascular e de fibrose adequada como veremos adiante.

O biomaterial ideal a ser implantado é aquele que induz a produção de fibras colágenas pelo hospedeiro, para a manutenção da força de tensão no sítio de cura da incontinência urinária. No entanto, essa fibrose não pode ser oriunda de uma inflamação crônica intensa, sobre pena de haver rejeição do implante antes da fibroplasia. Nos nossos animais não observamos infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intenso após 120 dias do procedimento, demonstrando uma das qualidades desse biomaterial, a biocompatibilidade.

As células gigantes de corpo estranho se mantêm permanentemente na interface do implante com o tecido hospedeiro e secretam citocinas que estimulam fibroblastos a depositar uma camada avascular densa de colágeno ao redor do implante, formando uma cápsula que, permanentemente, o isola em relação às adjacências.⁹⁴ Os dois implantes, utilizados em nosso experimento, não diferiram quanto ao número de células gigantes após sete dias do procedimento. Após 120 dias do implante o número de células gigantes se mostrava significativamente maior ao redor do biopolímero, em comparação com o polipropileno.

A resposta a corpo estranho é uma cascata fisiológica, desencadeada pelo recrutamento de células inflamatórias. Neutrófilos modulam a resposta do hospedeiro nos primeiros minutos ou horas, enquanto os macrófagos mantêm sua resposta durante dias. Essas células são capazes de fagocitar eficientemente bactérias e células mortas. No entanto, não conseguem digerir implantes macroscópicos. Dessa forma, observa-se um infiltrado inflamatório crônico, na qual a fusão dos macrófagos cria as células gigantes de corpo estranho.⁹⁵

Ao analisarmos retrospectivamente nossos resultados, constatamos que o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foi maior no biopolímero em comparação com o polipropileno, sendo esse um fator que justifica o maior número de células gigantes no biopolímero. Outro ponto a ser considerado, é o maior número de poros presentes no implante de polipropileno, possibilitando uma integração mais rápida desse material ao hospedeiro.

Quando analisamos a progressão dos implantes ao longo do tempo observamos que o polipropileno não apresenta diferença na contagem das células gigantes entre sete e 120 dias após o procedimento. Em contrapartida o biopolímero apresenta diferença significativa quando realizamos essa mesma comparação temporal.

Acreditamos que uma resposta inflamatória prolongada, devido à presença de um corpo estranho, como o implante de uma tela de polipropileno ou membrana do biopolímero da cana-de-açúcar, pode atrasar a progressão do processo de cicatrização na fase de fibroplasia. Então, teremos uma produção gradativa de colágeno por três semanas, oferecendo um aporte maior de fibras colágenas no tecido cicatricial.

Sabemos que para qualquer implante a duração e a intensidade da resposta inflamatória irão depender de diversos fatores: as condições do sistema imune do hospedeiro, grau de contaminação bacteriana local e, principalmente, biocompatibilidade do material implantado. O Biopolímero é um material acelular e com possibilidade de ser integrado ao hospedeiro, porém, por ser um material estranho, ativa macrófagos, liberando citocinas e amplificando o processo inflamatório. Essa resposta inflamatória em nosso estudo se mostrou fisiológica e sem sinais de citotoxicidade, uma vez que nenhum dos implantes de biopolímero mostrou sinais de rejeição.

Nos deixa tranquilo o fato da citotoxicidade do biopolímero ter sido amplamente testada com ensaios de índice de aderência, análise de liberação de óxido nítrico e ensaio do dimetiltiliazol (MMT) com todos indicando baixa toxicidade a um nível que permite a sua aplicação experimental com segurança.⁶⁵

Assim como o polipropileno, o biopolímero não apresentou extrusão da tela em nenhum dos animais. Tal fato corrobora a ausência de toxicidade dos materiais utilizados, mesmo tendo a tela contato direto com a linha de sutura. Isso teve por objetivo replicar modelo semelhante ao que acontece nos implantes de materiais realizados na vagina, onde temos o implante subjacente à linha de sutura.

A angiogênese é uma etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e supre de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento.⁹⁶

A angiogênese permite o suprimento de oxigênio, nutrientes, e células inflamatórias necessárias para o processo de cicatrização que ocorre dentro do tecido.⁹⁷ Este processo constitui-se como sendo um passo decisivo na cicatrização, pois a interação entre um biomaterial e o tecido circundante requer capilaridade e formação de vasos suficientes para assegurar um transporte adequado de fatores entre tecido e material implantado.⁹⁸

Apesar do biopolímero e do polipropileno terem sido desenvolvidos para serem biocompatíveis tanto física como quimicamente, eles não são considerados inertes pelo organismo. Quando implantados, os biomateriais podem induzir uma resposta inflamatória do tipo "corpo estranho" culminando com a formação de um tecido fibrovascular no implante e no tecido adjacente ao mesmo. Essa resposta homeostática ocorre principalmente devido à lesão tecidual causada pelo implante e por interações existentes entre a interface tecido/implante.⁹⁷

O Biopolímero e o Polipropileno não apresentaram diferença na neoformação vascular após sete dias do procedimento. Nas primeiras fases da cicatrização o organismo tem a preocupação de fagocitar bactérias e corpo estranho, aumentar a permeabilidade vascular, recrutar linfócitos para o local da agressão e liberar fatores de crescimento, preparando a ferida para a fase proliferativa. Ainda não houve, por parte do hospedeiro, identificação do grau de biocompatibilidade do implante.

Após 120 dias, tivemos uma diferença significativa na formação de novos vasos nos implantes de polipropileno em relação ao biopolímero. A neovascularização observada poderia estar associada às lesões provocadas pelo infiltrado de células inflamatórias, ou pela liberação de fatores pró-angiogênicos secretados por estas células, por exemplo, *VEGF* (fator de crescimento endotelial). Assim, atribuímos a diferença na neovascularização à capacidade que cada tipo de implante tem em desencadear a resposta inflamatória.

Então podemos estar diante de um raciocínio contraditório. Lembrando que em nossos resultados anteriores o biopolímero desenvolveu maior resposta inflamatória aguda e crônica nos primeiros sete dias, esperaríamos que a formação neovascular fosse maior nesse material do que no polipropileno. Porém entendemos que se a formação vascular foi menos acentuada nos implantes de biopolímero foi devido a menor necessidade do hospedeiro em encapsular esse material. Mostrando ter uma biocompatibilidade acentuada e uma excelente integração ao tecido hospedeiro.

A maior capacidade de integração é relacionada, também, com a melhor distribuição local do suprimento sanguíneo, e melhoria no afluxo de células do sistema imune do hospedeiro, o que diminuiria o risco de infecção⁴⁸. Considera-se que essa propriedade é particularmente vantajosa para qualquer prótese implantada em local potencialmente contaminado, como a vagina.

As células gigantes de corpo estranho se mantêm permanentemente na interface do implante com o tecido hospedeiro e secretam citocinas que estimulam fibroblastos a depositar uma camada avascular densa de colágeno ao redor do implante, formando uma cápsula que, permanentemente, o isola em relação às adjacências.⁹⁴

No tecido de granulação, formam-se novos capilares que fornecem os nutrientes locais. Nessa fase, inicia-se a formação da matriz colágena local, que servirá de suporte para o crescimento do tecido conjuntivo e será

responsável, também, por sua força tênsil. Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese, deposição e remodelação dessa matriz.⁹⁴

Os materiais implantados mostraram diferença quanto à formação de fibrose após sete e 120 dias do procedimento ao compararmos materiais diferentes no mesmo animal. Em nosso estudo, verificamos a presença de deposição de colágeno no interior da matriz do biopolímero, fato que não ocorreu com o polipropileno. A superioridade do biopolímero é creditada a uma maior integração desse material ao hospedeiro. A integração é definida como sendo o produto final da interação entre o implante e o hospedeiro, representada por variados graus de fibrose.

O crescimento de tecido conjuntivo, de forma mais acentuada, no interior da tela de biopolímero, determina sua imobilização no local do implante. Assim, pode-se supor que, quanto maior a integração, menor seria o risco de trauma mecânico pela fricção repetida da prótese contra os tecidos circunvizinhos. Esse trauma poderia manifestar-se, clinicamente, na forma de extrusão vaginal ou de erosão de órgãos circunvizinhos à prótese, como a uretra ou a bexiga, que são significativamente mais frequentes nas cirurgias com telas multifilamentares.⁹⁹

Essa mais eficaz integração do biopolímero poderá reduzir, no futuro, a reação inflamatória granulomatosa. Visto que, já em 1973, Homsy et al.¹⁰⁰ em estudo a respeito de implantes dentários, verificou que o atrito mecânico resultante de micromovimentos na interface implante-hospedeiro induziu à formação de reação inflamatória granulomatosa persistente. Tal evidência nos leva a crer que o implante de biopolímero oferecerá uma maior segurança contra rejeição.

Verificamos, também, que a resolução completa da resposta inflamatória, representada pela reconstituição do tecido nativo, poderá, eventualmente, não ser possível, em virtude da manutenção de fatores de agressão relacionados às propriedades físico-químicas do material implantado. Até o período de observação do nosso estudo, 120 dias, tivemos reação

inflamatória crônica em ambos os materiais, sem, no entanto, ser considerada uma reação maléfica ao processo cicatricial.

A deposição de fibras colágenas induzidas pelo biopolímero foi crescente e mostrou uma superioridade após 120 dias do implante. O objetivo final da cicatrização de uma ferida é a reconstituição do tecido anteriormente íntegro que foi lesado. Na cura da Incontinência Urinária necessitamos de um material que promova a indução de fibras colágenas de maneira gradual e constante no espaço suburetral. A presença do biopolímero no subcutâneo dos ratos, em nosso experimento, estimulou uma resposta inflamatória e um acúmulo de fibras colágenas que mimetiza o processo cicatricial ocorrido abaixo da uretra de mulheres submetidas à cura da Incontinência Urinária.

O processo de cicatrização tecidual é uma sequência de etapas subentrantes, as quais envolvem várias relações teciduais e ambientais, onde o acréscimo de um material exógeno, seja ele sintético ou biológico, irá interferir nesta dinâmica. O adequado controle desta interferência é o desafio apresentado à ciência no momento. Nesse sentido, nos parece útil a busca por um material biológico na tentativa de modular as fases iniciais da cicatrização, de tal maneira que este processo ocorra em amplitude ideal para obtermos sucesso no tratamento, porém, com menor risco às complicações. Parece-nos legítimo ser o biopolímero uma das opções que configure esse material biológico.



6. Conclusões

- 1. As telas de biopolímero, implantadas no tecido subcutâneo de ratos adultos, causam reação inflamatória aguda e linfoplasmocitária mais intensa que as telas de polipropileno. Essas alterações não persistem muito tempo após o implante.**
- 2. A densidade volumétrica de fibras colágenas, em torno das telas de biopolímero, implantadas no tecido subcutâneo de ratos adultos, é significativamente maior que nas telas de polipropileno.**



Referências

- 1) Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 2002; 21(2):167-78.
- 2) Ramsey SD, Wagner TH, Bavendam TG. Estimating costs of treating stress urinary incontinence in elderly women according to the AHCPR clinical guidelines. *Am J Man Care*. 1996; 2(2):147-54.
- 3) O'Brien BJ, Goeree R, Bernard L, Rosner A, Williamson T. Cost-effectiveness of tolterodine for patients with urge incontinence who discontinue initial therapy with oxybutinin: a Canadian perspective. *Clin Ther*. 2001 Dec; 23(12): 2038-49.
- 4) Giordano D. Paper presented at: 20th Congress Franc de Chir; 1907; Paris, France.
- 5) Goebell R. Zuroperativen Besierigung der angeborenen incontinentia vesicalis. *Z Gynäk Urol*. 1910; 2:187-91.
- 6) Frankenheim P. Zuroperativenbehandlung der inkontinenz der männlichen harnröhre. *Verh Dtsch Gesellsch Chir*. 1914; 43:149-54
- 7) Stoeckel W. Über die Verwändung der musculi pyramidalis bei der opeutivenbehandlung der incontinentia urinae. *Zentrabl Gynakol*. 1917; 41:11-7.
- 8) Aldrige AH. Transplantation of fascia for the relief of urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol*. 1942; 44:398-411.
- 9) Petros P, Ulmsten U. An Integral Theory of female urinary incontinence. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1990; 69(Suppl 153):7-31.
- 10) Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varghos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1996; 7(2):81-6.
- 11) Delorme E. La bandelette trans-obturatrice: un procédé mini-invasif pour traiter l'incontinence urinaire d'effort de la femme. *Prog Urol*. 2001; 11(6):1306-13.
- 12) Palma PCR, Riccetto CLZ, Herrmann V, Dambros M, Thiel M, Bandiera S, Netto Jr NR. Transobturator SAFYRE sling is as effective as the transvaginal procedure. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2005a Nov-Dec; 16(6):487-91.
- 13) Fischer A, Fink T, Zachmann S, Eickenbusch U. Comparison of retropubic and outside-in transobturator sling systems for the cure of

- female genuine stress urinary incontinence. *Eur Urol.* 2005 Nov; 48(5):799-804.
- 14) Jensen JK, Rufford HJ. Sling procedures - artificial. In: Cardozo L, Staskin D. *Textbook of Female Urology and Urogynaecology.* 1 st. London: Isis Medical Media; 2001. p. 543-51.
 - 15) Palma PCR, Vidal BC, Riccetto CLZ, Herrmann V, Netto Jr NR. A propósito de um novo slingpubovaginal absorvível. *Experiência inicial.* *J Bras Ginecol.* 1996; 106(9): 335-9.
 - 16) Palma PCR, Marques PC, Vidal BC, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto Jr NR. Histopathological alterations resulting from subcutaneous implant of collagen and autologous aponeurotic fascia: a comparative study in dogs. *Int Braz J Urol.* 2001a Mar-Apr; 27(2):171-7.
 - 17) Palma PCR, Riccetto CLZ, Mesquita R, Thiel M, Pagés M, Dambros M, Netto Jr NR. Sling+de pericardio bovino, experiência em 13 casos. *Urod A.* 2001b; 14(4):254-8.
 - 18) Palma PCR, Dambros M, Riccetto CLZ, Herrmann V, Netto Jr NR. Pubovaginal sling using the porcine small intestine submucosa for stress urinary incontinence. *Int Braz J Urol.* 2001c; 27(5):483-8.
 - 19) Herrmann V, Netto Jr NR, Dambros M, ZanettiniRiccetto CL, Palma PCR. Slingpubovaginal com o emprego da submucosa intestinal suína - análise de quatro anos de seguimento. *IntBraz J Urol.* 2005; 30(Suppl special):33.
 - 20) Faber P, Beck L, Heindreich J. Treatment of stress urinary incontinence with the lyodura sling. *Urol Int.* 1978; 33:L117.
 - 21) Iosif CS. Porcine corium sling in the treatment of urinary stress incontinence. *Arch Gynecol.* 1987; 240(3):131-6.
 - 22) Handa VL, Jensen JK, Germain MM, Ostergard DR. Banked human fascia lata for the suburethral sling procedure: a preliminary report. *Obstet Gynecol.* 1996 Dec; 88(6):1045-49.
 - 23) Simsiman AJ, Powell CR, Stratford RR, Menefee SA. Suburethral sling materials: Best outcome with autologous tissue. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Dec; 193(6): 2112-6.
 - 24) Silva-Filho AL, Cândido EB, Noronha A, Trignelli SA. Comparative study of autologous pubovaginal sling and synthetic transobturator (TOT) Safyre sling in the treatment of stress urinary incontinence. *Arch Gynecol Obstet.* 2006 Feb; 273(5):288-92.
 - 25) Farrel SA, Dempsey T, Geldenhuis L. Histologic examination of fascia+ used in colporrhaphy. *Obstet Gynecol.* 2001 Nov; 98(5 Pt 1): 794-8.

- 26) Feifer A, Corcos J. The use of synthetic sub-urethral *slings* in the treatment of female stress urinary incontinence. *IntUrogynecol J*. 2007 Sep; 18(9):1087-95.
- 27) Thiel M, Palma PCR, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto Jr NR. A stereological analysis of fibrosis and inflammatory reaction induced by four different synthetic slings. *BJU Int*. 2005 Apr; 95(6):833-7.
- 28) Ghoneim GM, Shaaban A. Sub-urethral slings for treatment of stress urinary incontinence. *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1994; 5:228-39.
- 29) Iglesia CB, Fenner DE, Brubaker L. The use of mesh in gynecologic surgery. *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1997; 8(2):105-15
- 30) Horbach NS, Blanco JS, Ostergard DR, Bent AE, Cornella JL. A suburethral sling procedure with polytetrafluoroethylene for the treatment of genuine stress incontinence in patients with low urethral closure pressure. *Obstet Gynecol*. 1988 Apr; 71(4):648-52.
- 31) Summitt Jr RL, Bent AE, Ostergard DR, Harris TA. Suburethral sling procedure for genuine stress incontinence and low urethral pressure: a continued experience. *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1992 Mar; 3(1):18-21.
- 32) Weinberger MW, Ostergard DR. Long-term clinical and urodynamic evaluation of the polytetrafluoroethylene suburethral sling for treatment of genuine stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol*. 1995 Jul; 86(1):92-6.
- 33) Stanton SL, Brindley FS, Holmes DM. Silastic sling for rethral sphincter incompetence in women. *Br J ObstetGynaecol*. 1985 Jul; 92(7):747-50.
- 34) Chin YK, Stanton SL. A follow-up of silastic sling for genuine stress incontinence. *Br J ObstetGynaecol*. 1995 Feb; 102(2):143-7.
- 35) Korda A, Peat B, Hunter P. Silastic slings for female incontinence. *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1990 Jun; 1(2):66-9.
- 36) Palma PCR, Thiel M, Dambros M, Riccetto CLZ, Netto Jr NR. Utilização do Smart sling na incontinência urinária por deficiência esfinteriana. *Int Braz J Urol*. 2001d; 27(Suppl 1):111.
- 37) Fianu S, Soderberg G. Absorbable polyglactin mesh for retropubic sling operations in female urinary stress incontinence. *GynecolObstet Invest*. 1983; 16(1):45-50.
- 38) Sener S, Imperato JP, Blum MD, Ignatoff JM, Soper TG, Winchester DP, et al. Technique and complications of reconstruction of the pelvic floor with polyglactin mesh. *SurgGynecol Obstet*. 1989 Jun; 168(6):475-80.

- 39) Morgan JE. A sling operation, using Marlex polypropylene mesh, for treatment of recurrent stress urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol.* 1970 Feb; 106(3):369-77.
- 40) Bryans FE. Marlex gauze hammock sling operation with Cooper's ligament attachment in the management of recurrent urinary stress incontinence. *Am J Obstet Gynecol.* 1979; 133 (3):292-4.
- 41) Morgan JE, Farrow GA, Stewart FE. The Marlex sling operation for the treatment of recurrent stress urinary incontinence: a 16-year review. *Am J Obstet Gynecol.* 1985 Jan; 151(2):224-6.
- 42) Drutz HP, Buckspan M, Flax S, Mackie L. Clinical and urodynamic reevaluation of combined abdominovaginal Marlex sling operations for recurrent stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 1990 Jun; 1(2):70-3.
- 43) Palma PCR, Ikari O, D'Amico CAL, Netto Jr NR. Alça pubovaginal sintética no tratamento da incontinência urinária de esforço. *J Bras Urol.* 1992; 18(4): 202-4.
- 44) Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. *Hernia.* 1997 May; 1(1):15. 21.
- 45) Bobynd JD, Wilson GJ, MacGregor DC, Pilliar RM, Weatherly GC. Effect of pore size on the peel strength of attachment of fibrous tissue to porous-surfaced implants. *J Biomed Mater Res.* 1982 Sep; 16(5):571. 84.
- 46) Brun JL, Bordenave L, Lefebvre F, Bareille R, Barbié C, Rouais F, et al. Physical and biological characteristics of the main biomaterials used in pelvic surgery. *Biomed Mater Eng.* 1992 Winter; 2(4):203. 25.
- 47) Abdel-Fattah M, Sivanesan K, Ramsay I, Pringle S, Bjornsson S. How common are tape erosions? A comparison of two versions of the transobturator tension-free vaginal tape procedure. *BJU Int.* 2006 Sep; 98(3):594-8.
- 48) Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral sling materials. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2005 Jul; 6: 56-9.
- 49) Baessler K, Hewson AD, Tunn R, Quatawneh A, Maher CF. Intravaginal sling distress. *NeuroUrodyn.* 2003; 22:408.
- 50) Glavind K, Sander P. Erosion, defective healing and extrusion after tension-free urethropexy for the treatment of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2004 May-Jun; 15(3):179-82.

- 51) Siegel AL, Kim M, Goldstein M, Levey S, Ilbeigi P. High incidence of vaginal mesh extrusion using the intravaginal slingplasty sling. *J Urol*. 2005 Oct;174(4Pt 1):1308-11.
- 52) Bafghi A, Benizri EI, Trastour C, Benizri EJ, Michiels JF, Bongaina A. Multifilament polypropylene mesh for urinary incontinence: 10 cases of infections requiring removal of the sling. *BJOG*. 2005 Mar; 112(3):376-8.
- 53) Reisenauer C, Wallwiener D, Stenzl A, Solomayer FE, Sievert KD. Urethrovaginal fistula-a rare complication after the placement of a suburethral sling (IVS). *IntUrogynecol J PelvicFloorDysfunct*. 2006 Mar; 18(3):343-6.
- 54) Birch C, Fynes M. The role of synthetic and biologic prostheses in reconstructive pelvic floor surgery. *CurrOpinObstet Gynecol*. 2002 Oct; 14(5):527-35.
- 55) Ulmsten U, Falconer C, Johnson P, Jomaa M, Lanner L, Nilsson CG, Olsson I. A multicenter study of tension-free vaginal tape (TVT) for surgical treatment of stress urinary incontinence. *IntUrogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1998; 9(4):210-13.
- 56) Kuuva N, Nilsson CG. Long-term results of the tension-free vaginal tape operation in an unselected group of 129 stress incontinent women. *ActaObstetGynecol Scand*. 2006; 85(4):482-7.
- 57) Karram MM, Segal JL, Vassallo BJ, Kleeman SD. Complications and untoward effects of the tension-free vaginal tape procedure. *Obstet Gynecol*. 2003 May; 101(5 Pt 1):929-32.
- 58) Rodriguez LV, Raz S. Prospective analysis of patients treated with a distal urethral polypropylene sling for symptoms of stress urinary incontinence: Surgical outcome and satisfaction determined by patient driven questionnaires. *J Urol*. 2003 Sep; 170(3):857-63.
- 59) Kobashi KC, Govier FE. Management of vaginal erosion of polypropylene mesh slings. *J Urol*. 2003 Jun; 169(6):2242-3.
- 60) Levin I, Groutz A, Gold R, Pazner D, Lessing JB, Gordon D. Surgical complications and medium-term outcome results of tension-free vaginal tape: a prospective study of 313 consecutive patients. *NeurourolUrodyn*. 2004; 23(1):7-9.
- 61) Tsivian A, Kessler O, Mogutin B, Rosenthal J, Korczak D, Levin S, et al. Tape related complications of the tension-free vaginal tape procedure. *J Urol*. 2004 Feb; 171(2Pt 1):762-4.
- 62) Palma PCR, Dambros M, Riccetto CLZ, Thiel M, Netto Jr NR. The Ibero-American experience with a re-adjustable minimally invasive sling. *BJU Int*. 2005b Feb; 95(3):341-5.

- 63) Silveira ABFN, Fogiatto D, Kulak Jr. J, Busato D, Francisco JAF. SlingTransobturatório: resultados de um centro de uroginecologia em Curitiba no ano de 2004. *Rev Col Bras Cir.* 2007 Mar-Abr; 34(2):123-26.
- 64) Paterson-Beedle M, Kennedy JF, Melo FAD, Lloyd LL, Medeiros V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. *CarbohydrPolym.* 2000 Aug; 42(4):375-83.
- 65) Castro CMMB, Aguiar JLA, Melo FAD, Silva WTF, Marque E, Silva DB. Citotoxicidade de Biopolímero de Cana-de-açúcar. *AnFacMedUnivFed Pernamb.* 2004; 49(2):119-23.
- 66) Lima FR, Lima JRA, Hirakawa P, Medeiros Jr. MD, Lima FMT, Aguiar JLA. Resposta Inflamatória a membranas de biopolímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno implantadas no peritônio de ratos. *AnFac Med Univ Fed Pernamb.* 2005; 50(1):37-40.
- 67) Coelho MCO, Carrazoni PG, Monteiro VLC, Melo FAD, Mota RA, Tenorio Filho F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. *Acta Cir Bras.* 2001; 17 (Suppl. 1):11-3.
- 68) Silva DB, Aguari JLA, Marques A, Coelho ARB, Rolim Filho EL. Meringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar e fáscia autóloga em *Chinchillalaniger*. *AnFacMedUnivFed Pernamb.* 2006; 51(1):45-51.
- 69) Mayer DLB, Araújo JG, Leal MC, Caldas Neto SS, Ataíde RF, Mello RJV. Membrana do biopolímero da cana-de-açúcar: avaliação experimental na orelha média. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011 Jan- Fev; 77(1):44-50.
- 70) Cordeiro-Barbosa FA, Aguiar JLA, MMM Lira, Pontes Filho NT, Bernardino-Araújo S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *ArqBras Oftalmol.* 2012 Jul-Aug; 75(4):267-72.
- 71) Falcão SC, Coelho ARB, Neto JE. Biomechanical evaluation of microbial cellulose (*Zoogloea* sp.) and expanded polytetrafluoroethylene membranes as implants in repair of produced abdominal wall defects in rats. *Acta Cir Bras.* 2008 Apr; 23 (2):184-91.
- 72) Neves KVA, Aguiar JLA. Estudo histológico e teste de ruptura de suturas da parede abdominal com fios de biopolímero de cana de açúcar em ratos. Trabalho apresentado no 16º Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pernambuco; 2008; Recife, PE.
- 73) Aguiar JLA, Lins EM, Marques SRB, Coelho ARB, Rossiter RO, Melo RJV. Sugarcane biopolymer patch in femoral artery angioplasty on dogs. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(Suppl 1):77-81.

- 74) Medeiros Júnior MD, Carvalho EJA, Catunda IS, Bernardino-Araújo S, Aguiar JLA. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. *Acta Cir Bras*. 2013 Apr; 28(4):233-8.
- 75) Albuquerque PCVC, Aguiar JLA, Santos SM, Pontes Filho N, Mello RJV, Costa MLCR, et al. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. *Acta Cir Bra*. 2011 Oct; 26(5):383-6.
- 76) Carvalho Júnior AM, Santos MM, Barkokébas BB, Aguiar JLA, Lima SVC, Dambros M. Characterization of the deposition of collagen fibers and lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. *Int Braz J Urol*. 2012 Jul-Aug; 38(4):544-51.
- 77) Martins AGS, Lima SVC, Araújo LA, Vilar FO, Cavalcante NT. A wet dressing for hypospadias surgery. *Int Braz Urol*. 2013 May-Jun; 39(3):408-13.
- 78) Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg*. 2004 May; 187(5A):S11-6.
- 79) Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003 Jul; 83(3):835-70.
- 80) Clark RA. *The molecular and cellular biology wound repair*. 2nd ed. New York: Plenum Press; 1996.
- 81) Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005 Nov; 15(11):599-607.
- 82) Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther*. 1991 Dec; 52(3):407-22.
- 83) Low QEH, Drugea IA, Duffner LA, Quinn DG, Cook DN, Rollins BJ, Kovacs EJ, DiPietro LA. Wound healing in MIP-1 and MCP-1 mice. *Am J Pathol*. 2001 Aug; 159(2): 457-63.
- 84) Yildirim A, Basok EK, Gulpinar T, Gurbuz C, Zemheri E, Tokuc R. Tissue reactions of 5 sling materials and tissue material detachment strength of 4 synthetic mesh materials in a rabbit model. *J Urol*. 2005 Nov; 174(5):2037-40.
- 85) Riccetto CLZ, Thiel M, Palma PCR, Wroclaswski E, Fernandes R, Netto NR Jr. Modelo experimental para treinamento de sling minimamente invasivos em ovelhas. *Int Braz J Urol*. 2003; 29 (Suppl special): 323.
- 86) Riccetto CLZ. *Influência estrogênica na integração do enxerto de tecido adiposo autólogo periuretral: estudo experimental em coelhas [tese doutorado]*. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2000.

- 87) Novelli MD. Introdução de uma nova metodologia para análise morfológica através do processamento de imagens por computadores, com aplicação no ensino e na pesquisa [tese doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 1992
- 88) Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol.* 1996 May; 10(5):333-55.
- 89) Hunt JA, Williams DF. Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials.* 1995 Feb; 16(3):167-70.
- 90) Hetrick EM, Schoenfisch MH. Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials.* 2007; 28:1948. 56.
- 91) Krause HG, Galloway SJ, Khoo SK, Lourie R, Goh JT. Biocompatible properties of surgical mesh using an animal model. *Aust N Z J ObstetGynaecol.* 2006 Feb; 46(1):42-5.
- 92) Hanson D, Langemo D, Thompson P, Anderson J, Hunter S. Understanding wound fluid and the phases of healing. *Adv Skin Wound Care.* 200 Sep; 18(7):360-2.
- 93) Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell.* 1996 Jul; 30(1):23-38.
- 94) Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004; 6:41. 75.
- 95) Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater.* 2006 Mar; 1(1):R1-9.
- 96) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992 Jun; 267(16):10931-4.
- 97) Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: Possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010 Jun;12(2):188-96.
- 98) Rickert D, Moses MA, Kelch LS, Kelch S, Franke RP. The importance of angiogenesis in the interactions between polymeric biomaterials and surrounding tissue. *ClinHemorheolMicrocirc.* 2003; 28(3):175-81.
- 99) Staskin DR, Plzak L. Synthetic slings: pros and cons. *CurrUrol Rep.* 2002 Oct; 3(5):414-7.
- 100) Homsy CA, Kent JN, Hinds EC. Materials for oral implantation . biological and functional criteria. *JADA.* 1973;86(4):817-832.



Anexos

ANEXO 1. PROTOCOLO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS

1- Processar o material e corar em **Tricrômico de Masson** seguindo a técnica.

2- Usar o Programa **Image Pró Express** (versão 5.0) para capturar as imagens.

a. Fotografar* o material usando aumento de 400x (objetiva de 40x) sem polarização.

b. Clicar em **Digital capture** para capturar a imagem, **Review** para visualizar

c. Colocar na Resolução 2040x1536 (pixel);

d. Fazer o **Auto White Balance**;

e. **Snap** para fotografar e salvar a imagem.

3- Abrir o **Adobe Photoshop** (versão 6.0):

a. Abrir a imagem fotografada;

b. Utilizar a ferramenta **Varinha mágica** para selecionar todas as áreas que não estão coradas como colágeno;

c. **Delete** todo o campo selecionado anteriormente;

d. Usar a ferramenta **Borracha** para limpar o que ainda restou na imagem e que não é colágeno;

e. Salvar a imagem.

4- No programa **Image Pró-plus** (versão 4.5):

a. Ir em **Process** e clicar em **Segmentation**;

b. Selecionar a ferramenta de cor (conta gotas);

c. Em **Histogram Based** clicar no tom mais escuro da imagem e selecionar;

d. Fazer o **New Mask**;

e. Salvar a imagem.

5- Para finalizar, ainda no programa **Image Pró-plus** (versão 4.5), clicar em **Histogram** e arrastar a linha na direção da esquerda até o eixo **%** para calcular a área e a porcentagem de colágeno.

* Para fotografar foi usada a câmera Olympus DP70 acoplada ao microscópio ótico - Olympus BX 51.

ANEXO 2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: (51 31) 2124 8942 / 2124 8353
 Fax: (51 31) 2124 8386
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 17 de novembro de 2010.

Ofício nº 325/10
 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: Prof.: Arton Breno Figueiredo Nones da Silveira
 Departamento: Núcleo de Cirurgia Experimental – CCSUFPE
 Processo nº 23076.037579/2010-68

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"ESTUDO COMPARATIVO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E DA FIBROSE APÓS O IMPLANTE DE TELAS DE POLIPROPILENO MONOFILAMENTAR, COLA DE FIBRINA E BIOPOLÍMERO DE CANA-DE-AÇUCAR NO SUBCUTÂNEO DE RATAS ADULTAS."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação: Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar ; Sexo: feminino; Idade:adultas jovens; Nº de Animais previsto no projeto: 30 (trinta) ratas.

Atenciosamente,

Maria Inez Jansen