

**SINTHIA MARIA BENIGNO PUTTINI**

**Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido implantadas no espaço intraperitoneal. Estudo experimental em camundongos.**

Brasília – DF, 2006.

**SINTHIA MARIA BENIGNO PUTTINI**

**Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido implantadas no espaço intraperitoneal. Estudo experimental em camundongos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: **Medicina.**

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira.**

Faculdade de Medicina

Universidade de Brasília

Brasília-DF 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

PUTTINI, Sinthia Maria Benigno

**Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido implantadas no espaço intraperitoneal. Estudo experimental em camundongos.**

Sinthia Maria Benigno Puttini

Brasília, DF, 2006

79p.; 29 cm x 21 cm

Dissertação (Mestrado – Ciências Médicas)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Unitermos: 1-polipropileno; 2-PTFEe; 3-inflamação; 4-intraperitoneal  
5-imunohistoquímica

Dedico esta dissertação de mestrado a minha filha que surgiu em um momento de grande felicidade e foi a maior força para que esta tarefa fosse concluída com êxito.

## **Agradecimentos**

Ao Professor Paulo Gonçalves de Oliveira, meu orientador, pelo constante incentivo e aconselhamento e por acreditar na minha capacidade, fazendo com que esta grande oportunidade tivesse um final de sucesso.

Ao Professor Dr. André Luiz Vianna e Dr. Stenio Meirelles de Carvalho pelo apoio e incentivo que me forneceram em toda a minha carreira médica e cirúrgica.

À Professora Anamélia Lorenzetti Bocca, pelo constante apoio, sugestões e correções que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Professor Dr. Florêncio Figueiredo pela colaboração na avaliação histopatológica do experimento.

À Dra. Dunya Bachour, colega de mestrado e médica patologista, pelo auxílio fundamental nos momentos finais e cruciais com a avaliação dos resultados e confecção das fotomicrografias.

Aos funcionários do Labocien do UniCEUB, em especial ao Professor Carlos Cruz Júnior, por tornar possível a confecção de toda a parte experimental do estudo, desde o fornecimento dos animais até o ato cirúrgico e eutanásia.

Aos ex-alunos do curso de graduação da Medicina, Saulo e Thiago que participaram ativamente do experimento, com entusiasmo e determinação.

Aos funcionários do Laboratório LIB BIÓPSIA, onde ocorreu a preparação de todo o material que foi analisado, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, irmãos e marido, pela tolerância e compreensão para comigo agora e sempre.

Aos meus amigos e colegas pelo constante incentivo e apoio durante todas as fases de elaboração deste trabalho.

## RESUMO

As telas de polipropileno (PP) e politetrafluoretileno expandido (PTFEe) representam os biomateriais mais comumente utilizados no reparo de hérnias da parede abdominal. O implante de próteses modifica o processo de cicatrização. Além dos mecanismos celulares, vários mediadores químicos estão envolvidos no processo de reparo tecidual. Apesar da resposta inflamatória desencadeada pela presença de telas implantadas no espaço intraperitoneal já ter sido descrita, mediadores químicos envolvidos neste processo ainda não foram demonstrados. O objetivo do estudo foi avaliar a resposta inflamatória desencadeada pela presença destes biomateriais cirurgicamente implantados no espaço intraperitoneal de camundongos. Foram utilizados 32 camundongos isogênicos machos, distribuídos em 2 grupos: PP (implante de telas de PP) e PTFEe (implante de telas de PTFEe) e sacrificados no 5º, 10º, 20º e 30º dia de pós-operatório (DPO). Os fragmentos retirados foram preparados para análise histopatológica utilizando coloração Hematoxilina/Eosina e imunohistoquímica para demonstração de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), superóxido dismutase 1 (SOD1), ciclooxigenase 2 (COX2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8). As telas de PP determinaram reação cicatricial, com total integração da tela aos tecidos adjacentes, enquanto as telas de PTFEe determinaram intensa reação tipo corpo estranho, com encapsulamento da tela pelo tecido conjuntivo e células gigantes distribuídas em torno da tela. A reação inflamatória foi mais intensa no grupo PP nos parâmetros: neoformação vascular, edema, necrose e fibrose. A migração celular de macrófagos e polimorfonucleares foi mais intensa no grupo PTFEe com 5 dias e 10 dias respectivamente, mas com

30 dias, a presença destas células foi mais intensa no grupo PP. A expressão das enzimas iNOS, SOD1, COX-2 e das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-8 foi mais intensa no grupo PP em relação ao grupo PTFEe. As enzimas e citocinas estudadas estiveram presentes mesmo após 30 dias. A expressão de enzimas pró-inflamatórias no processo de cicatrização decorrente da presença de biomateriais sugere a presença de substâncias agressoras como radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e prostaglandinas que podem estar envolvidos nas complicações relacionadas ao uso de telas. A forte presença das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-8) com 30 dias sugere que o processo de inflamação persiste cronicamente e difere de acordo com o material implantado. Considerando os parâmetros utilizados neste estudo, a resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno cirurgicamente implantadas no espaço intraperitoneal de camundongos foi mais intensa que as telas de politetrafluoretileno expandido.

Unitermos: polipropileno, PTFEe, inflamação, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

Polypropylene and expanded polytetrafluoroethylene meshes represent the two most common biomaterials used in the repair of abdominal wall hernias. Prosthesis implanted into abdominal wall modify the scarring process. Beyond cellular mechanisms, chemical mediators are involved in the normal repair process. Although the inflammatory response to these biomaterials had been described, chemical mediators involved in this process have not been demonstrated yet. The aim of this study was to evaluate the inflammatory response to these biomaterials implanted into the abdominal wall of mice. Thirty two isogenic male mice were used, divided into two groups: PP (polypropylene mesh) and PTFEe (expanded polytetrafluoroethylene mesh). Each group of 4 animals were killed with 5, 10, 20 and 30 days after operation. Specimens of prosthesis and attached neoformed tissue were prepared for light microscopy using haematoxylin-eosin stain and immunohistochemical to identify the inducible nitric oxide synthase (iNOS), superoxide dismutase type 1 (SOD1), cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 8 (IL-8). The PP group showed total integration of the mesh to the tissue, occupying all the internodal spaces while the PTFEe group showed foreign body reaction with gigantic cells and the mesh appeared to be encapsulated by connective tissue. The inflammatory response was significantly more strong in the PP group about angiogenesis, edema, necrosis and fibrosis. The macrophage and polymorphonuclear migration was bigger in the PTFEe group with 5 and 10 days after operation, but with 30 days these cells were more pronounced in the PP group. iNOS, SOD1, COX-2, TNF- $\alpha$  and IL-8 were more pronounced in the PP

group. The enzymes and cytokines studied were expressed even after 30 days of the operation. The presence of pro-inflammatory enzymes in the scarring process to biomaterials suggest the presence of aggressive substances like reactive oxygen species, nitric oxide and prostaglandins that may be involved in the complications related to meshes. The strong presence of pro-inflammatory cytokines with 30 days after operation suggests that the inflammatory process persist chronically and is different according to the implanted material. In this study, the inflammatory response to polypropylene mesh implanted into the abdominal wall of mice was greater than that associated with PTFEe implantation.

Keywords: expanded polytetrafluoroethylene, polypropylene, inflammatory response, immunohistochemical.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES e TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 - Alojamento dos animais.....  | 21 |
| Figura 2 – Injeção intramuscular do composto ketamina/xilazina no membro inferior esquerdo do camundongo. ....  | 22 |
| Figura 3 – Fragmentos de 0,5x1,0cm das telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido a serem implantadas nos animais do estudo. 1 = politetrafluoretileno expandido; 2 = polipropileno.....  | 23 |
| Figura 4 – Implante do fragmento de tela de polipropileno na parede abdominal dos camundongos selecionados.....   | 23 |
| Figura 5 – Implante do fragmento de tela de politetrafluoretileno expandido na parede abdominal dos camundongos do grupo selecionado.....   | 24 |
| Figura 6 – Fotomicrografia corado pela técnica de HE, 40x, demonstrando o infiltrado inflamatório entre os poros da tela de polipropileno em contato íntimo com uma alça intestinal.....  | 30 |
| Figura 7 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pela presença das telas implantadas apresentando: Foto 1 – Denso infiltrado mono e polimorfonuclear no interior da tela de polipropileno no 5º DPO. Neoformação vascular já está presente. Foto 2 – Reação inflamatória no 10º DPO, com formação de células gigantes entre os poros da tela de polipropileno. Foto 3 – Infiltrado inflamatório do 5º DPO com intensa migração de polimorfonucleares e mononucleares desencadeado pela tela de PTFEe. Nota-se predomínio de mononucleares. Foto 4 – Distribuição ordenada das células gigantes e da resposta tipo corpo estranho ao redor da tela de PTFEe no 10º DPO. Foto 1, 3 e 4 – HE, aumento original de 200x, Foto 2 – HE, aumento original de 100x ..... | 37 |
| Figura 8 - Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - Diminuição do infiltrado polimorfonuclear e predomínio de mononucleares e neoformação vascular entre os poros da tela de polipropileno no 20º DPO. Foto 2 – Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, com células   |    |

gigantes e fibrose marcante entre os poros da tela de polipropileno no 30º DPO. Foto 3 – Predomínio do infiltrado mononuclear ao redor da tela de PTFEe no 20º DPO, porém de menor intensidade em relação aos períodos anteriores. Foto 4 – Escassa presença de células mononucleares ao redor da tela de PTFEe no 30º DPO. Fotos 1 e 2 – HE, aumento original de 100x, Fotos 3 e 4 – HE aumento original de 200x..... 38

Figura 9 - Encapsulamento da tela de PTFEe pelo processo inflamatório. HE 40x.....39

Figura 10 - Neoformação do peritônio em relação à tela de polipropileno. HE 100x.....39

Figura 11 - Fotomicrografia do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - moderada marcação da enzima superóxido dismutase 1 no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação leve no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação leve da enzima no grupo PTFEe no 5 e 30º DPO. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.....41

Figura 12 - Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pela presença das telas, apresentando: Foto 1 - intensa marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação moderada no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação leve da enzima no grupo PTFEe no 5 e 30º DPO respectivamente. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.....43

Figura 13 - Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - intensa marcação da enzima cicloxigenase 2 no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação moderada no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação intensa da enzima no grupo PTFEe no 5 e 30º DPO respectivamente. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x (foto 1, 2, e 3), aumento original de 100x (foto 4).....45

Figura 14 - Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - intensa marcação do fator de necrose tumoral alfa no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 – intensidade marcante do TNF- $\alpha$  no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 – marcante intensidade do TNF- $\alpha$  no grupo PTFEe no 5º DPO. Foto 4 – leve marcação da citocina no 30º DPO do grupo PTFEe. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.....47

|   |    |
|---|----|
| Figura 15 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 e 2 - intensa marcação da interleucina 8 do grupo polipropileno no 5o e 30o DPO respectivamente. Foto 3 – intensa marcação da interleucina no grupo PTFEe no 5o DPO. Foto 4 – intensidade marcante da IL-8 no 30o DPO do grupo PTFEe. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x..... | 48 |
| Gráfico 1 – Avaliação do edema nos grupos estudados.....  | 32 |
| Gráfico 2 – Avaliação da neoformação vascular nos grupos estudados.....   | 33 |
| Gráfico 3 – Avaliação da migração de polimorfonucleares nos grupos estudados.....   | 34 |
| Gráfico 4 – Avaliação da migração de monócitos nos grupos estudados.....  | 35 |
| Gráfico 5 – Expressão da enzima superóxido dismutase tipo 1 (SOD1) nos grupos estudados.....  | 40 |
| Gráfico 6 – Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos grupos estudados.....   | 42 |
| Gráfico 7 – Expressão da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) nos grupos estudados.....   | 44 |
| Gráfico 8 – Expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) nos grupos estudados.....   | 46 |
| Gráfico 9 – Expressão da interleucina 8 (IL-8) nos grupos estudados.....  | 46 |
| Tabela 1 – Anticorpos utilizados no experimento.....  | 28 |
| Tabela 2- Quantificação de Aderências do grupo polipropileno (PP) e do grupo Politetrafluoretileno expandido (PTFEe).....   | 31 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**PP:** polipropileno

**PTFEe:** politetrafluoretileno expandido

**iNOS:** óxido nítrico sintase induzida

**SOD1:** superóxido dismutase 1

**COX-2:** ciclooxigenase 2

**HE:** hematoxilina/eosina

**DPO:** dia de pós-operatório

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**NO:** óxido nítrico

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

**IL-1:** interleucina 1

**TNF- $\alpha$ :** fator de necrose tumoral alfa

**IL-8:** interleucina 8

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 6  |
| 2.1 <i>BIOMATERIAIS EM HÉRNIAS</i> .....                                  | 7  |
| 2.2 <i>RESPOSTA INFLAMATÓRIA RELACIONADA AO USO DE BIOMATERIAIS</i> ..... | 10 |
| 3. OBJETIVO.....  | 17 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 19 |
| 4.1 ANIMAIS.....  | 20 |
| 4.2 <i>PROCEDIMENTO OPERATÓRIO</i> .....                                  | 21 |
| 4.3 <i>ANÁLISE MORFOLÓGICA</i> .....                                      | 25 |
| 4.3.1 <i>MICROSCOPIA</i> .....  | 25 |
| 4.3.2 <i>IMUNOHISTOQUÍMICA</i> .....                                      | 26 |
| 4.4 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....                                      | 28 |
| 4.5 <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....                               | 28 |
| 5. RESULTADOS .....   | 29 |
| 5.1 <i>AVALIAÇÃO CIRÚRGICA E EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA</i> .....            | 30 |
| 5.2 <i>AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</i> .....                                | 32 |
| 5.3 <i>AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA</i> .....                              | 40 |
| 6. DISCUSSÃO .....  | 49 |
| 7. CONCLUSÕES .....   | 59 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                       | 61 |
| 9. ANEXOS .....   | 76 |

## **1. INTRODUÇÃO**

As hérnias da parede abdominal correspondem à protrusão de uma víscera, um órgão ou parte dele para fora da cavidade abdominal através de um defeito na parede músculo-aponeurótica, responsável pela contenção e estática visceral (EUBANKS, 2001).

As hérnias inguinais são as principais hérnias da parede abdominal e consomem vultosos recursos em cuidados com a saúde. Anualmente, são realizados mais de um milhão de reparos de hérnias inguinais no mundo, com custo elevado, representando importante problema para o cirurgião e os sistemas de saúde (KINGSNORTH, 2003).

As hérnias incisionais são outro tipo de hérnias da parede abdominal e correspondem a protrusões através de orifícios nesta parede que foram enfraquecidas por intervenções cirúrgicas prévias (NETO, 1997). Mais de 10% dos pacientes que necessitam de procedimento cirúrgico abdominal evoluem com hérnia incisional. Sendo assim, de 1,3 milhões de laparotomias realizadas anualmente nos Estados Unidos, 153.000 pacientes desenvolvem hérnias incisionais e um terço destes pacientes apresentará sintomas. A recorrência destas hérnias é o resultado adverso mais problemático que ocorre após o seu reparo, devido à complexidade do seu tratamento. (FLUM et al, 2003).

Apesar das várias opções técnicas desenvolvidas até o momento, nenhuma técnica de reparo de hérnias demonstrou-se superior para todos os pacientes (EUBANKS, 2001; DELIGIANNIDIS et al, 2002). Em muitos casos, as hérnias da parede abdominal não podem ser corrigidas por aproximação primária das bordas da camada músculo-aponeurótica, necessitando da colocação de um biomaterial. (KOLLER et al, 1997; DEYSINE, 1998).

O biomaterial pode ser definido como um implante que é colocado em contato com o tecido e tem como objetivo recompor alguma parte lesada ou auxiliar na sua recuperação. Pode agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluidos corpóreos, mesmo que localizado fora do corpo (PARK, 1979). Na prática do tratamento das hérnias, o biomaterial tem a finalidade de substituir ou reforçar a parede abdominal.

O uso de próteses no reparo de hérnias está cada vez mais difundido porque reduz substancialmente seus índices de recorrência (SHEEN, 2005). O reparo de hérnias inguinais com uso de telas está relacionado à redução do risco de recorrência entre 50% e 75% (GRANT, 2002). No âmbito das hérnias incisionais, as taxas de recidiva são maiores com o fechamento primário, (10% a 50%) quando comparadas ao uso de próteses (3% a 17%). Os melhores resultados para o tratamento de hérnias incisionais complexas são obtidos nos reparos com o uso de próteses. (GIANLUPI e TRINDADE, 2004; CASSAR e MUNRO 2002; LUIJENDICK, 2000). Nos Estados Unidos, mais de 90% dos pacientes com hérnias da parede abdominal são submetidos à correção com o uso de materiais protéticos (KINGSNORTH, 2003). Mundialmente, estima-se que um milhão de próteses são utilizadas todo ano (SCHEIDBACH, 2004).

Dos vários materiais disponíveis para uso na correção de hérnias, as telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido (PTFEe) são as mais freqüentemente utilizadas. A tela de polipropileno permanece macia e flexível, não é absorvida e não está sujeita à degradação ou enfraquecimento pela ação das enzimas do tecido. Proporciona adequada armação para a deposição de colágeno e incorporação aos tecidos adjacentes, além de ser de baixo custo (MORRIS e HUGHES, 1998; BÉLLON et al, 1997). As telas de PTFEe desencadeiam mínima

reação inflamatória e menor quantidade de aderências mesmo na presença de infecção (NAGY et al, 1996; CRISTOFORONI et al, 1996). Além disso, o material é macio, flexível e complacente e não estira com o tempo.

O implante de biomateriais resulta em injúria tecidual e promove uma reação inflamatória que, sem dúvida, é um fator importante envolvido no processo de cicatrização e nas complicações associadas ao seu uso (ANDERSON, 1988; KRAUSE et al, 1993; SAMLI et al, 2004).

Vários estudos experimentais demonstraram a resposta inflamatória e a formação de aderências desencadeadas pela presença de telas inabsorvíveis na parede abdominal (MURPHY et al, 1989; TYRREL et al, 1989; BLEICHRODT et al, 1993; BÉLLON et al, 1995; BÉLLON et al, 1996; BEETS et al, 1996; KLINGE et al, 1999; KAMA et al, 1999; KLINGE et al, 2002; SCHEIDBACH et al, 2004).

O processo cicatricial envolve uma complexa seqüência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual. Este processo caracteriza-se pela homeostase, inflamação, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. (HOWDIESHELL et al, 2003; SAMLI et al, 2004). Além dos mecanismos celulares, vários mediadores químicos estão envolvidos no processo de cicatrização tecidual. Durante a fase inflamatória, a migração de células como neutrófilos, linfócitos e macrófagos é fundamental para regular o processo de reparação, pois secretam citocinas, linfocinas e fatores de crescimento, que atuam como sinalizadores moleculares. Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas, aparecendo aproximadamente 24 horas após a lesão, com funções de fagocitose e debridamento. Os macrófagos migram ao local da ferida em cerca de 48 a 96 horas, tornando-se a população celular predominante antes da migração e

proliferação dos fibroblastos. Sua ação antimicrobiana ocorre devido à geração de radicais livres, como óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Uma importante contribuição dos macrófagos para o processo cicatricial é a secreção de citocinas e ativação de enzimas pró-inflamatórias, que ativam e recrutam outras células envolvidas no processo cicatricial como outros macrófagos e linfócitos, regulam a quimiotaxia e a proliferação de fibroblastos, promovem a síntese de colágeno, além de estimular a migração de células endoteliais, também envolvidas no processo de reparação tecidual. (COTRAN et al, 1994a; PARK e BARBUL, 2004).

Apesar de a resposta inflamatória desencadeada pela presença de telas implantadas no espaço intraperitoneal ter sido descrita por alguns autores, mediadores químicos como o óxido nítrico, enzimas pró-inflamatórias e antioxidantes e citocinas envolvidas neste processo ainda não foram demonstrados.

Sabendo que a presença de biomateriais modifica o resultado final do processo de cicatrização (BROWN et al, 1985) e que a resposta inflamatória está intimamente envolvida nas complicações relacionadas ao uso de telas, o presente estudo pretendeu aprofundar o conhecimento da reação inflamatória desencadeada pelo uso de telas implantadas no espaço intraperitoneal.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 BIOMATERIAIS EM HÉRNIAS

Desde o século passado, o índice de recidivas após operações para correção de hérnias da parede abdominal tem frustrado cirurgiões e despertado interesse pela busca de um biomaterial que pudesse substituir ou reforçar as fâscias aponeuróticas (DEBORD, 1998).

Já em 1890, BILLROTH expressava seu ideal de encontrar um material que substituísse as fâscias (apud DEBORD, 1998). Até mesmo os autores adeptos dos enxertos autólogos, homólogos e heterólogos reconheceram que biomateriais sintéticos são, muitas vezes, indispensáveis (DEBORD, 1998).

O primeiro material sintético feito pelo homem para a correção de defeitos da parede abdominal foi o fio de prata em forma de espiral. Foi utilizado por PHELPS (1894), para reforço do assoalho do canal inguinal (apud DEBORD 1998). Em 1940, BURKE et al (apud KOONTZ, 1948) introduziram a tela de tântalo, metálica, na correção destes defeitos. Este material metálico foi considerado como o melhor material sintético para correção de hérnias na época. No entanto, o sucesso no reparo de hérnias difíceis e a boa resistência a infecções não foram suficientes para a manutenção de seu uso, pois os materiais evoluíam com desgaste e fragmentação, levando ao seu progressivo abandono. (KOONTZ 1962; BERLINER, 1989, DEBORD, 1998).

Em 1952, BABCOCK (apud DEBORD, 1998) introduziu a tela de aço inoxidável, que foi aperfeiçoada por HAAS e RITTER para apresentar maior flexibilidade. Apesar dos bons resultados, o aço inoxidável é pouco utilizado nos dias atuais devido aos avanços nos métodos de diagnóstico por imagem, como a

ressonância nuclear magnética, pois o metal causa interferência na produção das imagens (apud DEBORD 1998).

Durante a década de 1950, inúmeros materiais sintéticos não metálicos foram testados quanto à possibilidade de serem utilizados como prótese e não causar problemas na presença de infecção. Dentre os materiais testados encontram-se: dacron, náilon, polietileno, teflon, polivinil, entre outros.

Em 1958, FRANCIS USHER introduziu a tela de polipropileno na prática cirúrgica para a correção de defeitos da parede abdominal e demonstrou a formação de tecido de granulação e completa cicatrização da ferida, mesmo na presença de infecção (USHER, 1958; USHER, 1959). Além disso, o implante da tela de polipropileno desencadeia reação inflamatória seguida pela deposição de uma camada fibrosa que cresce através dos poros da tela, incorporando assim a tela ao tecido adjacente. A descoberta da tela de polipropileno naquela década proporcionou um grande avanço no reparo das hérnias da parede abdominal sendo, até os dias atuais, o material sintético mais utilizado.

Desde então, materiais sintéticos vêm sendo utilizados com freqüência na prática clínica e têm como finalidade substituir ou reforçar a parede abdominal. As propriedades do material sintético “ideal” descritas por CUMBERLAND (CUMBERLAND, 1952) e SCALES (SCALES, 1953) incluem inércia química, ausência de reações alérgicas ou inflamatórias, ausência de carcinogenicidade, estabilidade, facilidade de manuseio, resistência, durabilidade, flexibilidade, baixo custo. Pesquisas são constantemente realizadas e novos materiais protéticos vêm sendo desenvolvidos, mas, até o presente momento, não existe material sintético que possua todas essas propriedades.

Existem mais de 80 tipos de biomateriais que podem ser utilizados no reparo de hérnias da parede abdominal. Dos materiais sintéticos inabsorvíveis que estão disponíveis para uso clínico, os mais freqüentemente utilizados são os derivados de polipropileno (Marlex®, Prolene®, Surgipro®) e politetrafluoretileno expandido (Gor-etex®, Trelex®). Dentre os materiais sintéticos absorvíveis, destacam-se os derivados do ácido glicólico (Dexon®) e da poliglactina (Vicryl®).

As telas de polipropileno (PP) disponíveis podem ser monofilamentares (Marlex®), bifilamentares (Prolene®) ou multifilamentares (Surgipro®). A tela de Marlex® foi a primeira tela de polipropileno descrita para correção de hérnias da parede abdominal e continua sendo o biomaterial mais utilizado (MORRIS e HUGHES, 1998).

As telas de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) são próteses sintéticas inabsorvíveis, flexíveis e microporosas. Foram inicialmente utilizadas na década de 1970 como enxertos vasculares sintéticos e somente em 1985 foi descrito o seu uso no reparo de hérnias (MORRIS e HUGHES, 1998).

As telas de PTFEe vêm ganhando popularidade devido à mínima reação inflamatória que desencadeiam, o que significa menor quantidade de aderências às vísceras intestinais mesmo na presença de infecção (NAGY et al, 1996; CRISTOFORONI et al, 1996). Atualmente é o segundo material mais utilizado para correção cirúrgica de hérnias depois do polipropileno (BÉLLON et al, 1997). A boa resistência a infecções foi demonstrada através de estudos em animais e humanos nos quais foi obtido sucesso no tratamento de infecções sem a retirada das próteses de PTFEe e, quando necessária, a remoção da prótese não apresentaria empecilho (GILLION et al, 1997).

Novos estudos vêm sendo publicados anualmente sobre o uso de próteses em correções de hérnias da parede abdominal, mas o consenso da literatura até o momento é que o biomaterial ideal ainda não existe.

## **2.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA RELACIONADA AO USO DE BIOMATERIAIS**

O implante de biomateriais promove uma resposta inflamatória que está envolvida no processo de cicatrização. A forma e topografia da prótese implantada determinam a composição da reação tecidual. Essa reação consiste basicamente da migração e ativação de macrófagos, formação de células gigantes na superfície do biomaterial, proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização (ANDERSON, 1988).

Alguns estudos mostraram que o comportamento nas primeiras horas dos biomateriais implantados pode refletir a possível integração, em longo prazo, de diferentes tipos de tela aos tecidos (BÉLLON et al, 2000).

A seqüência de eventos que ocorre após o implante de biomateriais na parede abdominal inicia-se em poucos minutos. Leucócitos migram para o local da prótese e se acumulam na tentativa de neutralizar o corpo estranho. Apesar da fagocitose destas células ser ineficiente em degradar a prótese, macrófagos coalescem e circundam todo o biomaterial. Reativações crônicas deste processo inflamatório podem ocorrer, o que explicaria as complicações em longo prazo (ZELLER, 1993).

Os macrófagos desempenham papel fundamental na resposta inflamatória desencadeada pela presença de próteses. Diferenciam-se a partir dos monócitos que migram da circulação sanguínea para os tecidos e tornam-se as células mais

envolvidas no processo inflamatório crônico e na resposta de cicatrização relacionada aos implantes (BRODBECK et al, 2002). Os biomateriais atuam como corpo estranho, ativando macrófagos e polimorfonucleares e provocando a chamada explosão respiratória. Esta reação produz metabólitos ativos do oxigênio, como íons superóxido e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que atuam como mediadores importantes da resposta imune celular (XIA e ZWEIER, 1997).

Macrófagos ativados produzem cinco vezes mais  $H_2O_2$  que macrófagos em repouso (LENINGHER, 1988). A explosão respiratória é benéfica no combate a agentes invasores como as bactérias, mas níveis elevados de radicais reativos do oxigênio podem ter efeitos negativos como lesão tecidual e complicações devido à reação inflamatória excessiva (SIES e GROOT, 1992). As células apresentam mecanismo de defesa contra os radicais livres. A maioria destas células possui enzimas que catalizam tais substâncias como superóxido dismutase (SOD), catalase e inúmeras peroxidases. Os radicais superóxido gerados pelas células inflamatórias, através da ação da oxidase, são catalizados em  $H_2O_2$  por diferentes tipos de SOD (STEILING et al, 1999).

As superóxido dismutases são a principal linha de agentes antioxidantes contra os radicais reativos do oxigênio (SIES e GROOT, 1992). Atualmente, são conhecidas três isoformas da enzima. A SOD1 é a enzima dependente de zinco e cobre (Cu/ZnSOD) e está localizada no citoplasma das células. A enzima dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) encontra-se dentro das mitocôndrias de células aérobias e a isoforma SOD3 (EC-SOD) está presente no meio extracelular, detectada no plasma, linfa e líquido (ZELKO et al, 2002).

Demonstrou-se que tanto a pele íntegra quanto a pele lesada expressam os genes das enzimas antioxidantes em quantidades variáveis. Lesões de pele

determinam maior expressão das enzimas MnSOD e Cu/ZnSOD mas seus valores retornam para níveis basais após 7 dias. Altos índices de radicais reativos do oxigênio em feridas cutâneas podem ser responsáveis pelo aumento dos níveis de SOD. (PEREIRA et al 1995; ZELKO et al, 2002). No entanto, ainda não existem estudos que demonstrem a presença de enzimas antioxidantes como as superóxido dismutases, no processo inflamatório desencadeado por telas sintéticas usadas no reparo de hérnias.

Além da explosão respiratória, macrófagos ativados pela presença de corpo estranho expressam a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), em altas doses, produzindo o óxido nítrico (XIA e ZWEIER, 1997). Esta molécula está envolvida no processo inflamatório (COTRAN et al, 1994a).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina, do oxigênio molecular e do NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido). Devido a sua meia vida curta, *in vivo*, o gás só atua em células muito próximas ao local onde é produzido. Esta atividade localizada explica a especificidade de suas ações. O NO produzido pelos macrófagos atua como um radical livre, com atividade citotóxica devido à oxidação de grupamentos sulfidríla nas proteínas, causando depleção do glutathion citossólico. Além disso, reage como o ânion superóxido e forma o oxidante dióxido de nitrogênio e o radical reativo hidroxila (SIES e GROOT 1992; COTRAN, 1994b).

Análise imunohistoquímica de tecido de granulação formado após o implante de silicone na parede abdominal demonstrou a presença de iNOS e sugeriu papel importante desta enzima na reparação dos tecidos e cicatrização de feridas (POLLOCK et al, 2001). Além disso, a produção de iNOS por macrófagos ativados por próteses ortopédicas foi demonstrada através de imunohistoquímica

e reação em cadeia de polimerase, e a sua presença pode ser fator importante na manutenção da reação inflamatória desencadeada pelas próteses (MOILLANEN et al, 1997). No entanto, ainda não foi demonstrada a presença de iNOS nos macrófagos ativados por telas sintéticas inabsorvíveis usadas no reparo de hérnias.

Além do óxido nítrico e dos radicais reativos do oxigênio, outras substâncias, como as prostaglandinas, estão envolvidas no processo inflamatório. Elas são produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico que, sob estímulo de patógenos e citocinas, são translocadas para o citoplasma das células por inúmeras fosfolipases  $A_2$ . O ácido araquidônico liberado pelas fosfolipases  $A_2$  são convertidos pelas cicloxigenases (COXs) através de um processo de duas etapas: a primeira refere-se à atividade da cicloxigenase, que acrescenta oxigênio molecular ao ácido graxo insaturado do ácido araquidônico gerando mediadores prostanóides (as prostaglandinas  $G_2$ ). Em seguida, as prostaglandinas são rapidamente convertidas em prostaglandinas  $H_2$  pela atividade das peroxidases (SMITH et al, 1996; DUBOIS et al, 1998). Existem duas isoformas de cicloxigenases, a COX-1, presente constitutivamente em vários tipos células; e a COX-2 que está ausente em condições basais mas é induzida por vários estímulos como citocinas produzidas por leucócitos em resposta a danos ou invasão microbiana, fatores de crescimento e lipopolissacárides (WU, 1995 e MAJIMA et al, 1997).

A COX-2 é fator importante na geração da inflamação e injúria tecidual (VANE et al, 1994; SEIBERT et al, 1994) devido à participação na produção dos mediadores prostanóides pró-inflamatórios, como algumas prostaglandinas e leucotrienos. Citocinas como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa

(TNF- $\alpha$ ) já foram detectados como indutoras da produção de COX-2, sendo que os macrófagos são os principais responsáveis pela expressão desta enzima nos processos inflamatórios (BELVISI et al, 1997; KHAN et al, 2000). Além da expressão da COX-2 em processos inflamatórios e de injúria tecidual, sua presença foi detectada em células endoteliais, fibroblastos e macrófagos envolvidos na reação tipo corpo estranho desencadeada por silicone e esponjas em modelos animais (MAJIMA et al, 1997; McLEAN et al, 2002). Observou-se também estímulo à angiogênese devido à expressão da COX-2 em tecidos vasculares neoformados e em granulomas de corpo estranho (MAJIMA et al, 1997; AMANO et al, 2002), mas não há relatos na literatura sobre a expressão da COX-2 pelas células envolvidas no processo inflamatório desencadeado pela presença de telas.

Além de enzimas, os macrófagos ativados produzem citocinas, que têm a função de modular outras células na resposta inflamatória. Na reação tipo corpo estranho desencadeada pela presença de materiais protéticos, as citocinas estão presentes como mediadores inflamatórios. As citocinas secretadas neste local determinam a resposta final (inflamação ou cicatrização). Estas citocinas podem ser divididas em duas categorias: Tipo Th1 e Tipo Th2. TNF- $\alpha$  e IL-1 são os principais representantes da classe Th1. O TNF- $\alpha$  é produzido predominantemente por macrófagos ativados e sua secreção pode ser estimulada por dano tecidual, endotoxinas ou pela presença de biomateriais. O TNF- $\alpha$  induz a expressão de outras citocinas e está envolvido na citotoxicidade celular, podendo induzir a apoptose, isto é, a morte celular programada (BRODBECK et al, 2002). O TNF- $\alpha$  pode ter efeito sobre a própria célula, efeito local, pela estimulação de células vizinhas e efeito sistêmico, agindo como hormônio. Quanto a sua atuação

no processo inflamatório, o TNF- $\alpha$  produz estimulação da aderência leucocitária, atividade pró-coagulante, estimulação da síntese de prostaglandinas e de citocinas pró-inflamatórias, fibrinogênese e estimulação da síntese de colágeno. No endotélio, induzem uma série de mudanças como a ativação do endotélio, aumento da produção de moléculas de adesão e mediadores químicos (citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, óxido nítrico), promovendo a marginação e migração dos leucócitos para o local da inflamação. (COTRAN et al, 1994a).

A maioria das operações induz resposta inflamatória e liberação de citocinas inflamatórias. A gravidade da reação é determinada pela intensidade da lesão. A presença de biomateriais associada ao trauma cirúrgico determina a ativação de TNF- $\alpha$ . Esta citocina ativa a produção de radicais livres e enzimas antioxidantes como as SODs, peroxidases e catalases (LOZANO et al, 2002).

DALU et al (2000) demonstraram que implante de polidimetilsiloxane estimulou a produção de TNF- $\alpha$  por período maior que o grupo controle, com pico de expressão da citocina com 14 dias, sendo detectada até 105 dias, mas o estudo da produção de TNF- $\alpha$  desencadeada por telas de polipropileno ou PTFEe ainda não foi descrito.

A interleucina 8 (IL-8) é uma interleucina que pertence a uma família de pequenas proteínas estruturalmente semelhantes, denominadas atualmente de quimiocinas e é um potente quimioativador de neutrófilos. É produzida por uma variedade de células como monócitos, linfócitos, células do endotélio ou epitélio e fibroblastos em resposta a diferentes estímulos. (ENGELHARDT et al, 1998; RENNEKAMPFF et al, 2000). Em estudo realizado em modelo de reparo de pele em humanos observou-se que IL-8 está presente no 1º dia após a injúria, relacionado à migração de polimorfonucleares, mas não foi detectada após 4 dias,

quando a migração celular é predominantemente mononuclear (ENGELHARDT et al, 1998).

XU et al (1999) determinaram a presença da IL-8 após o implante de osso no músculo de camundongos até três semanas. Observaram que a produção da IL-8 no 7º dia após o implante deveu-se aos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos e que a produção da citocina no 14º e 21º dia após o implante esteve relacionada a células gigantes, células endoteliais e mesenquimais. Assim como o TNF- $\alpha$ , a IL-8 ainda não foi estudada no processo inflamatório desencadeado por telas de polipropileno e PTFE implantadas no espaço intraperitoneal.

Possivelmente, o melhor conhecimento do papel dos mediadores químicos envolvidos neste processo poderá contribuir para o entendimento do comportamento biológico das próteses implantadas.

### **3. OBJETIVO**

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a resposta inflamatória desencadeada pela presença de telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido cirurgicamente implantadas no espaço intraperitoneal de camundongos isogênicos.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Avaliar e comparar a expressão de superóxido dismutase 1, óxido nítrico sintase induzida, cicloxigenase 2, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 8 pelo método de imunohistoquímica nos grupos estudados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

## 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 32 camundongos isogênicos, adultos, com três meses de vida, machos, da linhagem C57/BL6, com peso variando entre 20 e 30g, fornecidos pelo Biotério do Centro Universitário de Brasília – Brasília-DF. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos. No primeiro grupo foi utilizado tela de polipropileno – PP (Prolene® - Ethicon) e no segundo grupo tela de politetrafluoretileno expandido – PTFEe (Gor-etex® - Gore).

Os animais foram subdivididos em grupos de quatro, de acordo com a data do sacrifício. Grupo PP: 4 animais sacrificados no 5º dia de pós-operatório (DPO), 4 animais sacrificados no 10º DPO, 4 animais sacrificados no 20º DPO e 4 animais sacrificados no 30º DPO. Grupo PTFEe: 4 animais sacrificados no 5º DPO, 4 animais sacrificados no 10º DPO, 4 animais sacrificados no 20º DPO e 4 animais sacrificados no 30º DPO.

Os animais foram alojados no Biotério do Centro Universitário de Brasília, em ambiente conforme as diretrizes da COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), mantendo-se ciclo circadiano de 12h de claridade e 12h de escuridão, temperatura média de  $21 \pm 2$  °C, sem ruídos externos. Foram acondicionados em gaiolas individuais padronizadas, forradas com serragem e cobertas com tela de ferro inoxidável, recebendo ração específica para a espécie e água *ad libitum* até o procedimento (Figura 1). O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – Brasília (DF).



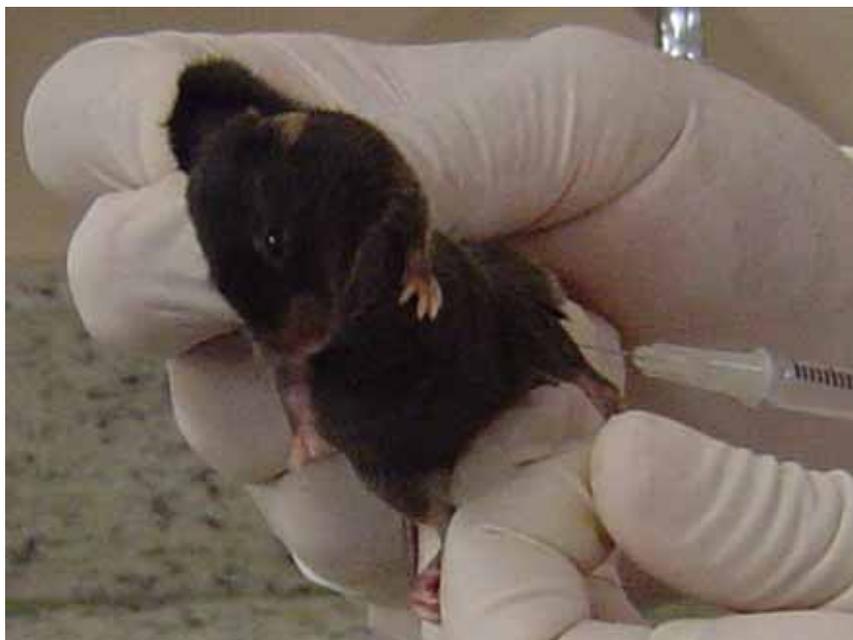
*Figura 1 – Alojamento dos animais*

Previamente ao estudo, foi realizado um projeto piloto nas mesmas condições do experimento atual, utilizando oito animais em cada grupo, com o intuito de treinamento na técnica operatória e no preparo para análise microscópica.

#### **4.2 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO**

Antes da operação, foi obedecido jejum de 6 horas, porém com livre acesso à água. A anestesia foi realizada com ketamina 50mg/Kg e xilazina 5mg/Kg, por via intramuscular (Figura 2). As doses utilizadas seguiram as normas de anestesia em animais de laboratório (CUNLIFFE-BEAMER e LES, 1987; WIXSON e SMILER, 1997). Previamente à anestesia foi aplicado 0,01ml de

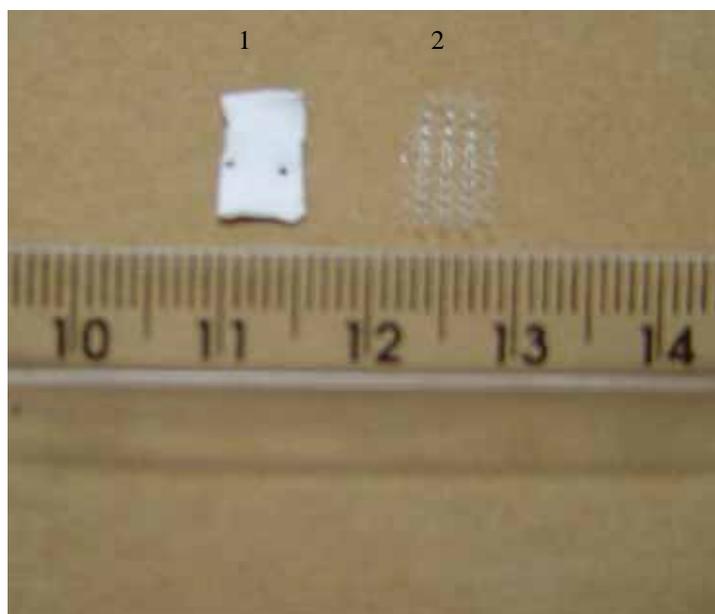
atropina a 1%, via subcutânea, a fim de reduzir os efeitos de hipersalivação decorrentes do uso da ketamina.



*Figura 2 – Injeção intramuscular do composto ketamina/xilazina no membro inferior esquerdo do camundongo.*

Após devidamente anestesiados, os camundongos foram colocados em prancha operatória em decúbito dorsal, fixando-se as patas nas extremidades da mesa. A anti-sepsia foi feita com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI-tópico). Realizada laparotomia mediana iniciada logo abaixo do apêndice xifóide e progredindo-se em sentido caudal por 3cm e envolvendo todas as camadas da parede abdominal. Fragmento de 0,5x1cm dos biomateriais foi implantado no espaço intraperitoneal (Figuras 3, 4, e 5). As próteses foram fixadas à camada músculo-aponeurótica com dois pontos de fio de polipropileno 5-0 (Prolene® - Ethicon) nas suas extremidades. A síntese da parede abdominal anterior foi realizada com sutura contínua de polipropileno 5-0 e a pele com sutura contínua de náilon 5-0

(Mononylon® - Ethicon). Não foi utilizado tratamento com antibióticos em nenhuma fase do experimento.



*Figura 3 – Fragmentos de 0,5x1,0cm das telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido a serem implantadas nos animais do estudo. 1 = politetrafluoretileno expandido; 2 = polipropileno.*



*Figura 4 – Implante do fragmento de tela de polipropileno na parede abdominal dos camundongos selecionados.*



*Figura 5 – Implante do fragmento de tela de politetrafluoretileno expandido na parede abdominal dos camundongos do grupo selecionado.*

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais devidamente identificadas, no mesmo local em que se encontravam no pré-operatório, sob as mesmas condições ambientais e com livre acesso a água e ração.

Os animais foram sacrificados nos 5<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup>, 20<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> DPO por deslocamento cervical.

As alterações macroscópicas avaliadas incluíram: presença/ausência de aderências, seroma, hematoma, infecção, abscessos, fistulas, obstrução.

As aderências foram classificadas como: 0 = ausente, 1 = mínimas e frouxas, 2 = moderadas e firmes.

O fragmento de tela implantado e o tecido circunjacente a ele foram excisados, em bloco, através de incisão retangular, excluindo as bordas onde foram fixados à camada músculo-aponeurótica com o fio de prolipropileno, e

preparados para análise morfológica e imunohistoquímica. Os fragmentos implantados foram colocados em solução de formalina 10% tamponada.

### **4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA**

#### **4.3.1 MICROSCOPIA**

Fragmentos do material englobando o tecido e a tela de cada um dos animais sacrificados foram fixados em formalina 10% durante 6 horas e, em seguida, passaram por um processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol. O material foi incluído em blocos de parafina e a seguir realizados cortes de 3 a 5 µm de espessura, utilizando um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Em seguida foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e re-hidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto ao 80%). Os cortes re-hidratados foram corados com hematoxilina e eosina, desidratados com concentrações crescentes de álcool (80% ao absoluto), lavados com xilol e cobertos com lamínulas.

O método de hematoxilina e eosina foi usado para observação da reação inflamatória, de acordo com a rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Laboratório de Imunopatologia de Brasília. Indicadores do processo inflamatório foram avaliados em microscopia de luz e classificados quantitativamente em: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (marcante) e 4 (intenso).

### **4.3.2 IMUNOHISTOQUÍMICA**

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomos com 4 a 5 micras de espessura, colocados em lâminas de histologia previamente preparadas com poli-L-Lisina.

As lâminas foram limpas com uma solução de álcool-éter, secas e nelas foi aplicada uma fina camada da solução de poli-L-Lisina deixando-se secar naturalmente. Em seguida, os cortes foram colocados nas lâminas e levados para a estufa a 50°C para melhor fixação à lâmina. As lâminas foram devidamente acondicionadas em caixas, separadas umas das outras com papel de seda até que se procedesse às reações de imunohistoquímica.

Cortes de 5µm de biópsias previamente selecionadas foram desparafinizadas em estufa a 50°C por 20 minutos seguido por 3 incubações em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os tecidos foram re-hidratados em graduação de álcoois, colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e soro albumina bovina (BSA) 1 %. Os cortes foram então tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 vol.) a 3% em metanol por 30 minutos para o bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente, os cortes foram re-hidratados em bateria crescente de álcoois (95%, 70% e 50%) e lavados 3 vezes em PBS + BSA 1%.

Em seguida procedeu-se a digestão enzimática empregando-se tripsina a 0,1 % (No. T- 8128, Sigma) em PBS por 30 minutos a 37°C.

Após banho das lâminas em PBS+BSA a 1% (3 vezes), os sítios protéicos inespecíficos de ligação do anticorpo primário foram bloqueados com proteína-soro de leite a 3% (leite em pó desnatado Molico) em água destilada por 20

minutos e então incubadas 12 a 16 horas a 4°C com os anticorpos primários monoclonais específicos em diferentes títulos (Tabela 1) por um período de 12 a 16 horas. Os cortes foram lavados em PBS + BSA 1% (3 vezes) e incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo produzido em cabra (No. Z-420, Dako) numa diluição de 1:200 por 30 minutos à temperatura ambiente. Após remoção do excesso desse anticorpo com 3 banhos em PBS + BSA a 1%, os cortes foram incubados com o complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP) de camundongo (No. P 850, Dako) à diluição de 1:75 por 30 minutos à temperatura ambiente, seguidos por 3 banhos em PBS + BSA a 1%.

Para a revelação dos sítios antigênicos, utilizou-se o substrato DAB (3,3 - Diaminobenzidina No. D 5637, Sigma Chemical Co) a 0,5% em PBS, acrescentando-se 180 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 20 vol. para cada 10 ml da solução deixando-se as lâminas por 10 minutos no escuro. Após o controle da intensidade da coloração da reação ao microscópio, a mesma foi interrompida com água destilada. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, também controlando-se a coloração e interrompida com água destilada e azulando-se os núcleos celulares com hidróxido de amônio a 0,5% por 1 a 2 segundos e interrompendo-se novamente com água destilada. Os cortes foram então desidratados em 3 banhos de álcoois 95% e 3 banhos de álcoois absolutos, diafanizados em 3 banhos de xilóis e as lâminas montadas em meio permanente (Entellan).

Cortes selecionados foram analisados por imunohistoquímica para demonstração da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), superóxido dismutase 1 (SOD1), ciclooxigenase 2 (COX-2), Fator de Necrose Tumoral alfa

(TNF- $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8) e classificados quantitativamente em: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado), 3 (marcante) e 4 (intenso).

*Tabela 1 – Anticorpos utilizados no experimento*

| <b>Anticorpos</b>                            | <b>Diluição</b> | <b>Clone</b> | <b>Código</b> | <b>Fabricante</b>         |
|--|-----------------|--------------|---------------|---------------------------|
| Policlonais de camundongo anti-iNOS humano   | 1:100           | C-20         | SC652         | Santa Cruz Biotechnology, |
| Policlonais de coelho anti-SOD humano        | 1:100           |              |               | Santa Cruz Biotechnology  |
| Monoclonais de camundongo anti-COX-2         | 1:100           | C-16         | SC1381        | Santa Cruz Biotechnology  |
| Monoclonais de camundongo anti-TNF- $\alpha$ | 1:75            | C-20         |               | Santa Cruz Biotechnology  |
| Monoclonais de camundongo anti-IL-8          | 1:250           | C-20         | SC988         | Santa Cruz Biotechnology  |

#### **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram analisados do ponto de vista estatístico utilizando-se o teste U de Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ) (SIEGEL, 1975).

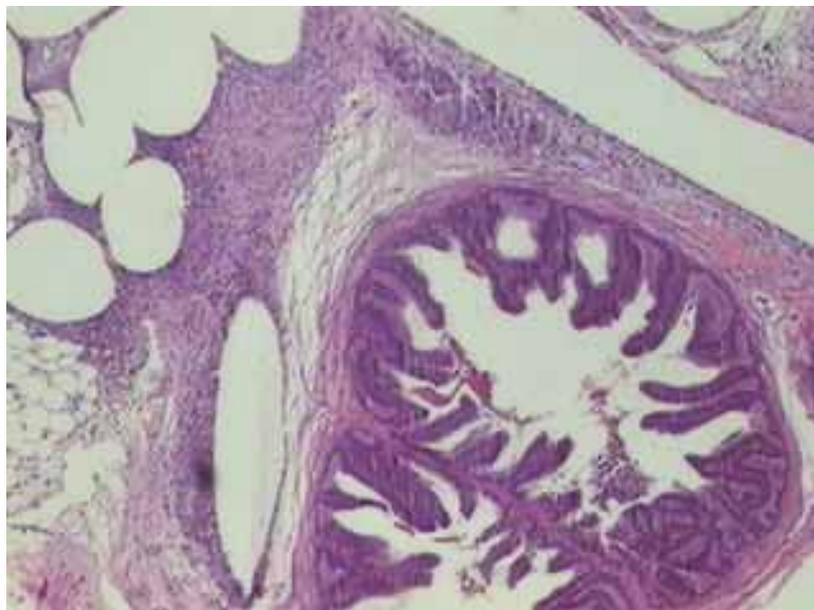
#### **4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

As citações seguiram as normas da Associação Brasileira de Normas e Técnicas (ABNT)

## **5. RESULTADOS**

## 5.1 AVALIAÇÃO CIRÚRGICA E EVOLUÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Os 16 camundongos do grupo polipropileno (PP) evoluíram sem intercorrências no pós-operatório, com boa recuperação cirúrgica e disponibilidade para alimentação. Nenhum camundongo apresentou deiscência da pele ou da camada músculo-aponeurótica, sinais de infecção local ou sistêmica, extrusão ou deslocamento do biomaterial implantado, abscesso ou peritonite intra-abdominal. A tela aderiu satisfatoriamente à camada músculo-aponeurótica e somente três animais apresentaram aderências (Figura 6), sendo 2 animais do grupo sacrificado com 20 dias e 1 animal do grupo sacrificado com 30 dias (Tabela 2). Não foi observado fístula estercoral ou obstrução intestinal em nenhum dos animais.



*Figura 6 – Fotomicrografia corada pela técnica de HE, 40x, demonstrando o infiltrado inflamatório entre os poros da tela de polipropileno em contato íntimo com uma alça intestinal.*

Todos os camundongos do grupo politetrafluoretileno expandido (PTFEe) evoluíram satisfatoriamente no pós-operatório, com boa recuperação cirúrgica e disponibilidade para alimentação. Nenhum camundongo apresentou deiscência da pele ou da camada músculo-aponeurótica, sinais de infecção local ou sistêmica, extrusão ou deslocamento do biomaterial implantado, abscesso ou peritonite intra-abdominal. Nos grupos sacrificados com mais de 10 dias a tela apresentava-se bem incorporada ao tecido adjacente. Dois animais apresentaram apenas aderências frouxas com as vísceras intra-abdominais (Tabela 2). Nenhum animal apresentou aderências firmes, fístula estercoral ou obstrução intestinal.

*Tabela 2- Quantificação de Aderências do grupo polipropileno (PP) e do grupo Politetrafluoretileno expandido (PTFEe)*

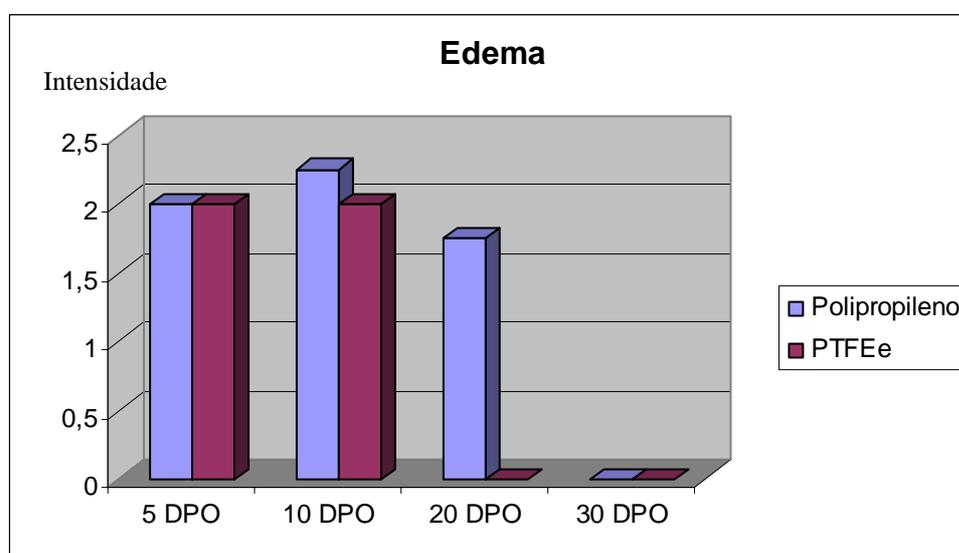
| <b>Grupo Polipropilneo</b> |                  |               |                  | <b>Grupo politetrafluoretileno expandido</b> |                  |               |                  |
|----------------------------|------------------|---------------|------------------|--|------------------|---------------|------------------|
| <b>Animal</b>              | <b>Aderência</b> | <b>Animal</b> | <b>Aderência</b> | <b>Animal</b>                                | <b>Aderência</b> | <b>Animal</b> | <b>Aderência</b> |
| 1(5d)                      | 0                | 9(20d)        | 2                | 17(5d)                                       | 0                | 25(20d)       | 0                |
| 2(5d)                      | 0                | 10(20d)       | 0                | 18(5d)                                       | 0                | 26(20d)       | 1                |
| 3(5d)                      | 0                | 11(20d)       | 2                | 19(5d)                                       | 0                | 27(20d)       | 0                |
| 4(5d)                      | 0                | 12(20d)       | 0                | 20(5d)                                       | 0                | 28(20d)       | 0                |
| 5(10d)                     | 0                | 13(30d)       | 1                | 21(10d)                                      | 0                | 29(30d)       | 1                |
| 6(10d)                     | 0                | 14(30d)       | 0                | 22(10d)                                      | 0                | 30(30d)       | 0                |
| 7(10d)                     | 0                | 15(30d)       | 0                | 23(10d)                                      | 0                | 31(30d)       | 0                |
| 8(10d)                     | 0                | 16(30d)       | 0                | 24(10d)                                      | 0                | 32(30d)       | 0                |

5d = 5º DPO (dia de pós-operatório), 10d = 10º DPO, 20d = 20º DPO, 30d = 30º DPO.  
0=ausência de aderências, 1=aderências frouxas, 2=aderências firmes.

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram avaliados quanto ao edema, hemorragia, ulceração, necrose, migração de polimorfonucleares, migração de células mononucleares, neoformação de vasos, tecido de granulação e fibrose.

Gráfico 1 – Avaliação do edema nos grupos estudados



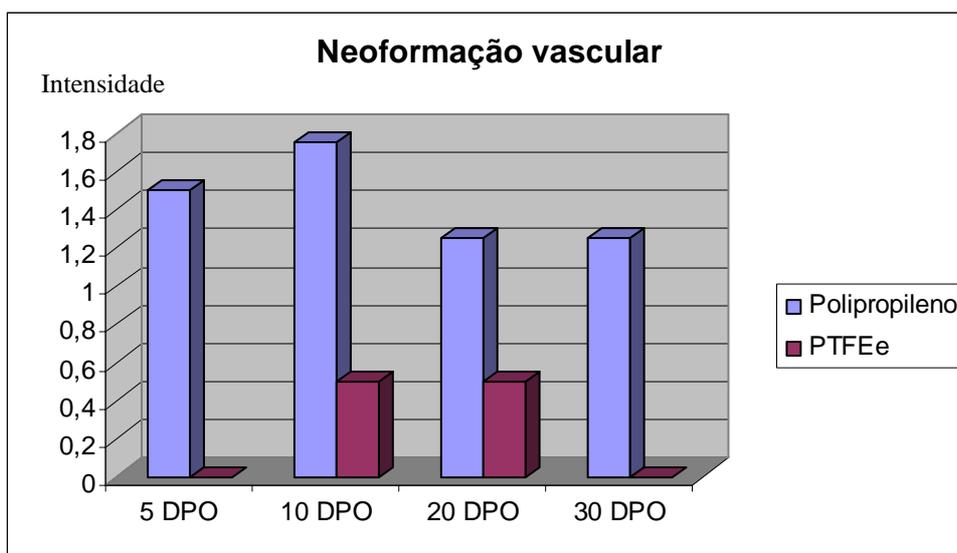
DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido

O edema foi caracterizado pelo espessamento do tecido conjuntivo formado na reação tipo corpo estranho e esteve presente de forma moderada nos animais do grupo PP do 5º ao 20º DPO e no grupo PTFEe, o edema se estendeu apenas até o 10º DPO (Gráfico 1), sendo que no 20º DPO houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,02$ ).

A hemorragia foi um aspecto detectável em intensidade mínima em 2 animais do 5º DPO do grupo PP e em 1 animal do grupo PTFEe no mesmo período. Necrose foi observada apenas no grupo PP no período inicial da

avaliação (5º DPO) em leve intensidade, mas com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,04$ ).

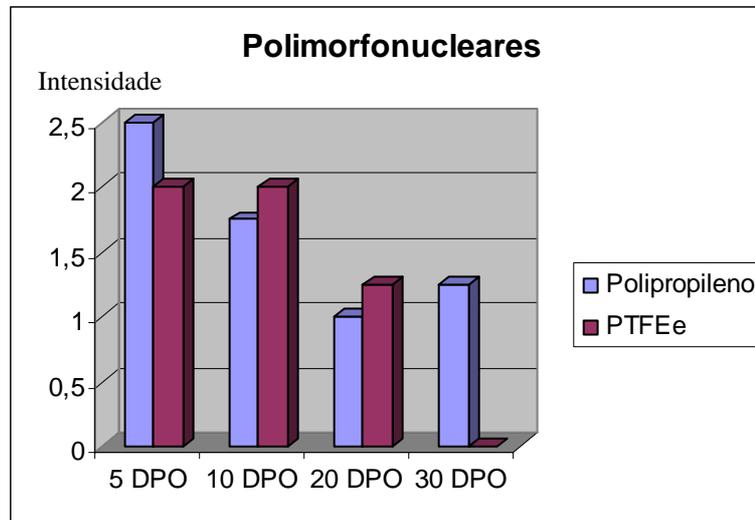
Gráfico 2 – Avaliação da neoformação vascular nos grupos estudados



DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido

A neoformação vascular ocorreu desde o início no grupo PP e persistiu em todo o período estudado (do 5º ao 30º DPO). No caso do grupo PTFEe, a neovascularização foi menos acentuada e não esteve presente em todo o período estudado, apenas no 10º e 20º DPO (Gráfico 2). Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no 5º, 10º e 30º DPO, sendo  $p=0,02$ .

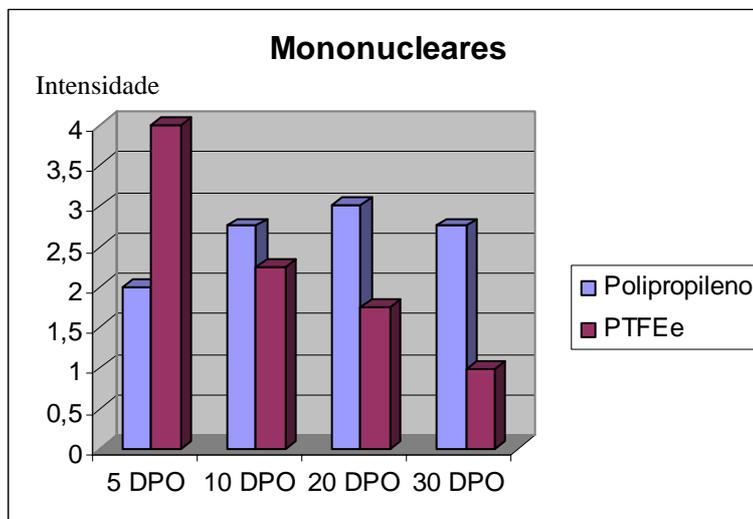
Gráfico 3 – Avaliação da migração de polimorfonucleares nos grupos estudados



DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido

Quanto à migração de polimorfonucleares, observou-se que no grupo PP, a migração foi intensa no 5º DPO, diminuiu nos demais períodos avaliados, mas persistiu até o 30º DPO. No grupo PTFEe, a presença dos polimorfonucleares foi semelhante ao grupo PP no 5º, 10º e 20º DPO. No 30º DPO detectou-se a presença de polimorfonucleares apenas no grupo PP, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,02$ ) (Gráfico 3).

Gráfico 4 – Avaliação da migração de monócitos nos grupos estudados



DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido

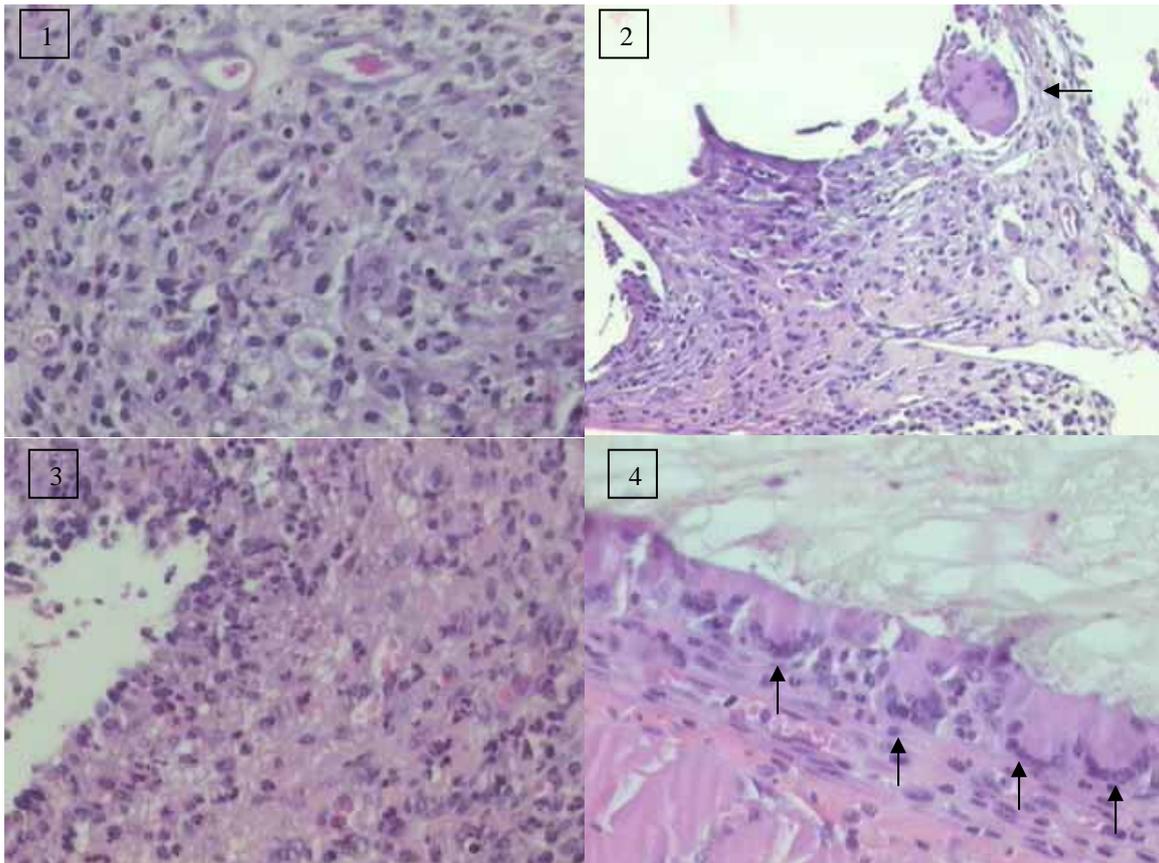
A migração de mononucleares no grupo PP ocorreu em todo o período estudado, com células do 5º ao 30º DPO em intensidade moderada. No grupo PTFEe, a migração no 5º DPO foi intensa, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PP ( $p=0,02$ ). Houve redução gradual nos demais períodos sendo que no 20º e 30º DPO a presença de mononucleares foi significativamente menor em relação ao grupo PP ( $p=0,02$ ) (Gráfico 4).

Fibrose esteve presente no 30º DPO do grupo PP, com intensidade marcante e com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ), em relação ao grupo PTFEe, que apresentou fibrose leve em apenas 2 animais. Tecido de granulação foi detectado no grupo PTFEe no período de 30 dias, com intensidade leve em apenas um animal.

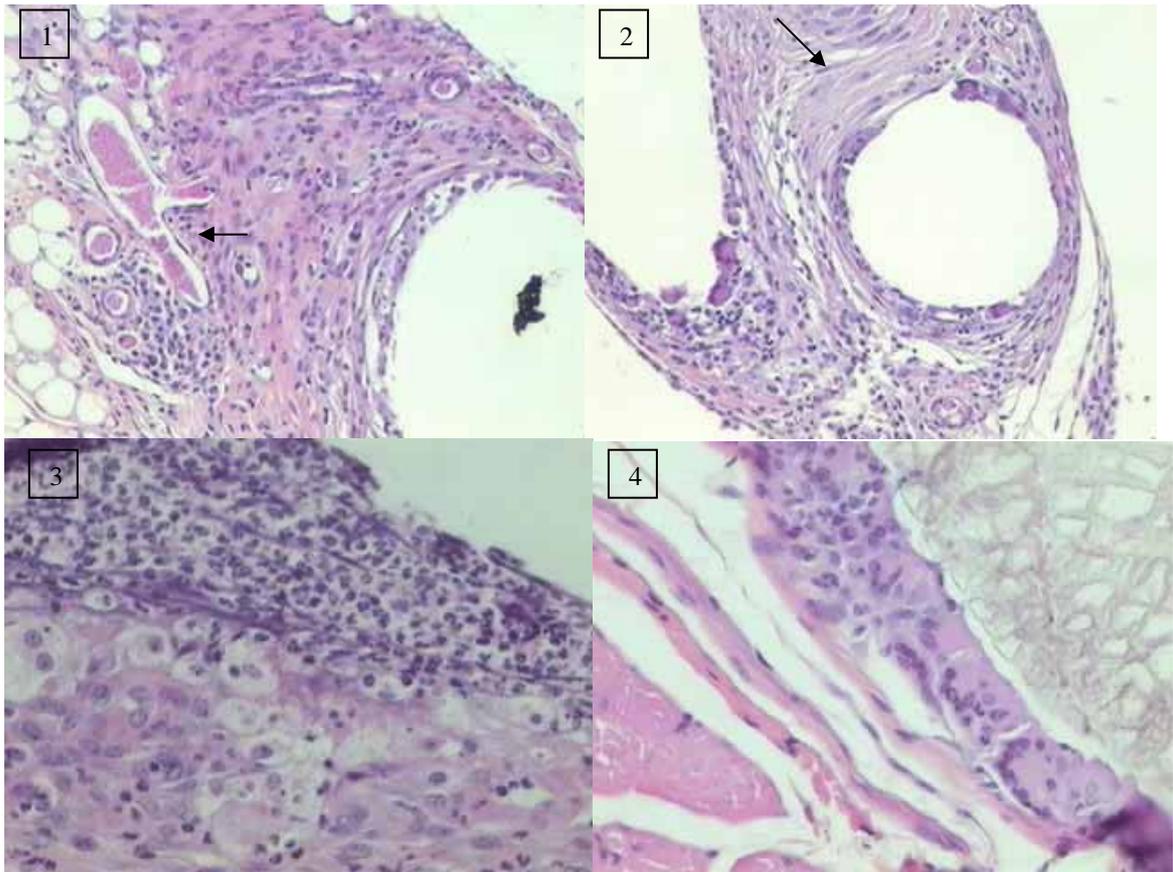
Além da presença de células e da caracterização do processo inflamatório envolvido, o estudo permitiu determinar a cinética deste processo (Figuras 7 e 8). No grupo PP observou-se que o edema do tecido conjuntivo começa já nos primeiros dias e não foi mais encontrado no final, quando se observou a formação

de tecido conjuntivo denso e fibrose, distribuídos aleatoriamente entre os poros da tela. A migração de monócitos e polimorfonucleares ocorreu desde os primeiros dias e diminuiu gradativamente com o tempo. A presença de mononucleares foi mais intensa do que os polimorfonucleares após os 10 primeiros dias, com formação de células gigantes distribuídas de forma aleatória ao redor e dentro da tela. Com 30 dias a quantidade de células detectadas foi pequena e constituída basicamente de macrófagos. A neoformação vascular que se iniciou de maneira uniforme pela tela desde o início do estudo, se manteve até o 30º DPO.

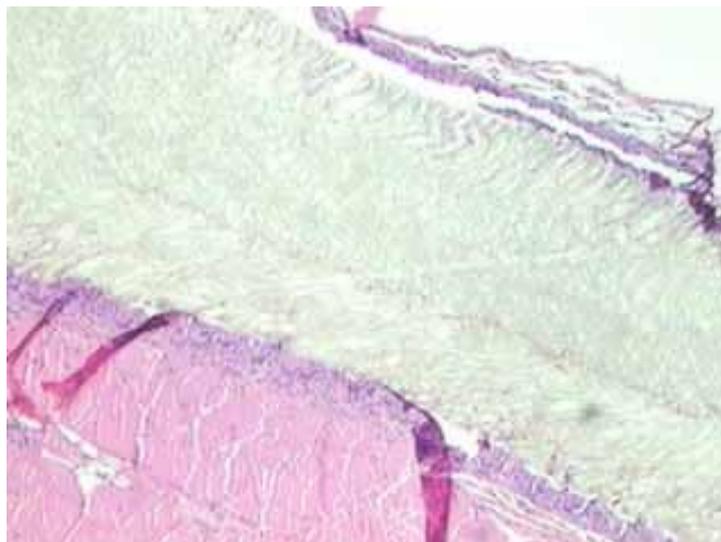
As telas de PTFEe determinaram processo inflamatório diferente em relação às telas de polipropileno. Inicialmente a tela de PTFEe promoveu uma reação que envolveu a tela, encapsulando-a (Figura 9). Não se observou processo inflamatório no interior das telas de PTFEe. Além disso, o processo inflamatório foi menos intenso em relação às telas de polipropileno, mas a reação tipo corpo estranho foi mais intensa do que no grupo PP (Figura 7). O edema esteve presente somente até o 10º DPO. A quantidade de células polimorfonucleares e mononucleares foi maior no início e distribuídas em torno da tela, e não inseridas no seu interior, como nas telas de PP. Os macrófagos também representaram as células mais importantes no processo inflamatório que se desenvolveu e a formação de células gigantes foi mais marcante. A neoformação vascular esteve presente em menor intensidade e por período de tempo mais curto em relação às telas de polipropileno, caracterizando a reduzida inflamação que este biomaterial desencadeou.



*Figura 7 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pela presença das telas implantadas apresentando: Foto 1 – Denso infiltrado mono e polimorfonuclear no interior da tela de polipropileno no 5º DPO. Neoformação vascular já está presente. Foto 2 – Reação inflamatória no 10º DPO, com formação de células gigantes entre os poros da tela de polipropileno. Foto 3 – Infiltrado inflamatório mono e polimorfonucleares no 5º DPO desencadeado pela tela de PTFEe. Foto 4 – Distribuição ordenada das células gigantes e da resposta tipo corpo estranho ao redor da tela de PTFEe no 10º DPO. Setas: células gigantes. Foto 1, 3 e 4 – HE, aumento original de 200x, Foto 2 – HE, aumento original de 100x.*

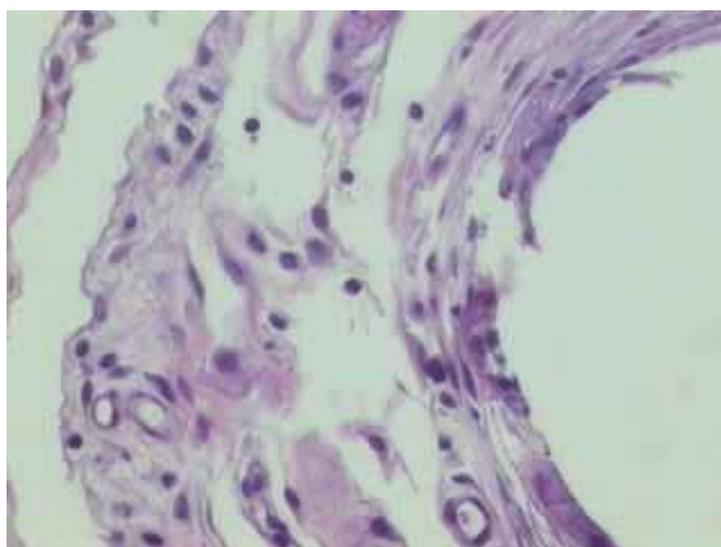


*Figura 8 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - Diminuição do infiltrado polimorfonuclear, predomínio de mononucleares e neoformação vascular (seta) entre os poros da tela de polipropileno no 20º DPO. Foto 2 – Infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, com células gigantes e fibrose marcante entre os poros da tela de polipropileno no 30º DPO (seta). Foto 3 – Predomínio do infiltrado mononuclear ao redor da tela de PTFEe no 20º DPO, porém de menor intensidade em relação aos períodos anteriores. Foto 4 – Escassa presença de células mononucleares ao redor da tela de PTFEe no 30º DPO. Fotos 1 e 2 – HE, aumento original de 100x, Fotos 3 e 4 – HE aumento original de 200x.*



*Figura 9 - Encapsulamento da tela de PTFEe pelo processo inflamatório. HE 40x.*

Observou-se também que a presença dos biomateriais determinou a neoformação de peritônio. A distribuição do peritônio neoformado ocorreu de forma irregular no grupo PP, enquanto esta distribuição foi paralela e ordenada no grupo PTFEe. A irregularidade na neoformação do peritônio no grupo PP esteve relacionada à presença de hemorragia e necrose, porém de leve intensidade e não esteve relacionada à aderência de alças intestinais (Figura 10).



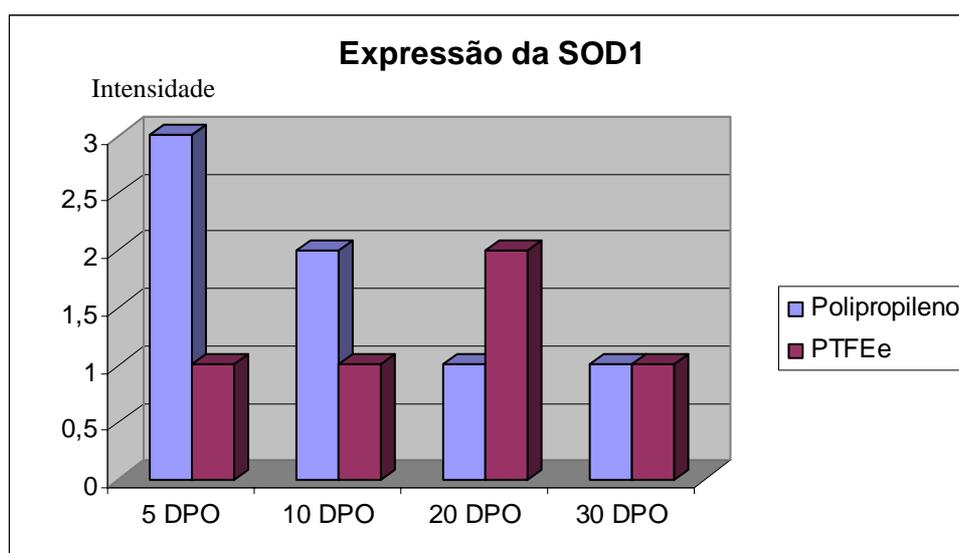
*Figura 10 – Neoformação do peritônio em relação à tela de polipropileno. HE 100x.*

### 5.3 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

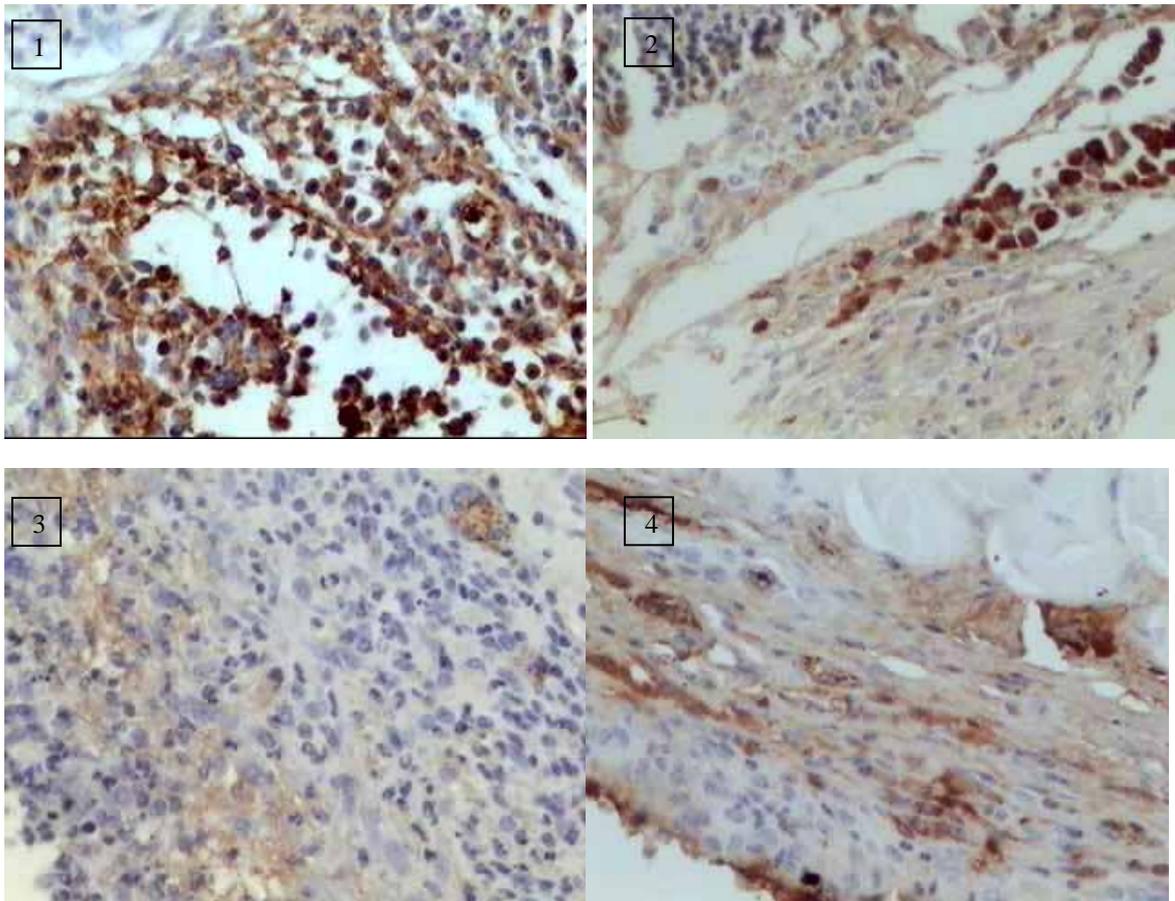
A imunohistoquímica avaliou a presença das enzimas superóxido dismutase 1 (SOD1), óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e cicloxigenase 2 (COX2) e das citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 8 (IL-8).

Observou-se uma forte expressão da SOD1 no grupo PP no 5º DPO e moderada no 10º DPO, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,02$ ) nos dois períodos. No grupo PTFEe, a expressão foi leve, mas presente em todos os períodos. A expressão no 20º DPO foi mais intensa neste grupo que no grupo PP, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ). No 30º DPO, a expressão da enzima foi semelhante nos dois grupos (Gráfico 5, Figura 11).

Gráfico 5 – Expressão da enzima superóxido dismutase tipo 1 (SOD1) nos grupos estudados.



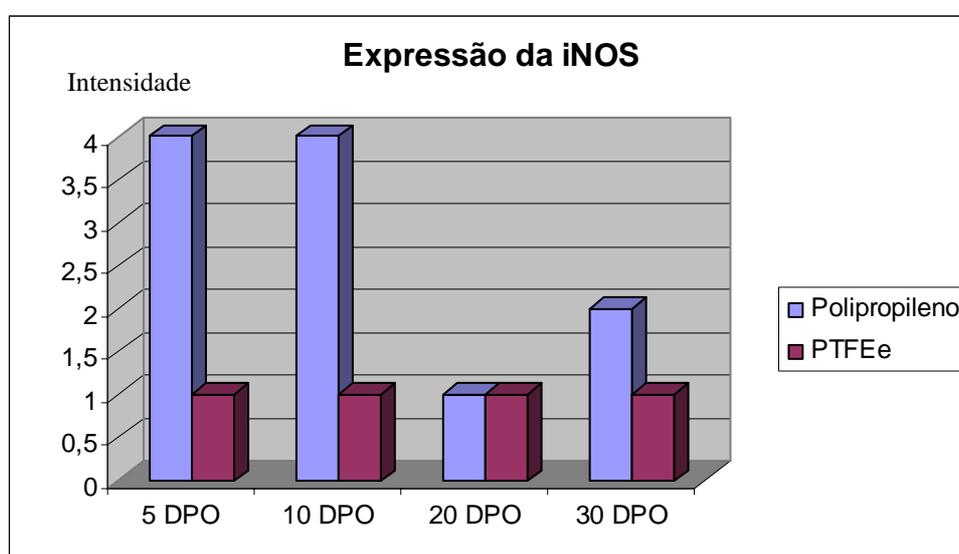
DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido



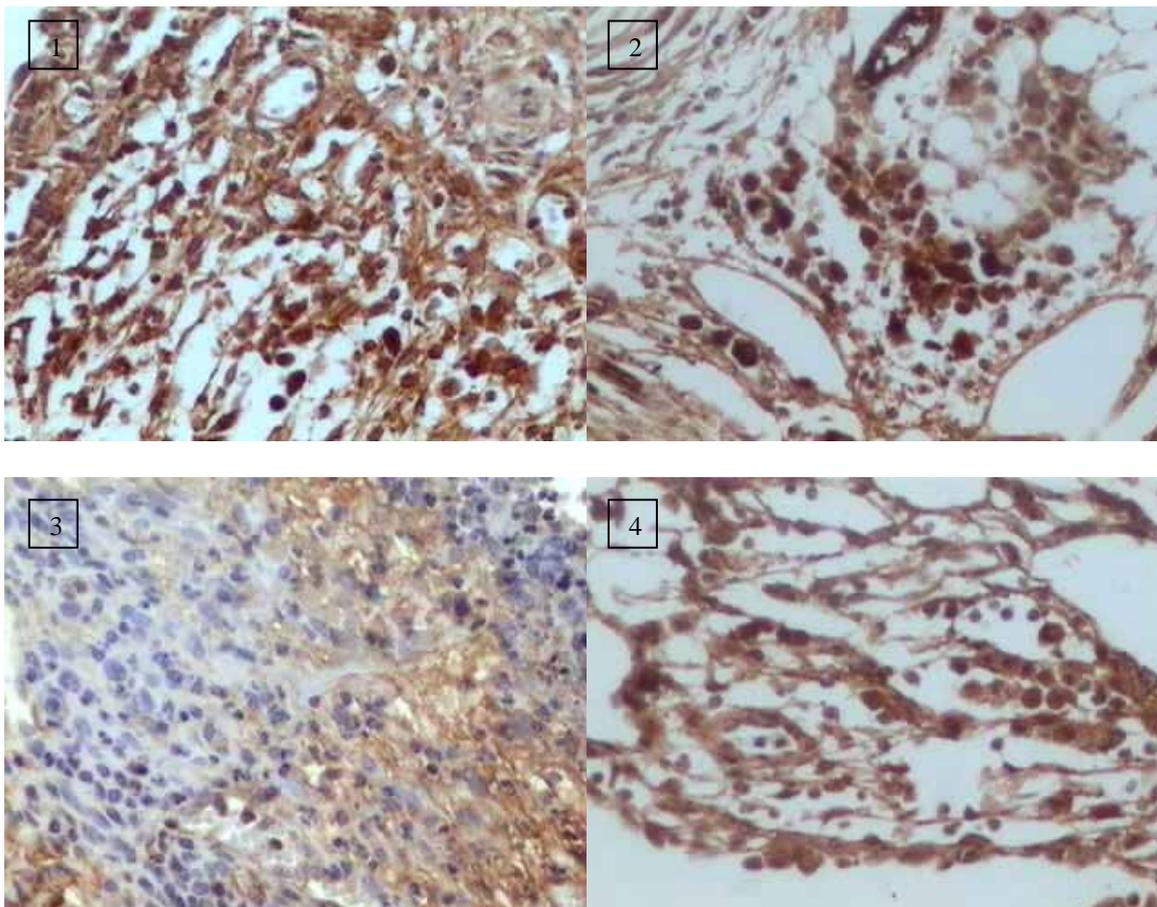
*Figura 11 – Fotomicrografia do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - moderada marcação da enzima superóxido dismutase 1 no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação leve no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação leve da enzima no grupo PTFEe no 5º e 30º DPO respectivamente. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.*

A expressão da iNOS foi maior no grupo PP em relação ao grupo PTFEe, com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos no 5º, 10º e 30º DPO ( $p=0,02$ ). A expressão da enzima no grupo PTFEe foi leve e constante, mas presente até 30º DPO (Gráfico 6, Figura 12).

Gráfico 6 – Expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos grupos estudados.



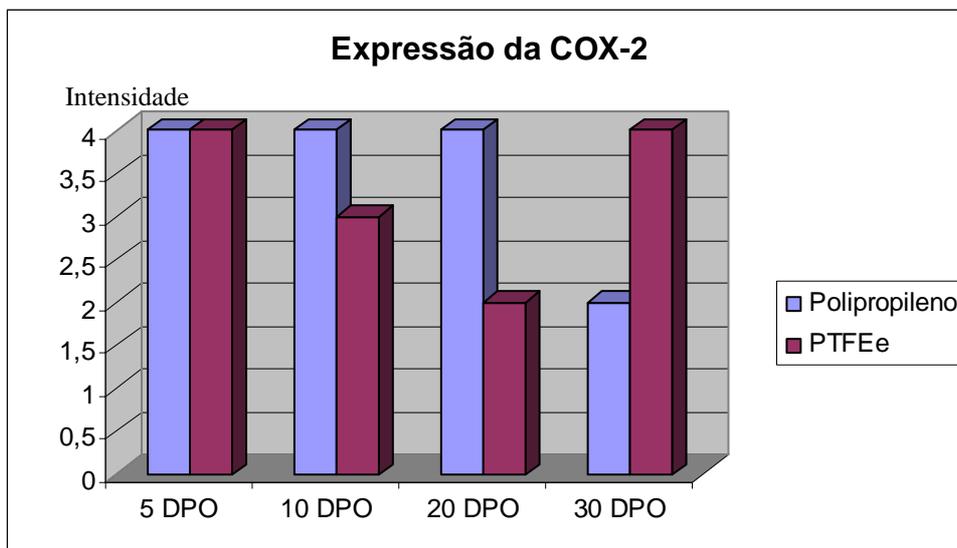
DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido



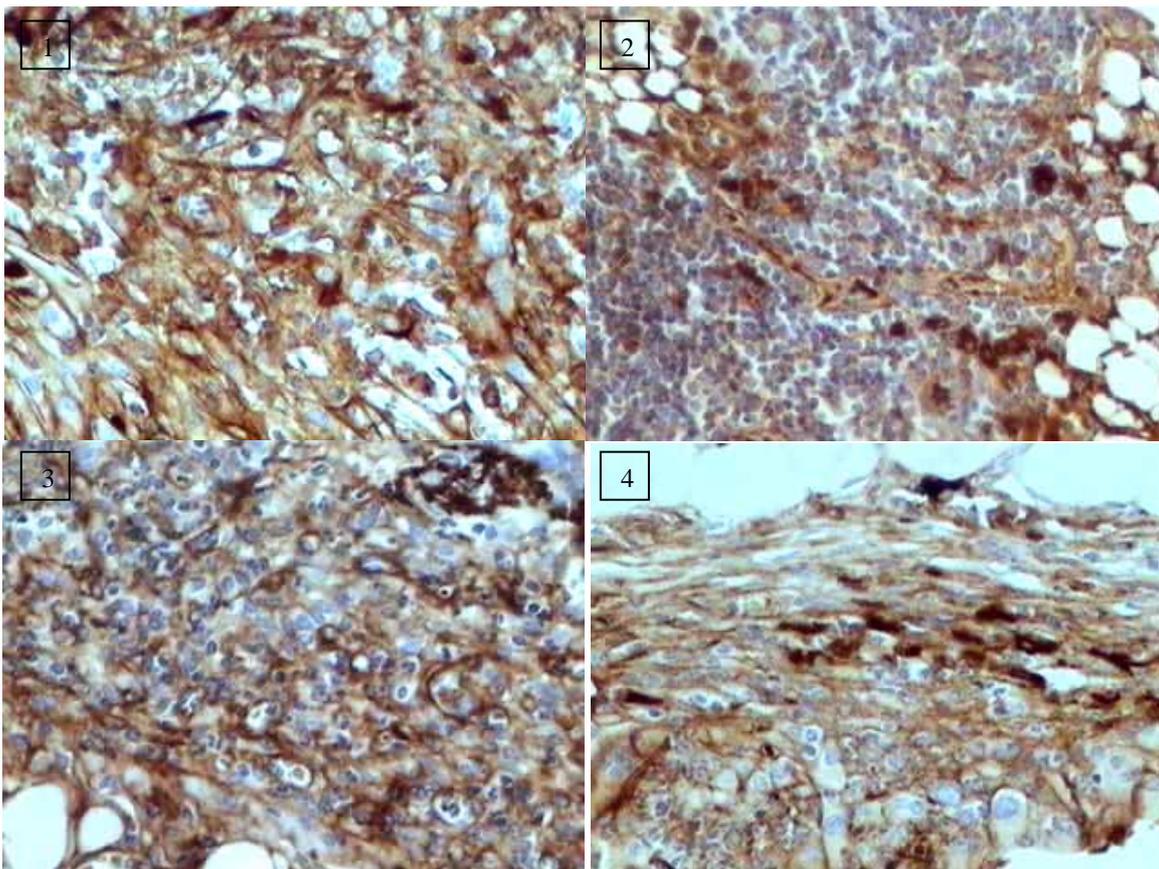
*Figura 12 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pela presença das telas, apresentando: Foto 1 - intensa marcação da enzima óxido nítrico sintase induzida no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação moderada no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação leve da enzima no grupo PTFEe no 5º e 30º DPO respectivamente. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.*

A COX-2 foi a enzima que mais se expressou. A intensidade desta expressão foi intensa nos dois grupos até o 20º DPO, porém significativamente maior no grupo PP no 10º e 20º DPO ( $p=0,02$ ). No grupo PTFEe, a expressão também foi intensa no 5º DPO, mas houve diminuição gradual da intensidade nos dias 10 e 20 de pós-operatório, voltando a se expressar com intensidade significativamente maior no 30º DPO em relação ao grupo PP ( $p=0,02$ ) (Gráfico 7, Figura 13).

Gráfico 7 – Expressão da enzima cicloxigenase 2 (COX-2) nos grupos estudados



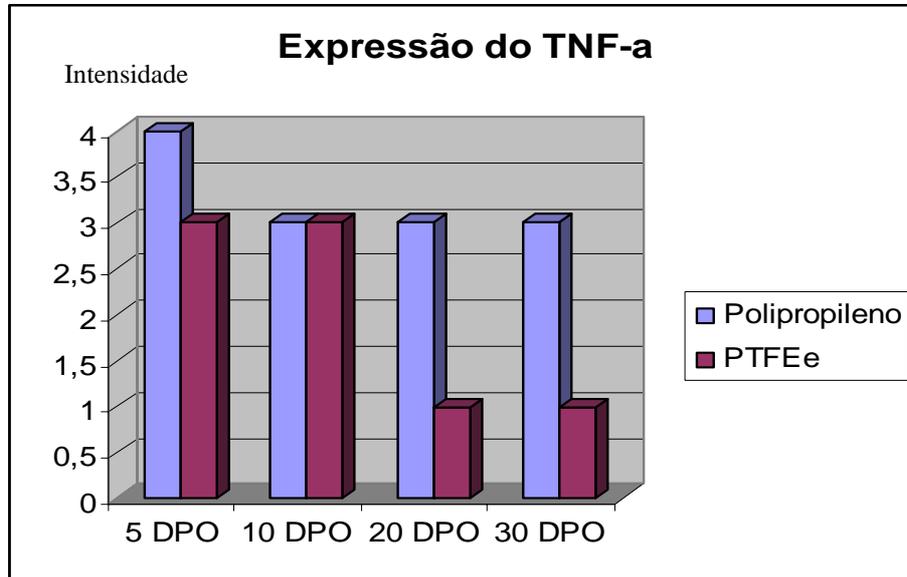
DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido



*Figura 13 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - intensa marcação da enzima cicloxigenase 2 no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 - marcação moderada no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 e 4 – marcação intensa da enzima no grupo PTFEe no 5º e 30º DPO respectivamente. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x (foto 1, 2, e 3), aumento original de 100x (foto 4).*

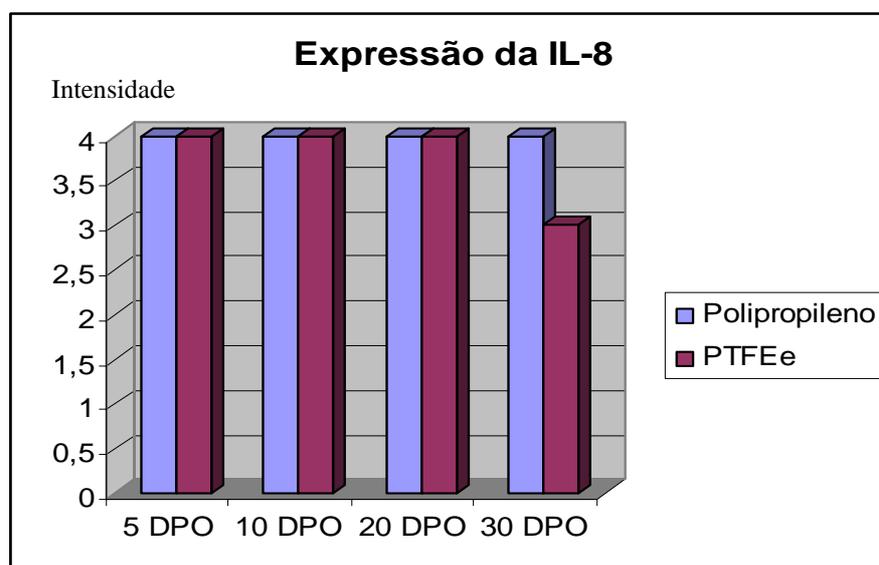
O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) teve expressão intensa e marcante em todo o período no grupo PP. No grupo PTFEe, a expressão foi marcante no 5º e 10º DPO, com redução importante da sua expressão no 20º e 30º DPO, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos dois últimos períodos ( $p=0,02$ ) (Gráfico 8, Figura 14).

Gráfico 8 – Expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) nos grupos estudados

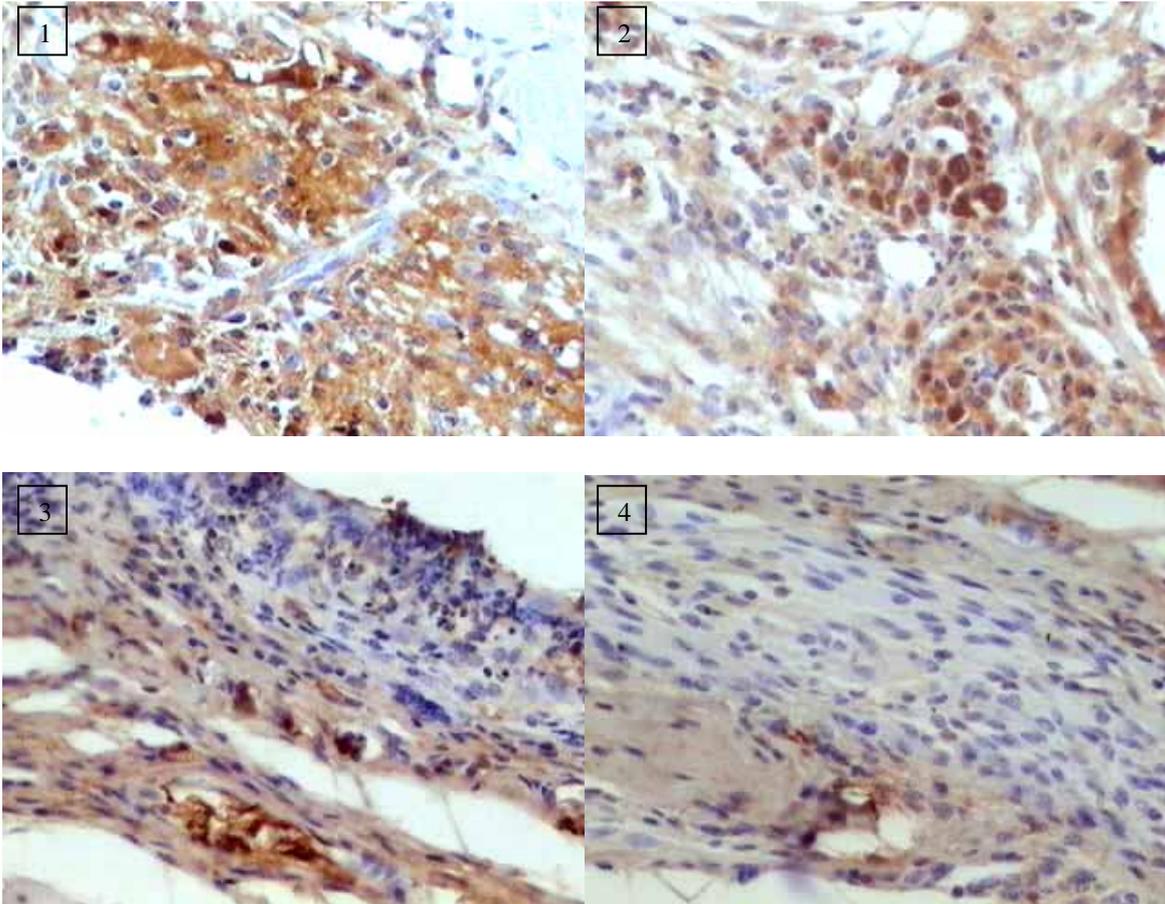


A interleucina 8 (IL-8) teve expressão intensa e semelhante nos dois grupos, com leve redução da expressão no 30º DPO no grupo PTFEe, quando houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo PP ( $p=0,02$ ) (Gráfico 9, Figura 15).

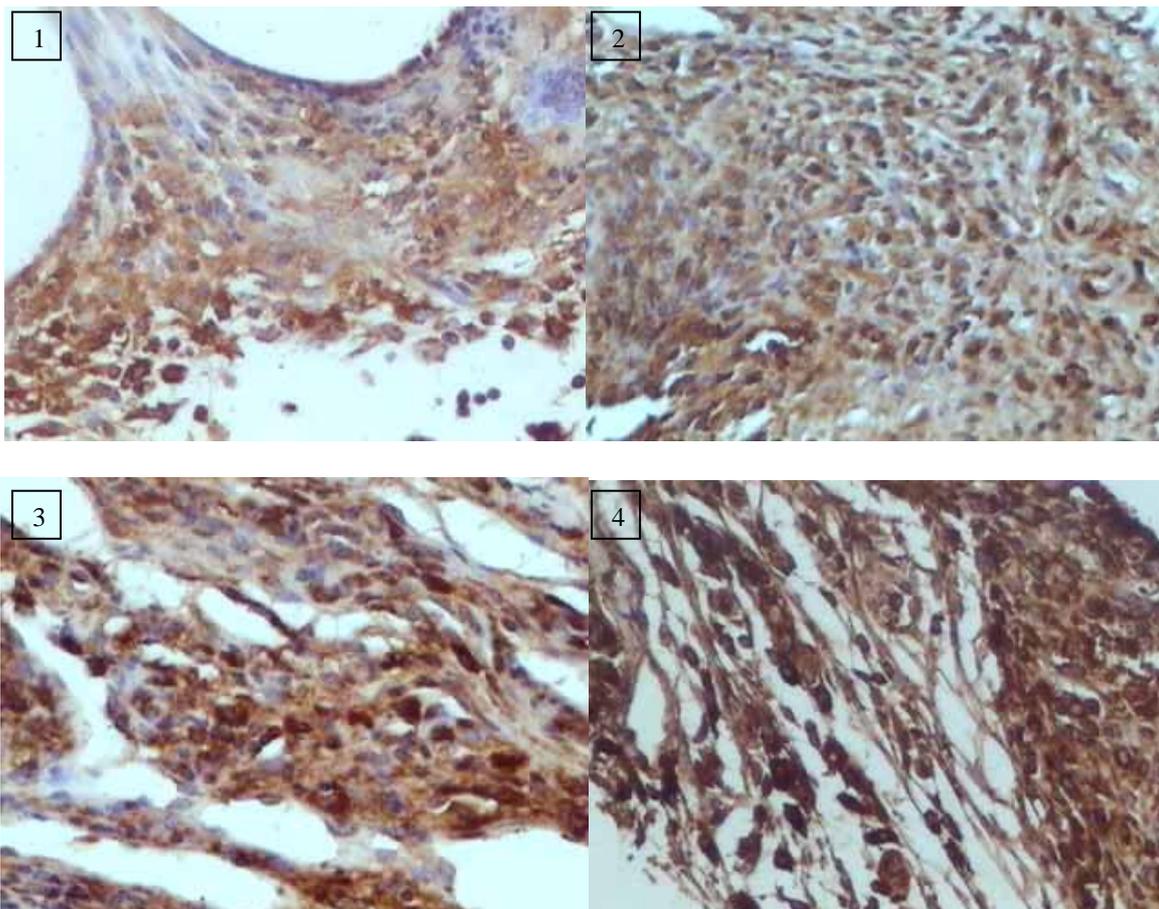
Gráfico 9 – Expressão da interleucina 8 (IL-8) nos grupos estudados



DPO = dia de pós-operatório; PTFEe = politetrafluoretileno expandido



*Figura 14 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 - intensa marcação do fator de necrose tumoral alfa no 5º DPO do grupo polipropileno. Foto 2 – intensidade marcante do TNF- $\alpha$  no mesmo grupo com 30 dias. Foto 3 – marcante intensidade do TNF- $\alpha$  no grupo PTFEe no 5º DPO. Foto 4 – leve marcação da citocina no 30º DPO do grupo PTFEe. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.*



*Figura 15 – Fotomicrografias do processo inflamatório desencadeado pelas telas apresentando: Foto 1 e 2 - intensa marcação da interleucina 8 do grupo polipropileno no 5o e 30o DPO respectivamente. Foto 3 – intensa marcação da interleucina no grupo PTFEe no 5o DPO. Foto 4 – intensidade marcante da IL-8 no 30o DPO do grupo PTFEe. Imunohistoquímica, imunoperoxidase, aumento original de 200x.*

## **6. DISCUSSÃO**

O camundongo (*mus musculus*) C57/BL6 foi o animal escolhido por ser uma espécie que se adapta a uma grande variedade de condições ambientais. Além disso, são de linhagem isogênica, ou seja, todos os indivíduos são geneticamente iguais entre si. Os camundongos isogênicos são obtidos através do acasalamento irmão x irmã por mais de 20 gerações, daonde vêm as seguintes vantagens: uniformidade genética entre os indivíduos, melhor reprodutibilidade de resultados, perfil genético conhecido, homocigotos, uniformidade fenotípica e histocompatibilidade. Além disso, os camundongos são os animais de laboratório mais intensamente utilizados e, por isso, dispõe-se de maior número de anticorpos para efetuar análises imunohistoquímicas. A utilização de adultos machos evita as variações hormonais e de crescimento, a fim de se obter maior homogeneidade na resposta inflamatória. A utilização de camundongos isogênicos permite o desenvolvimento de experimentos com reduzido número de animais devido à similaridade na resposta obtida, sem comprometer os resultados da pesquisa (ATHANASOPOULOS et al, 2006; LONDOÑO et al, 2005; SCHACHNER et al, 2004; SOUZA et al, 2000).

O ato operatório foi realizado por um pesquisador único, seguindo sistematização técnica em todos os procedimentos, a fim de que não ocorressem alterações decorrentes da execução do ato cirúrgico, preservando a homogeneidade do estudo. Preferiu-se a anestesia intramuscular com ketamina e xilazina por ser facilmente administrada, com poucos efeitos colaterais e altamente efetiva em baixas dosagens. A administração prévia da atropina teve o intuito de evitar a hipersalivação e possível obstrução das vias aéreas, com efeito letal (CUNLIFFE-BEAMER e LES, 1987; WIXSON e SMILER, 1997).

A escolha das próteses baseou-se na importância dos materiais na prática médica. Dentre as telas existentes atualmente, as que mais se aproximam dos critérios de material ideal são as telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido (DEBORD, 1998). Devido, pois, ao material disponível na literatura, bem como a importância destes biomateriais no meio cirúrgico, foram escolhidos como materiais para o implante neste experimento as telas de polipropileno (Prolene®) e politetrafluoretileno expandido (PTFEe – Gor-etex®).

A opção do sacrifício nos dias 5, 10, 20 e 30 de pós-operatório foi determinada a partir de um projeto piloto, onde foi observado que estes períodos apresentavam melhor descrição da cinética da reação inflamatória. Este pré-estudo foi realizado exatamente nas mesmas condições do experimento atual, diferindo apenas nos dias de sacrifício, onde os animais foram sacrificados com 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30 e 60 dias de pós-operatório. No dia 3, a resposta inflamatória ainda era escassa, com pouca deposição de células e incorporação dos tecidos, o que dificultaria a determinação de citocinas e enzimas inflamatórias pela técnica de imunohistoquímica. Nos dias 5 e 7, as reações foram semelhantes, assim como nos dias 14 e 20 de pós-operatório. A partir de 30 dias, o processo cicatricial, com formação de fibrose já foi demonstrado com intensidade, não havendo necessidade de manter o estudo por período maior de 30 dias, já que o objetivo inicial do estudo seria determinar a presença de citocinas e enzimas inflamatórias e anti-inflamatórias envolvidas no processo de cicatrização com o uso de telas.

A avaliação macroscópica da cavidade peritoneal demonstrou que não houve formação de abscessos, peritonite, fístulas ou outras complicações infecciosas visíveis macroscopicamente em nenhum dos animais do experimento.

Este fato pode ter sido em decorrência do período em que foi realizada a avaliação, no qual não haveria tempo suficiente para a formação de fístulas intestinais. Outro fator importante seria a resistência apresentada pelos animais em estudo em relação ao desenvolvimento de processos infecciosos. Além disso, o implante de materiais sintéticos sem abertura de vísceras intra-abdominais é considerado procedimento limpo e o estudo seguiu técnicas rigorosas de anti-sepsia.

O desenvolvimento de aderências não foi significativo em nenhum dos grupos estudados. Este fato também pode se dever ao período de avaliação, onde a formação de aderências foi mínima, desfazendo-se facilmente à manipulação. A ausência de aderências deve-se à falta de penetração de tecido fibrocolágeno na face visceral da tela (SIMMERMACHER et al, 1994), sendo menor ainda no grupo PTFEe, onde a resposta inflamatória é menos intensa e a incorporação de colágeno insuficiente, provavelmente devido à microporosidade do material, que dificulta a penetração de células inflamatórias e formação de tecido conjuntivo dentro da tela.

A resposta inflamatória desencadeada pela presença de telas inabsorvíveis na parede abdominal descrita em alguns estudos experimentais (TYRREL et al., 1989; MURPHY 1989; BLEICHRODT, 1993; BÉLLON et al, 1995; BEETS et al 1996; BÉLLON, 1996; KAMA et al, 1999; KLINGE et al, 1999; KLINGE et al 2002; SCHEIDBACH et al, 2004) manteve o mesmo padrão no presente estudo.

As telas de polipropileno induzem uma rápida resposta inflamatória, com migração de monócitos e polimorfonucleares (DABROWIECKI et al, 1991; PAPADIMITRIOU e PETROS, 2005). A partir do 3º dia de pós-operatório já se inicia o processo de cicatrização, com pequena quantidade de leucócitos em

ambos os lados da tela e tecido de granulação acumulando-se em todos os espaços internodais da tela, devido a sua macroporosidade (BÉLLON et al, 2000). A angiogênese se inicia de maneira uniforme dentro da prótese, mas agregados de neovascularização podem ser observados (SAMLÍ et al, 2004). Proteinoglicanos e fibras colágenas também são observados no tecido conjuntivo neoformado que envolve os implantes (PAPADIMITRIOU e PETROS, 2005). O estudo desenvolvido apresentou as mesmas características dos trabalhos descritos na literatura quanto ao processo inflamatório, no qual observa-se marcante presença de células polimorfonucleares, macrófagos e neoformação vascular com 5 dias de pós-operatório. O edema também esteve presente de maneira moderada e uniforme neste período.

Estudos prévios determinaram que a neoformação do peritônio ocorre de forma irregular e desorganizada, com uma superfície áspera, conforme foi observado no experimento (BÉLLON et al, 2001). Áreas de hemorragia e necrose correspondendo a áreas de aderências foram observadas em alguns estudos (BÉLLON et al, 2001), apesar do presente experimento não ter demonstrado que as áreas de necrose e hemorragia correspondessem ao local de aderências. A presença de infecção nas telas de polipropileno piora ainda mais a irregularidade na distribuição do tecido neoformado, com o aparecimento de áreas desnudas e exposição dos filamentos da tela (BÉLLON et al, 2004), mas nenhum dos animais estudados apresentou infecção.

Segundo DABROWIECKI et al (1991), em duas semanas, o acúmulo de macrófagos é intenso e o número de células gigantes é crescente, mas a quantidade de células inflamatórias encontra-se significativamente reduzida. O experimento demonstrou que com 10 dias de pós-operatório a descrição

morfológica é semelhante à referida por DABROWIECKI et al (1991), onde a quantidade de polimorfonucleares diminui e a quantidade de monócitos aumenta consideravelmente, apresentando intensidade marcante, bem como o crescente número de células gigantes. Neoformação vascular continua, com intensidade significativamente maior no grupo PP em relação ao grupo PTFEe.

Um mês após o implante da tela de PP, BELLON et al (1994 e 1995) demonstraram que o número de macrófagos diminuiu e houve aumento progressivo de fibroblastos, com formação de tecido conjuntivo denso distribuído de forma aleatória ao redor e no interior da tela, principalmente na superfície interna, que está em contato com o peritônio. A resposta inflamatória está presente ainda após 3 meses do implante e pode persistir por vários anos (BEETS et al, 1996; KLINGE et al, 1999; SAMLI et al, 2004). No presente estudo foi seguido o mesmo padrão de cinética do processo inflamatório, onde foi evidenciado menor quantidade de células com 20 dias e 30 dias de pós-operatório e marcante predomínio de mononucleares. Com 30 dias, o processo de fibrose já se encontra instalado no grupo PP, com intensidade marcante e significativamente maior em relação ao grupo PTFEe.

Devido a estes achados, a maioria dos estudos experimentais demonstra que a tela de PP é incorporada adequadamente à parede abdominal após 2 semanas do implante (MORRIS-STIFF e HUGHES, 1998) e ocorre maior incorporação de colágeno à tela (MURPHY et al, 1989). Entretanto, a densa reação fibroblástica desencadeada por este biomaterial predispõe à formação de aderências firmes quando estão em contato com as alças intestinais (JAMES et al, 1991). Em estudo experimental em ratos utilizando telas de PP e PTFE para a correção de defeitos infectados da parede abdominal observou-se maior formação

de aderências utilizando telas de PP bem como maior número de fístulas intestinais (BLEICHRODT et al, 1993). Provavelmente devido ao curto período de análise, a formação de aderências não foi significativa e não houve formação de fístulas.

O PTFEe induziu resposta inflamatória menos intensa que o PP porém a resposta tipo corpo estranho foi mais acentuada, o que explica o predomínio de mononucleares em relação ao grupo PP no 5º DPO.

As telas de PTFEe induziram reação inflamatória e formação de tecido conjuntivo e células gigantes distribuídos de maneira ordenada e paralela à tela nas duas superfícies que entram em contato com a mesma, provocando o seu encapsulamento. Esta particularidade na formação de tecido conjuntivo das telas de PTFE deve-se à sua textura, baixa porosidade e hidrofobicidade, promovendo o acúmulo de células nas bordas do biomaterial e escassa quantidade de células no interior da tela (SIMMERMACHER et al, 1994; BÉLLON et al, 1995).

A cinética do estudo com as telas de PTFEe seguiu o mesmo padrão descrito na literatura. O macrófago foi a célula mais importante envolvida no processo de cicatrização e a formação de células gigantes foi mais intensa que no grupo das telas de polipropileno. Não se observou necrose em nenhuma fase do processo de cicatrização e o tecido de granulação esteve presente com 30 dias de pós-operatório, quando as células quase não são mais detectadas. Fibrose foi significativamente menor em relação ao grupo PP.

A formação de aderências relacionadas ao uso das telas de PTFEe é menos intensa e menos freqüente àquelas relacionadas às telas de PP, pois o crescimento de tecido fibro-colágeno e a formação de tecido conjuntivo é paralela à prótese, demonstrando a incorporação insuficiente de colágeno à tela e sua

fraca integração à parede abdominal (KLINGE et al, 1999; SIMMERMACHER et al, 1994; BÉLLON et al, 2001). O presente estudo demonstrou menor quantidade e intensidade de aderências das telas de PTFE em relação às telas de PP, mas de forma não significativa, talvez devido ao curto período de tempo estudado.

Enzimas antioxidantes são os principais mecanismos de defesa contra os radicais livres produzidos por macrófagos ativados pelo processo inflamatório, quando a explosão respiratória pode ter efeito negativo sobre os tecidos adjacentes (SIES e GROOT, 1992, STEILING et al, 1999). As superóxido dismutases são a principal linha de agentes antioxidantes contra os radicais reativos do oxigênio. Observou-se no presente estudo que a expressão da SOD1 foi mais intensa no grupo PP, no início do processo inflamatório, onde a explosão respiratória é mais acentuada. Como as telas de PP determinam processo inflamatório mais intenso que as telas de PTFE supõe-se que há necessidade de maiores quantidades de SOD1 como agente antioxidante, no combate aos radicais reativos do oxigênio. Além disso, diferentemente do processo de cicatrização em pele íntegra (PEREIRA et al 1995; ZELKO et al, 2002), a presença do biomaterial levou à expressão da enzima mesmo após 30 dias do implante, demonstrando que o processo inflamatório relacionado ao uso de telas persiste cronicamente, ainda que em menor intensidade.

A enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), é responsável pela produção do óxido nítrico (XIA e ZWEIER, 1997), que atua como radical livre, e está relacionado à injúria tecidual no processo inflamatório (SIES e GROOT 1992). Este estudo demonstrou a presença da enzima iNOS nos macrófagos ativados pelas próteses utilizadas. Nas reações às telas de PP a enzima se expressou em quantidade significativamente maior e persistiu com intensidade

marcante até 30 dias. Em relação às telas de PTFE, a resposta inflamatória foi menos intensa, bem como a expressão da enzima iNOS, que se apresentou em pequena quantidade nos macrófagos ativados, demonstrando que a intensidade da reação difere de acordo com o tipo de material implantado.

O superóxido e NO são os radicais livres mais estudados e desempenham efeito importante nos tecidos inflamados. Este estudo permitiu determinar a presença das enzimas SOD1 e iNOS demonstrando que o NO e íons superóxido estão envolvidos no processo inflamatório desencadeado pelas telas estudadas e podem estar relacionados às complicações que ocorrem com o uso destes biomateriais.

A COX-2 é fator importante na geração da inflamação e injúria tecidual (VANE et al, 1994; SEIBERT et al, 1994) devido a sua participação na produção dos mediadores prostanóides pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos. No presente estudo, a COX-2 foi detectada em todos os períodos analisados, presente no citoplasma dos macrófagos ativados, sendo significativamente mais intensa nos animais com implante de telas de polipropileno em relação ao PTFE. Com 5 dias, a COX-2 também foi detectada no citoplasma de polimorfonucleares, mas a partir de 10 dias, os macrófagos predominaram como células inflamatórias e foram os responsáveis pela expressão da COX-2. A partir deste resultado, sugere-se que as prostaglandinas também estão envolvidas no processo inflamatório e de injúria tecidual que ocorre com o uso de telas implantadas no espaço intraperitoneal e podem estar relacionadas às complicações que ocorrem com o seu uso.

O TNF- $\alpha$  é produzido predominantemente por macrófagos ativados e sua secreção pode ser estimulada por corpos estranhos (COTRAN et al, 1994a). O

experimento atual demonstrou a presença do TNF- $\alpha$  nos dois grupos em todo o período estudado. Sua expressão foi marcante nos dois grupos, porém mais intensa no grupo PP, provavelmente devido à maior resposta inflamatória que as telas de polipropileno desencadearam em relação às telas de PTFEe. A partir dos resultados pode-se dizer que as próteses utilizadas no estudo são ativadoras do TNF- $\alpha$  mesmo após 30 dias do implante, como foi demonstrado com outros biomateriais (DALU et al, 2000).

A interleucina 8 (IL-8) é potente quimioativador de neutrófilos, produzida por uma variedade de células em resposta a diferentes estímulos e (ENGELHARDT et al, 1998; RENNEKAMPFF et al, 2000) orientando as células em direção ao local de inflamação. O presente estudo demonstrou a forte expressão da IL-8 nos dois grupos, de forma semelhante e persistente, demonstrando que a presença dos biomateriais manteve o processo inflamatório ativo, mesmo após 30 dias e que várias células podem estar envolvidas na expressão desta citocina.

Além das enzimas e citocinas estudadas neste experimento, outros mediadores podem estar envolvidos no processo inflamatório desencadeado pela presença de telas cirurgicamente implantadas no espaço intraperitoneal e novos estudos são necessários para aprimorar o conhecimento da resposta inflamatória que ocorre com o uso de telas na cavidade abdominal.

## **7. CONCLUSÕES**

Nas condições em que foi realizado o presente estudo, a resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno cirurgicamente implantadas no espaço intraperitoneal de camundongos foi mais intensa em relação às telas de politetrafluoretileno expandido (PTFEe).

Os mediadores inflamatórios avaliados pela técnica de imunohistoquímica foram detectados em ambos os grupos, porém com maior intensidade no grupo com implante de telas de polipropileno em relação ao grupo politetrafluoretileno expandido.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ANDERSON J.M. Inflammatory response to implants. **Am Soc Art Int Org**, 34(2): 101-107, 1988.

AMANO, H.; HAYSAHI, I.; YOSHIDA, S.; YOSHIMURA, H.; MAJIMA, M. Cyclooxygenase-2 and adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. **Hum Cell**, 15: 13-24, 2002.

ATHANASOPOULOS, A. N.; ECONOMOPOULOU, M.; ORLOVA, V. V.; SOBKE, A.; SCHNEIDER, D.; WEBER, H.; AUGUSTIN, H.G.; EMING, S. A.; SCHUBERT, U.; LINN, T.; NAWROTH, P. P.; HUSSAIN, M.; HAMMES, H-P.; HERRMANN, M.; PREISSNER, K. T.; CHAVAKIS, T. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. **Blood**, 107: 2720-2727, 2006.

BEETS, G.L.; PMNYH G.O.; MAMEREN H.V. Foreign body reactions to monofilament and braided polypropylene mesh used as preperitoneal implants in pigs. **Eur J Surg**; 162: 823-825, 1996.

BÉLLON, J.M.; BUJAN, J.; CONTRERAS, L. et al. Macrophage response to experimental implantation of polypropylene prostheses. **Eur Surg Res**; 26: 46-53, 1994.

BELLÓN, J.M.; BUJÁN, J.; CONTRERAS, L.; HERNANDO, A. Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response. **Biomaterials**; 16: 381-387, 1995.

BÉLLÓN, J.M.; CONTRETAS, L.; BUJÁN, J.; SAN-MÁRTIN A.C. Experimental assay of a Dual Mesh® polytetrafluoroethylene prosthesis (non-porous on one side) in the repair of abdominal wall defects. **Biomaterials**; 17: 2367-2372, 1996.

BÉLLÓN, J.M.; CONTRERAS, L.; SABATER, C.; BUJÁN, J. Pathologic and clinical aspects of repair of large incisional hernias after implant of a polytetrafluoroethylene prosthesis. **World J Surg**; 21: 402-407, 1997.

BÉLLÓN, J.M.; CONTRERAS, L.; PASCUAL, G.; BUJÁN, J. Evaluation of the acute scarring response to the implant of different types of biomaterials in the abdominal wall. **J Mat Sci: Mat Med**; 11: 25-29, 2000.

BÉLLON, J.M.; GARCIA-CARRANZA, A.; JURADO, F.; GARCIA-HONDUVILLA, N.; CARRERA-SAN MARTIN, A.; BUJÁN, J. Peritoneal regeneration after implant of a composite prosthesis in the abdominal wall. **World J Surg**; 25: 147-152, 2001.

BÉLLON, J.M.; GARCIA-CARRANZA, A.; GARCIA-HONDUVILLA, N.; CARRERA-SAN MARTIN, A.; BUJÁN, J. Tissue integration and biomechanical behaviour of contaminated experimental polypropylene and expanded polytetrafluoroethylene implants. **Br J Surg**; 91: 489-494, 2004.

BELVISI, M.G.; SAUNDERS, M.A.; HADDAD, E.B.; HIRST, S.J.; YACOUB, M.H.; BARNES, P.J.; MITCHELL, J.A.; Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. **Br J Pharmacol**; 120: 910–916, 1997.

BERLINER, S.D. Biomaterials in hernia repair. In: NYHUS, L.M.; CONDON, R.E. **Hernia**. Philadelphia: JB Lippincott, 1989. p. 541-558.

BLEICHRODT, R.P.; SIMMERMACHER, R.K.J.; VAN DER LEI, B.; SCHACKENRAAD, J.M. Expanded polytetrafluoroethylene patch versus polypropylene mesh for the repair of contaminated defects of the abdominal wall. **Surg Gynecol Obstet**; 176: 18-24, 1993.

BRODBECK, W.G.; SHIVE, M.S.; COLTON, E.; ZIATS, N.P.; ANDERSON, J.M. Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages. **J Lab Clin Med**; 139:90-100, 2002.

BROWN, G.L.; RICHARDSON, J.D.; MALANGONI, M.A.; TOBIN, G.R.; ACKERMAN, D.; POLK, H.C. Comparison of prosthetic materials for abdominal wall reconstruction in the presence of contamination and infection. **Ann Surg**; 201: 705-711, 1985.

CASSAR, K.; MUNRO, A. Surgical treatment of incisional hernia. Reviews. **Br J Surg**; 89: 534-545, 2002.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Inflamação e reparação. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994a. p. 45-83.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. Lesão celular e morte celular. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.; SCHOEN, F.J. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994b. p. 1-30.

CRISTOFORONI, P.M.; KIM, Y.B.; PREYS, Z.; LAY, R.Y.; MONTZ, F.J. Adhesion formation after incisional hernia repair: a randomized porcine trial. **Am Surg**; 62: 935-938, 1996.

CUMBERLAND, V.H. A preliminary report on the use of prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia. **Med J Aust**; 1: 143-144, 1952.

CUNLIFFE-BEAMER, T.L.; LES, E.P. The laboratory mouse. The UFAW Handbook of the care and management of laboratory animals. Ed: Poole, T.B., NewYork, 1987. p. 275-296.

DABROWIECKI, S.; SVANES, K.; LEKVEN, J.; GRONG, K. Tissue reaction to polypropylene mesh: a study of edema, blood flow, and inflammation in the abdominal wall. **Eur Surg Res**; 23:240-249, 1991.

DALU, A.; BLAYDES, B.S.; LOMAX, L.G.; DELCLOS, K.B. A comparison of the inflammatory response to a polydimethylsiloxane implant in male and female Balb/c mice. **Biomaterials**; 21:1947-1957, 2000.

DEBORD, J.R. The historical development of prosthetics in hernia surgery. **Sur Clin North Am**; 78: 973-1006, 1998.

DELIGIANNIDIS, N.; PAPAVALIIOU, I.; SAPALIDIS, K.; KESISOGLOU, I.; PAPAHRAMIDIS, S.; GAMVROS, O. The use of three different mesh materials in the treatment of abdominal wall defects. **Hernia**; 6: 51-55, 2002.

DEYSINE, M. Ventral herniorraphy: treatment evolution in a hernia service. **Hernia**; 2: 15-18, 1998.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.A.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **Fed Am Soc Exp Biol J**; 12: 1063–1073, 1998.

ENGELHARDT, E.; TOKSOY, A.; GOEBELER, M.; DEBUS, S.; BRÖCKER, E.B.; GILLITZER, R. Chemokines IL-8, GRO $\alpha$ , MCP-1, IP-10, and MIG are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leukocyte subsets in human wound healing. **Am J Pathol**, 153: 1849-1860, 1998.

EUBANKS, W.S. Hernias. In: TOWNSEND C.M. **Sabiston textbook of surgery**, Philadelphia: 2001. p. 783-801.

FLUM, D.R.; HORVATH, K.; KOEPESELL, T. Have outcomes of incisional hernia repair improved with time? A population-based analysis. **Ann Surg**; 237: 129–135, 2003.

GIANLUPI, A.; TRINDADE, M.R.M. Comparação entre o uso de fio inabsorvível (polipropileno) e fio absorvível (poliglactina 910) na fixação de prótese de polipropileno em correção de defeitos músculo-aponeuróticos da parede abdominal. Estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**; 19: 94-102, 2004.

GILLION, J.F.; BEGIN, G.F.; MARECOS, C.; FOURTANIER, G. Expanded polytetrafluoroethylene patches used in the intraperitoneal or extraperitoneal position for repair of incisional hernias of the anterolateral abdominal wall. **Am J Surg**; 174: 16-19, 1997.

GRANT, A.M. Open mesh versus non-mesh repair of groin hernia meta-analysis of randomized trials based on individual patient data. The EU Hernia Trialists Collaboration. **Hernia**; 6: 130–136, 2002.

HOWDIESHELL, T.R.; WEBB, W.L.; SATHYANARAYANA; McNEIL, P.L. Inhibition of inducible nitric oxide synthase results in reductions in wound vascular endothelial growth factor expression, granulation tissue formation, and local perfusion. **Surgery** 2003; 133: 528-537.

JAMES, N.L.; POOLE-WARREN, L.A.; SCHINDHELM, K. Comparative evaluation of treated bovine pericardium as a xenograft for hernia repair. **Biomaterials**; 12:801-809, 1991.

KAMA, N.A.; COSKUN, T.; YAVUZ, H.; DOGANAY, M.; REIS, E.; AKAT, A.Z. Autologous skin graft, human dura mater and polypropylene mesh for the repair of ventral abdominal hernias: an experimental study. **Eur J Surg**; 165: 1080-1085, 1999.

KHAN, K.N.M.; STANFIELD, K.; TRAJKOVIC, D.; HARRIS, R.K. Cyclooxygenase-2 expression in inflammatory lung lesions of nonhuman primates. **Vet Pathol**; 37:512–516, 2000.

KINGSNORTH, A. LeBlanc K. Hernias: inguinal and incisional. **Lancet**; 362: 1561-1571, 2003.

KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; MÜLLER, M.; SCHUMPELICK, V. Foreign body reaction to meshes used for repair of abdominal wall hernias. **Eur J Surg**; 165: 665-673, 1999.

KLINGE, U.; KLOSTERHALFEN, B.; BIRKENHAUER, V.; JUNGE, K.; CONZE, J.; SCHUMPLICK, V. Impact of polymer pore size on the interface scar formation in rat model. **J Surg Res**; 103: 208-214, 2002.

KOLLER, R.; MIHOLIC, J.; JAKI, J. Repair of incisional hernias with expanded polytetrafluoroethylene. **Eur J Surg**; 163: 261-266, 1997.

KOONTZ, A.R. Preliminary report on the use of tantalum mesh in the repair of ventral hernias. **Ann Surg**; 127: 1079-85, 1948.

KOONTZ, A.R. An operation for large incisional epigastric hernias. **Surg Gynecol Obstet**; 114: 117-119, 1962.

KRAUSE, T.J.; ROBERTSON, F.M.; GRECO, R.S. Measurement of intracellular hydrogen peroxide induced by biomaterials implanted in a rodent air pouch. **J Bio Mat Res**; 27: 65-69, 1993.

KRIEGLSTEIN, C.F.; CERWINKA, W.H.; LAROUX, F.S.; SALTER, J.W.; RUSSEL, J.M.; SCHUERMANN, G.; GRISHAM, M.B.; ROSS, C.R.; GRANGER, D.N. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. **J Exp Med**; 194: 1207-1218, 2001.

LEHNINGER, A.L. Transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e regulação da produção de ATP. In: LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1988 p. 333-361.

LONDOÑO, D.; BAI, Y.; ZÜCKERT, W. R.; GELDERBLOM, H.; CADAVID, D. Cardiac apoptosis in severe relapsing fever borreliosis. **Infect Immun**; 73: 7669–7676, 2005.

LOZANO, F.S.; GARCIA-CRIADO, F.J.; FRESNADILLO, M.J.; GARCIA E. et al. Systemic inflammatory response induced by dacron graft and modulation by antimicrobial agents: experimental study. **J Surg Res**; 107: 7-13, 2002.

LUIJENDICK, R.W.; HOP, W.C.J.; VAN DEN TOL, P.; DE LANGE, D.C.D.; BRAAKSMA, M.M.J.; et al. A comparison of suture repair with mesh repair for incisional hernia. **N Engl J Med**; 343: 392-398, 2000.

MAJIMA, M.; ISONO, M.; IKEDA, Y.; HAYASHI, Y.; HATANAKA, K.; HARADA, Y.; KATSUMATA, O.; YAMASHINA, S.; KATORI, M.; YAMAMOTO, S. Significant roles of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in angiogenesis in rat sponge implants. **Jpn J Pharmacol**; 75: 105-114, 1997.

McLEAN, A.L.; TALMOR, M.; HARPER, A.; FAHEY, T.J. 3RD.; GAYLE, L.BL; HOFFMAN, L.A. Expression of cyclooxygenase-2 in the periprosthetic capsule surrounding a silicone shell implant in the rat. **Ann Plast Surg**; 48: 292-7, 2002.

MOILANEN, E.; MOILANEN, T.; KNOWLES, R.; CHARLES I. et al. Nitric oxide synthase is expressed in human macrophage during foreign body inflammation. **Am J Path**; 150: 881-887, 1997.

MORRIS-STIFF, G.J.; HUGHES, L.E. The outcomes of nonabsorbable mesh placed within the abdominal cavity: literature review and clinical experience. **J Am Coll Surg**; 186 (3):352-367, 1998.

MURPHY, J.L.; FREEMAN, J.B.; DIONNE, P. Comparison of Marlex and Gore-tex to repair abdominal wall defects in the rat. **Can J Surg**; 32: 244-247, 1989.

NAGY, K.K.; FILDES, J.J.; MAHR, C.; ROBERTS, R.R.; KROSNER, S.M.; JOSEPH, K.T.; BARRETT, J. Experience with three prosthetic material in temporary abdominal wall closure. **Am Surgeon**; 62: 331-335, 1996.

NETO, J.M.K. Hérnia incisional. In: DA SILVA A.L. **Hérnias da parede abdominal**. Belo Horizonte: Atheneu, 1997. v1. p. 81-93.

PAPADIMITRIOU, J.; PETROS, P. Histological studies of monofilament and multifilament polypropylene mesh implants demonstrate equivalent penetration of macrophages between fiblis. **Hernia**; 9: 75-78, 2005.

PARK, J.B. Biomaterials: an introduction. **Plenum Press**. New York, 1979.

PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **Am J Surg**; 187: 11S-16S, 2004.

PEREIRA, B.; ROSA, L.F.B.P.C.; SAFI, D.A.; BECHARA, E.J.H.; CURI, R. Hormonal regulation of superoxide dismutase, catalase and glutathione

peroxidase activities in rat macrophages. **Biochem Pharmacol** 50: 2093-2098, 1995.

POLLOCK, J.S.; WEBB, W.; CALLAWAY, D. et al. Nitric oxide syntase isoform expression in a porcine model of granulation tissue formation. **Surg**; 129: 341-350, 2001.

RENNEKAMPFF, H.O.; HANSBROUGH, J.F.; KIESSIG, V.; DORE, C.; STICHERLING, M.; SCHARODER, J.M. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enchances wound healing. **J Surg Res**; 93: 41-54, 2000.

SAMLI, M.M.; DEMIRBAS, C.G.; AKTEPE, F.; DINCEL, C. Early tissue reactions in the rat bladder wall after contact with three different synthetic mesh materials. **Br J Uro Inter**; 93: 617-621, 2004.

SCALES, J.T. Discussion on metals and synthetic materials in relation to soft tissues; tissues reaction to synthetic materials. **Proc R Soc Med**; 46: 647-652, 1953.

SCHEIDBACH, H.; TAMME, C.; TANNAPFEL, A.; LIPPERT, H.; KOCKERKING, F. In vivo studies comparing the biocompatibility of various polypropylene meshes and their handling properties during endoscopic total extraperitoneal (TEP) patchplasty. An experimental study in pigs. **Surg Endosc**; 18: 211-220, 2004.

SCHACHNER, T.; ZOU, Y.; OBERHUBER, A.; MAIRINGER, T.; TZANKOV, A.; LAUFER, G.; OTT, H.; BONATTI, J. Perivascular application of C-type natriuretic peptide attenuates neointimal hyperplasia in experimental vein grafts. **Eur J CardioThorac Surg**; 25: 585-590, 2004.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFFERER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 91:12013–12017, 1994.

SHEEN, J. Prosthetics in Hernia Repair. **Surg Today**; 35: 196–198, 2005.

SIEGEL S. O caso de duas amostras independentes. Em: SIEGEL, S. Estatística não-paramétrica (para as ciências do comportamento). São Paulo: McGraw-Hill, 1975. Cap. 6, p. 131-144.

SIES, H.; GROOT, H. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. **Toxic Let**; 64/65: 547-551, 1992.

SIMMERMACHER, R.K.J.; SCHAKENRAAD, J.M.; BLEICHRODT, R.P. Reherniation after repair of the abdominal wall with expanded polytetrafluorethylene. **J Am Coll Surg**; 178:613-616, 1994.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases) -1 and -2. **J Biol Chem**; 271: 33157–33160, 1996.

STEILING, H.; MUNZ, B.; WERNER, S.; BRAUCHLE, M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. **Exp Cell Res**; 247: 484-494, 1999.

SOUZA, V. L.; SOUZA, J. A.; SILVA, T. M. C.; VERAS, P. S. T.; DE-FREITAS, L. A. F. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**; 2: 1807-1815, 2000.

TYRREL, J.; SILBERMAN, H.; CHANDRASOMA, P.; NILAND, J.; SHULL, J. Absorbable versus permanent mesh in abdominal operations **Surg Gynecol Obstet**; 168: 227-232, 1989.

USHER, F.U.; WALLACE, S.A. Tissue reaction to plastic. **Arch Surg**; 76: 997-999, 1958.

USHER, F.C. A new plastic prosthesis for repairing tissue defects of the chest and abdominal wall. **Am J Surg**; 97: 629-633, 1959.

VANE, J.R.; MITCHELL, J.A.; APPLETON, I. et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**; 91:2046–2050, 1994.

WIXSON, S.K.; SMILER, K.L. Anesthesia and analgesia in rodents. KOHN, D.F.; WIXSON, S.K.; WHITE, W.J.; BENSON, G.J. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. California: Academic Press Inc, 1997. p. 174.

WU, K.K. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. **Adv Pharmacol**; 33: 179–207, 1995.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide syntase in macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA**; 94: 6954-6958, 1997.

XU, H.; HU, Y.; CAO, S. Expression and cellular localization of interleukin-8 mRNA and protein in the area of xenogenic bone implant. **Chin J Traumatol**; 15: 3-7, 1999.

ZELKO, I.N.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family: a comparision of the CnZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Rad Bio & Med**; 33:337-349, 2002.

ZELLER, J.M. Surgical implants. Phisiological response. **AORN J**; 7:1284-1291, 1993.

## **9. ANEXOS**

**Avaliação morfológica da resposta inflamatória no 5º e 10º dias de pós-operatório**

**Grupo Polipropileno**

| DPO               | 5 DPO | 5 DPO | 5 DPO | 5 DPO | 10 DPO | 10 DPO | 10 DPO | 10 DPO |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Edema             | ++    | ++    | ++    | ++    | ++     | ++     | ++     | +++    |
| Hemorragia        | +     | +     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Necrose           | +     | +     | +     | +     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Polimorfonuclear  | +++   | +++   | ++    | ++    | ++     | ++     | ++     | +      |
| Mononuclear       | ++    | ++    | ++    | ++    | ++     | ++     | ++++   | +++    |
| Vasos neoformados | ++    | ++    | +     | +     | ++     | ++     | +      | ++     |
| Granulação        | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Fibrose           | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |

**Grupo Politetrafluoretileno expandido**

| DPO               | 5 DPO | 5 DPO | 5 DPO | 5 DPO | 10 DPO | 10 DPO | 10 DPO | 10 DPO |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| Edema             | ++    | ++    | ++    | ++    | ++     | ++     | ++     | ++     |
| Hemorragia        | 0     | +     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Necrose           | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Polimorfonuclear  | ++    | ++    | ++    | ++    | ++     | ++     | ++     | ++     |
| Mononuclear       | ++++  | ++++  | ++++  | ++++  | ++     | ++     | ++     | +++    |
| Vasos neoformados | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | +      | 0      | +      |
| Granulação        | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |
| Fibrose           | 0     | 0     | 0     | 0     | 0      | 0      | 0      | 0      |

**NOTA:**

**DPO (Dia de pós-operatório)**

**Leve(+)**

**Moderada(++)**

**Marcante(+++)**

**Intensa(++++)**

**Avaliação morfológica da resposta inflamatória no 20º e 30º dias de pós-operatório**

| <b>DPO</b>        | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Edema             | ++            | +             | ++            | ++            | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Hemorragia        | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Necrose           | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Polimorfonuclear  | +             | +             | +             | +             | +             | +             | +             | ++            |
| Mononuclear       | +++           | +++           | +++           | +++           | +++           | +++           | +++           | ++            |
| Vasos neoformados | +             | ++            | +             | +             | +             | +             | ++            | +             |
| Granulação        | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Fibrose           | 0             | 0             | 0             | 0             | ++            | +++           | +++           | +++           |

**Grupo Polipropileno**

**Grupo Politetrafluoretileno expandido**

| <b>DPO</b>        | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>20 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> | <b>30 DPO</b> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Edema             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Hemorragia        | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Necrose           | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Polimorfonuclear  | +             | ++            | +             | +             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Mononuclear       | ++            | ++            | ++            | +             | +             | +             | +             | +             |
| Vasos neoformados | +             | +             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             |
| Granulação        | 0             | 0             | 0             | 0             | +             | 0             | 0             | 0             |
| Fibrose           | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | 0             | +             | +             |

**NOTA:**

**DPO (Dia de pós-operatório)**

**Leve(+)**

**Moderada(++)**

**Marcante(+++)**

**Intensa(++++)**

## Análise imunohistoquímica

|  |               | SOD1 | iNOS | COX-2 | TNF- $\alpha$ | IL-8 |
|--|---------------|------|------|-------|---------------|------|
| <b>Grupo Poli-propileno</b>                    | <b>5 DPO</b>  | +++  | ++++ | ++++  | ++++          | ++++ |
|  | <b>10 DPO</b> | ++   | ++++ | ++++  | +++           | ++++ |
|  | <b>20 DPO</b> | +    | +    | ++++  | +++           | ++++ |
|  | <b>30 DPO</b> | +    | ++   | ++    | +++           | ++++ |
| <b>Grupo Politeretrafluoretileno expandido</b> | <b>5 DPO</b>  | +    | +    | ++++  | +++           | ++++ |
|  | <b>10 DPO</b> | +    | +    | +++   | +++           | ++++ |
|  | <b>20 DPO</b> | ++   | +    | +++   | +             | ++++ |
|  | <b>30 PDO</b> | +    | +    | ++++  | +             | +++  |

**NOTA:**

**DPO (Dia de pós-operatório)**

**Leve(+)**

**Moderada(++)**

**Marcante(+++)**

**Intensa(++++)**