

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATRIZES  
TRIDIMENSIONAIS DE COLÁGENO E IMPLANTAÇÃO EM  
PAREDE ABDOMINAL DE EQÜINOS

Valcinir Aloisio Scalla Vulcani

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATRIZES  
TRIDIMENSIONAIS DE COLÁGENO E IMPLANTAÇÃO EM  
PAREDE ABDOMINAL DE EQÜINOS

Valcinir Aloisio Scalla Vulcani

Orientador: Prof. Dr. Delphim da Graça Macoris

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias  
e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal,  
como parte das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2008

Vulcani, Valcinir Aloisio Scalla Vulcani  
V991o Obtenção e processamento de matrizes tridimensionais de colágeno e implantação em parede abdominal de eqüinos / Valcinir Aloisio Scalla Vulcani. -- Jaboticabal, 2008  
xi, 74 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Delphim da Graça Macoris

Banca examinadora: Ana Maria de Guzzi Plepis, Luis Cláudio Lopes Correia da Silva, Antônio Carlos Alessi, José Wanderley Cattelan

Bibliografia

1. Eqüinos-implantes. 2. Eqüinos-colágeno. 3. Membranas biológicas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619.636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**unesp**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE MATRIZES TRIDIMENSIONAIS DE COLÁGENO E IMPLANTAÇÃO NA PAREDE ABDOMINAL DE EQUINOS

**AUTOR:** VALCINIR ALOÍSIO SCALLA VULCANI

**ORIENTADOR:** Dr. DELPHIM DA GRAÇA MACORIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIRURGIA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dr. DELPHIM DA GRAÇA MACORIS

Dra. ANA MARIA DE GUZZI PLEPIS

Dr. LUIS CLÁUDIO LOPES CORREIA DA SILVA

Dr. JOSE WANDERLEY CATTELAN

Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Data da realização: 16 de janeiro de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. DELPHIM DA GRAÇA MACORIS

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI** – nascido em São Carlos, SP no dia 26 de outubro de 1978, iniciou o curso de medicina veterinária em fevereiro de 1997 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (UNESP), tendo concluído-o em dezembro de 2001, apresentando a monografia intitulada “Atopia e hiperestrogenismo em fêmea canina”. Adentrou, em março de 2002, no curso de pós-graduação em bioengenharia, nível mestrado, do curso de pós-graduação em bioengenharia interunidades (Escola de Engenharia de São Carlos – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Instituto de Química de São Carlos) da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação da Professora Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e concluiu o curso em janeiro de 2004, apresentando a dissertação intitulada “Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona”. Iniciou, em março de 2004, o curso de pós-graduação em cirurgia veterinária, nível doutorado, sob orientação do Professor Dr. Delphim da Graça Macoris desenvolvendo o projeto intitulado “Obtenção, caracterização e implantação de matrizes tridimensionais de colágeno para reconstrução dos tecidos moles da parede abdominal de eqüinos”.

*“Encarada sob certa perspectiva, a ‘metodologia’ parece uma questão puramente técnica, sem nenhuma relação com a ideologia; pressupõe-se que ela tem a ver apenas com métodos para extrair informações fidedignas do mundo, métodos para coligir dados, construir questionários, amostragens e analisar os resultados. Entretanto, ela é sempre muito mais do que isto, pois comumente está carregada de pressuposições que todos aceitam...”*

*(Alvin Goudner).*

**e**

*“Contra o positivismo, que pára perante os fenômenos e diz: ‘Há apenas fatos’. eu digo: ‘Ao contrário, fatos é o que não há; há apenas interpretações’.”*

*(Nietzsche)*

**Portanto**

*“Nada é mais importante que ver as fontes da invenção que são, na minha opinião, muito mais importantes que as próprias invenções.”*

*(Leibniz)*

**Amén**

### **Ofereço**

*Aos meus queridos amigos eqüinos, que tiveram seus corpos sacrificados para que eu pudesse testar uma hipótese...*

*Por hora só posso consagrar o trabalho a vocês, quiçá, um dia, os testes sejam diferentes e só se cumpra a parte interessante do experimento...  
A aplicação...*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus.*

*À toda minha família*

*Ao Professor Delphim da Graça Macoris, que permitiu, em primeiro lugar, que eu adentrasse ao programa de pós-graduação em cirurgia veterinária e realizasse o doutorado. Agradeço pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela orientação e pela convivência neste período.*

*À Professora Ana Maria de Guzzi Plepis do Instituto de Química da USP (IQSC) – São Carlos, minha orientadora de mestrado, que permitiu a realização deste trabalho em conjunto com a USP.*

*À minha querida Vanessa que tanto apoiou e auxiliou no cuidado com os cavalos.*

*Às minhas queridas amigas veterinárias, residentes do Hospital Veterinário, Maria Augusta, Maria Estela, Jerusa, Luiza e a todos os estagiários que ajudaram durante as cirurgias. Impossível realizar o trabalho sem o grande auxílio de vocês.*

*Aos funcionários do Hospital Veterinário que auxiliaram direta ou indiretamente na execução dos procedimentos cirúrgicos. Sem ajuda não seria possível executar nossa tarefa.*

*Aos funcionários do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC que sempre me acolheram gentilmente, desde o mestrado, e participaram ativamente de todas as etapas de obtenção e caracterização do material, em especial à Doutora Virgínia da Conceição Amaro Martins.*

*Aos funcionários do setor de pós-graduação que trabalham nos bastidores para que toda a burocracia seja cumprida.*

*Ao Professor Cattelan, que me orientou em estágio de docência e acompanhou as atividades do trabalho realizado.*

*A todos os professores da FCAV, pelos ensinamentos e período de convivência durante este período.*

*Aos amigos e colegas da FCAV. São numerosos, pecaria se deixasse alguém de fora.*

*Aos amigos das repúblicas que me acolheram.*

*À Capes pela concessão da bolsa de doutorado*

*À FAPESP pela concessão do auxílio ao projeto*



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Parede abdominal: composição tecidual e regiões de acesso cirúrgico à cavidade abdominal .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Biomateriais para reparação de tecidos da cavidade abdominal: Estado da Arte .....</b>	<b>5</b>
3.1. Métodos de conservação de tecidos animais .....	10
3.2 Métodos de alteração Molecular de Tecidos Animais.....	10
3.3 Biomateriais de origem vegetal.....	12
<b>4. Discussão .....</b>	<b>14</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>15</b>
<b>6. Objetivos .....</b>	<b>15</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 2 – OBTENÇÃO DE BIOMEMBRANAS DE COLÁGENO A PARTIR DE CENTROS TENDINOSOS DIAFRAGMÁTICOS DE EQÜÍNOS: CONSIDERAÇÕES SOBRE A VARIÁVEL TEMPO NO TRATAMENTO ALCALINO DO MATERIAL....</b>	<b>22</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>22</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>22</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>23</b>
1.1 Colágeno .....	23
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>27</b>

<b>3. Material e métodos</b> .....	<b>27</b>
3.1 Obtenção e Preparação das Amostras .....	27
3.2 ASPECTOS MACROSCÓPICOS .....	29
3.3 Análise Térmica .....	30
3.4 Microscopia eletrônica de varredura .....	30
3.5 Ensaio de degradação enzimática por colagenase .....	30
<b>4. Resultados</b> .....	<b>31</b>
4.1 Aspecto macroscópico .....	31
4.2 Análise térmica .....	32
4.3 Microscopia eletrônica de varredura .....	32
<b>5. Discussão</b> .....	<b>34</b>
<b>6. Conclusões</b> .....	<b>35</b>
<b>7. Referências</b> .....	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 3 – IMPLANTAÇÃO EXPERIMENTAL DE BIOMEMBRANAS COLAGÊNICAS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA POR 72 HORAS NA PAREDE ABDOMINAL DE EQUÍNOS: ESTUDO COMPARATIVO COM CONTROLE POSITIVO E BIOMEMBRANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE GLICERINA A 98%</b> .....	<b>38</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>38</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>38</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>39</b>
1.1 Interface Tecidos/Biomateriais: Definições e Conceitos .....	39
1.2 Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais .....	40
1.3 Atividade celular durante o processo inflamatório .....	42
1.4 Potencial carcinogênico dos biomateriais .....	43

<b>2. Objetivos</b> .....	<b>44</b>
<b>3. Material e métodos</b> .....	<b>44</b>
3.1 Animais, alimentação e acomodações.....	44
3.2 Obtenção das amostras .....	45
3.3 Análise da capacidade de hidratação das amostras em função do tempo .....	46
3.4 Implantação Experimental .....	47
3.5 Retirada dos implantes e tecidos adjacentes.....	50
3.6 Avaliação Histopatológica.....	50
3.7 Delineamento.....	51
3.8 Análise estatística .....	51
<b>4. Resultados</b> .....	<b>52</b>
4.1 Análise da capacidade de hidratação das amostras em função do tempo .....	52
4.2 Avaliação clínica .....	54
4.3 Avaliação cirúrgica.....	54
4.4 Avaliação Histopatológica.....	55
4.4.1 Polimorfonucleares .....	55
4.4.2 Linfócitos .....	56
4.4.3 Macrófagos .....	56
4.4.4 Fibroblastos.....	57
4.4.5 Neovascularização .....	58
4.4.6 Atividade celular em fios de sutura .....	59
4.4.7 Célula gigante multinucleada .....	59
4.4.8 Comparação entre os sexos .....	59
4.4.9 Verificação de metaplasia e formação de células ósseas .....	62
<b>5. Discussão</b> .....	<b>62</b>

5.1 Considerações sobre a técnica de implantação.....	62
5.2 Retirada dos implantes – Percepção sobre a fibrose durante o ato cirúrgico.....	62
5.3 Processo inflamatório e resolutivo cicatricial.....	63
5.4 Neovascularização.....	67
5.5 Verificação de metaplasia e formação de células ósseas.....	67
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>67</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>68</b>
<b>CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>2. Considerações sobre o desenvolvimento do projeto.....</b>	<b>71</b>
2.1 Interdisciplinaridade.....	71
2.1 Escolha do modelo animal e do material a ser empregado como implante.....	72
2.2 Resultados obtidos e direcionamentos futuros.....	73
<b>3. Referências.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Prancha 1. Composição tecidual e acessos cirúrgicos à cavidade abdominal.....4

Figura 1. Ilustração esquemática da composição tecidual da porção ventral do abdômen (A). Em (B), representação da designação externa das regiões abdominais. Adaptado de LEGGI, 2000.....4

Figura 2. Representação esquemática das vias de acesso à cavidade abdominal. Acesso ventral em (A): 1- Incisão paramediana; 2 – Incisão mediana; 3 – Incisão inguinal. Acesso pela região do flanco em (B): 1 – Incisão paralombar; 2 – Incisão transversa; TC – túber coxal. Adaptado de AUER, 1992. ....4

Prancha 2. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes.....8

Figura 1. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes. Em A, fios metálicos par manter a união de dentes bovinos, utilizados pelos egípcios. Em B, Implantes dentários ornamentais, como forma de afirmação do estatuto social da Civilização Maia. Em C e D próteses de dedo, constituída de madeira, substituindo dedo amputado. Material encontrado em múmia egípcia datada de 1000 anos antes de Cristo. Disponível em <http://terraeantiquae.blogia.com/> acesso em 01/07/2006. ....8

Figura 2. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes. Em A, cadáver mumificado de uma mulher, com esfera de resina como prótese ocular. Encontrado no Irã e datado de 4800 anos. Em B, fragmento de dentadura etrusca, cujo dente pântico se perdeu. Refere-se que o dente perdido era de origem bovina e permanecia preso por rebite à lâmina de ouro. Disponível em <http://www.manuelgago.org/blog> Acesso em 01/07/2006. ....8

Prancha 3. Próteses de origem sintética.....9

Figura 1. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, inabsorvíveis sintéticas. Em (A), malha de polipropileno (Marlex®); Em (B), malha de poliéster (gore-TEX®); Em (C) malha de politetrafluoretileno expandido (ePTFE – gore-TEX®); Em (D), malha de polipropileno associada a politetrafluoretileno expandido (Cousin biotech®). Disponível em: <http://hernia.tripod.com/> acesso em 01/07/2006. ....9

Figura 2. Microestruturas de próteses cirúrgicas para tecidos moles inabsorvíveis sintéticas. Em (A), malha de polipropileno (Marlex®); Em (B), malha de polipropileno (Prolene®); Em (C) malha de polipropileno de alta densidade (Prolene®); Em (D), malha de polipropileno de baixa densidade e poros amplos (Prolene®); Em (E), malha de polipropileno de baixa densidade e

poros amplos com estrutura regular (Prolene®); Em (F), malha de Politetrafluoretileno expandido (ePTFE – gore-TEX®). Disponível em: <http://www.hernia.tv> acesso em 01/07/2006.....9

Prancha 4. Próteses de origem natural ..... 13

Figura 1. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, absorvíveis, de origem biológica. Em (A, B, e C), biomembranas de colágeno derivado de submucosa intestinal porcina e liofilizadas (Cook sis technology®); Em (D), biomembrana de colágeno extraído de tecido bovino (Zimmer®), detalhe da estrutura em (E). Em (F), biomembrana de colágeno derivado de pericárdio bovino (Synovis surgical innovations®); Disponíveis em: [www.cookbiotech.com](http://www.cookbiotech.com), [www.zimmer.com](http://www.zimmer.com), [www.synovis.com](http://www.synovis.com). ..... 13

Figura 2. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, absorvíveis, de origem biológica. Em (A), biomembrana de colágeno derivado de submucosa intestinal porcina e liofilizadas (Genderm® Baumer Ltda); Em (B), biomembrana de quitosana, estudo experimental. Em (C), biocurativos de látex de seringueira (Biocure® - Pelenova); Em (D), Biomembrana de colágeno e quitosana, estudo experimental. Disponíveis em: <http://www.genius.ind.br/>, [www.techreview.com](http://www.techreview.com), [www.cift.res.in](http://www.cift.res.in), [www.revistapesquisa.fapesp.br](http://www.revistapesquisa.fapesp.br), respectivamente. .... 13

## Capítulo 2

Prancha 5. Estrutura molecular do colágeno.....24

Figura 1. Estrutura do colágeno: Em A e B, microscopia eletrônica de transmissão de fibra de colágeno do tipo I. Em C, representação esquemática de fibra de colágeno composto pela subunidade tropocolágeno (D). Em E a formação em hélice tripla das subunidades do tropocolágeno. Na imagem F a composição pelos aminoácidos Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hypro) das subunidades de tropocolágeno. Adaptado de EASTOE, 1967 .....24

Figura 1. Ilustração esquemática da hidrólise dos resíduos de glutamina e asparagina presentes no colágeno em meio alcalino. Adaptado de BET et al., 2001. ....27

Figura 2. Algoritmo de obtenção das amostras a serem caracterizadas.....28

Prancha 6. Análise térmica e microscopia eletrônica de varredura.....33

Figura 1. Gráfico das curvas de calorimetria exploratória diferencial com as respectivas temperaturas de desnaturação do colágeno para as amostras dos grupos controle (GC), tratados por 24 horas (G24), 48 horas (G48), por 72 horas (G72), por 120 horas (G120) e por 144 horas (G144). Fluxo O<sub>2</sub>, sob 100C/min, com intervalo de temperatura de 25 a 80oC. ....33

Figura 2. Fotomicrografias das amostras submetidas à conservação em solução alcalina por 72 horas (A) e 144 horas (B). Observa-se a expansão das zonas menos densas do material em virtude do aumento do tempo de conservação em solução alcalina (vetores de sentido duplo). Aumento de 500 vezes.....33

### Capítulo 3

Prancha 7. Reações orgânicas à implantação de biomateriais.....41

1. Fluxograma das respostas inflamatórias quando biomateriais são introduzidos em um organismo vivo. Adaptado de HENCH et al., (2006). \*PMMA - Polimetilmetacrilato .....41

Figura 1. Algoritmo de obtenção das amostras a serem implantadas.....46

Prancha 8. Procedimento de implantação das amostras .....49

Figura 1. Em (A), esquema representativo das amostras implantadas na fáscia interna do músculo reto do abdome dos eqüinos. Alternou-se a posição das amostras dos três grupos, conforme a variação de cores na ilustração. Em (B), fotografia Digital do abdômen de eqüino após o procedimento cirúrgico de implantação e sutura da pele.....49

Figura 2. Aspecto das amostras recém implantadas na fáscia interna do músculo reto do abdome (A). As amostras foram colocadas em uma distância mínima de 4 cm em relação às adjacentes do mesmo bloco de implantes. Em (B), amostras do grupo 2 submetidas à solução de antibiótico 15 minutos antes da implantação.....49

Figura 2. Gráfico ilustrativo da capacidade de hidratação das amostras dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Cada círculo, ou quadrado nas linhas do gráfico representa a média a partir de dez amostras. Ensaio realizado com imersão das amostras em tampão fosfato salino, pH 7,4, durante períodos de tempo que variaram de três a 90 minutos. ....53

Prancha 9. Aspecto microscópico dos implantes. ....60

Figura 1. Fotomicrografia digital ilustrando o aspecto da membrana colagênica tratada em solução alcalina (A), nas quais se pode verificar discreto infiltrado inflamatório no interior do implante (setas) e os locais de passagem da sutura, indicadas por "S", fragilizando a membrana e expondo-a as células leucocitárias. H.E. 10X. Em B nota-se, em objetiva de 40X, a formação inicial de cápsula fibrosa (entre as setas). Coloração H.E. Amostra retirada sete dias pós-implante .....60

Figura 2. Fotomicrografia digital ilustrando o aspecto da membrana colagênica tratada em glicerina a 98% (A), nas quais se pode verificar infiltrado

inflamatório no interior do implante mais acentuado (setas) em relação ao grupo experimental e os locais de passagem da sutura, indicadas por "S", fragilizando a membrana e expondo-a as células leucocitárias. H.E.10X. Em B nota-se, em objetiva de 40X, as células inflamatórias no interior do implante. Coloração H.E. Amostra retirada sete dias pós-implante .....60

Prancha 10. Aspecto microscópico dos implantes .....61

Figura 1. Em (A), fotomicrografia digital de amostra do grupo glicerina onde se notam partículas do fio de sutura (setas escuras largas) sob ação celular (setas escuras estreitas). Objetiva de 40X. Coloração H.E. Amostras retiradas sete dias pós-implantação. Comportamento semelhante em todas as amostras dos três tratamentos. Em (B), fotomicrografia digital de amostra do grupo controle, destacando célula gigante multinucleada do tipo corpo estranho (seta branca). Objetiva de 40X. Coloração H.E. ....61

Figura 2. Em (A), fotomicrografia digital de amostra tratada em solução alcalina, retirada após 126 dias de implantação. Verifica-se ao centro, preenchimento do local, antes ocupado pela biomembrana, por fibroblastos e fibrócitos, tipificando cicatrização da ferida. Ao redor da cicatriz nota-se a composição de fibras colagênicas. Em "S", verifica-se local de passagem de sutura e fragmentos de fio de sutura apontados pelas setas. H.E. 20X. Em (B), fotomicrografia digital de amostra tratada em solução alcalina, retirada após 63 dias de implantação. Observam-se vasos neoformados próximos à membrana (setas escuras largas) e fragmentos de fio de sutura sob ação celular (setas escuras estreitas). O local de passagem do fio de sutura está indicado por "S". As setas brancas delimitam o espaço no qual nota-se a formação de cápsula fibrosa. H.E. 20X.....61

Prancha 11. Atividade celular no processo inflamatório .....64

Figura 1. Gráfico da concentração de polimorfonucleares das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).....64

Figura 2. Gráfico da concentração de linfócitos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).....64



Prancha 12. Atividade celular no processo inflamatório .....66

Figura 1. Gráfico da concentração de macrófagos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).....66

Figura 2. Concentração de fibroblastos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE). .....66

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1. Classificação dos biomateriais utilizados na reparação de defeitos da parede abdominal proposta por BELLÓN (2005).....	7
--	---

### Capítulo 2

Tabela 1. – Possíveis aplicações biomédicas do colágeno. Adaptado de GRINNELL et al., 1999; GOISSIS et al., 1999.....	26
---	----

Tabela 2. Médias e desvios padrões das porcentagens de massa degradada das amostras obtidas a partir de centro tendinoso diafragmático de eqüinos, submetidas à solução de colagenase durante 3 horas.....	34
--	----

### Capítulo 3

Tabela 1. Alterações histopatológicas examinadas nas lâminas preparadas a partir da retirada de amostras dos grupos controle, glicerina e experimental implantadas no reto do abdome de eqüinos. Distribuição em ordem alfabética. ....	51
---	----

Tabela 2. Médias e desvios padrões da capacidade de hidratação das amostras dos grupos controle e experimental, imersos em solução tampão fosfato durante períodos que variaram de três a 90 minutos. ....	53
--	----

Tabela 3. Classificação do nível de dificuldade de retirada das amostras dos grupos controle, glicerina e experimental, implantados na parede abdominal dos eqüinos. ....	54
---	----

Tabela 4. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de polimorfonucleares. ....	55
--	----

Tabela 5. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de linfócitos.....	56
Tabela 6. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de macrófagos nas lâminas analisadas.....	57
Tabela 7. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de fibroblastos. ....	58
Tabela 8. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de vasos sanguíneos formados, nas lâminas analisadas.....	59

#### **Capítulo 4**

Tabela 1. Resumo dos entraves e ações necessárias para o desenvolvimento da área de produção de enxertos e arcabouços no Brasil. Fórum de Biotecnologia Biomateriais – UFRJ, 2005, adaptado de SOARES et al., 2005.....	72
---	----

## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. INTRODUÇÃO**

As afecções da parede abdominal podem ser de origem genética, congênita ou adquirida, sendo as hérnias ventrais as intercorrências cirúrgicas mais comuns em humanos e animais (CARLSON, 1997; DRIVER et al., 2000; DAVENPORT et al., 2001).

Especificamente em eqüinos, submetidos a intervenções cirúrgicas abdominais medianas, foram relatadas complicações incisionais com prevalência de 35%, ou mesmo 87,5% quando de uma reintervenção (KOBLOK et al., 1989). Segundo AUER (1992), 22% dos eqüinos são reoperados em conseqüência à deiscência de suturas.

WILSON et al., (1995), encontraram prevalência de 4 a 15% de complicações após laparotomia em eqüinos de até um ano de idade contra 43% em adultos, de um total de 436 animais analisados. As raças Puro Sangue Inglês e Quarto de Milha possuem maior prevalência de complicações incisionais com índice de até 52% e 53,8%, respectivamente.

SMEAK (1993) referiu que para grandes animais, a prevalência de hérnia incisional é de 16%, dependendo da abordagem cirúrgica, de certos fatores predisponentes e da idade do paciente.

Em animais de pequeno porte é menos comum a ocorrência de deiscência de sutura, no entanto, está associada às lesões por automutilação, mesmo que a evolução seja de minutos, podendo levar a perda severa de sangue, sepsia e choque (RAISER, 1999).

De forma geral, o sucesso dessas cirurgias está associado à qualidade dos materiais de sutura utilizados, ao padrão de sutura, à realização de assepsia e anti-sepsia adequadas e à imobilização apropriada do animal. Alguns fatores sistêmicos estão associados à deiscência de suturas como infecções, desbalanço hidroeletrólítico, anemia, hipoproteinemia, imunossupressão, utilização de corticosteróides e distensão abdominal, entre outros (AUER, 1992; GREER & PEARSON, 1998).

As complicações incisionais na laparotomia mediana retardam a cicatrização da ferida cirúrgica aumentando o período de convalescença e algumas podem ser fatais. Em eqüinos jovens, a cicatrização é mais rápida, com menor susceptibilidade a infecções (STASHAK, 1991).

O uso de próteses trouxe importante melhora na sobrevivência dos portadores de defeitos de tecidos moles e otimização das técnicas cirúrgicas. Porém, estes materiais não preenchem todos os critérios de biocompatibilidade, trazendo complicações em longo prazo e a necessidade de reoperações (SOIDERER et al., 2004).

A utilização de materiais biológicos causa grandes defeitos no local doador, podendo cursar com distrofias e atrofia muscular. O material ideal deveria ser tendinoso, evitando com isso a formação de hérnias ventrais no caso de utilização em parede abdominal e satisfazer os critérios de biocompatibilidade e bioatividade nos locais variados de utilização (SILVERMAN et al., 2004).

## **2. PAREDE ABDOMINAL: COMPOSIÇÃO TECIDUAL E REGIÕES DE ACESSO CIRÚRGICO À CAVIDADE ABDOMINAL**

O termo parede abdominal é uma denominação genérica a todos os tecidos que compõem e delimitam o abdômen. A cavidade abdominal é limitada, dorsalmente, pelas vértebras lombares, músculos lombares e parte lombar do diafragma. Ventralmente consiste em dois músculos retos, aponeuroses dos músculos oblíquos e transversos, fáscia abdominal e cartilagem xifóide (Prancha 1, Figura 1). Cranialmente é formada pelo diafragma e as paredes musculares estão forradas por uma camada de fáscia, denominadas de fáscia diafragmática, fáscia transversa, fáscia ilíaca e camada profunda da fáscia toracolombar (SISSON, 1986).

A forração da cavidade abdominal é feita pelo peritônio que está unido à fáscia por um tecido subseroso, contendo quantidades variáveis de gordura e que envia lâminas para o interior de várias pregas peritoniais (SISSON, 1986).

O acesso cirúrgico à cavidade abdominal pode ser longitudinal ou transversal em relação à linha mediana. Longitudinalmente pode ser feito pela linha média ou paralelamente a ela, denominadas paramedianas, cujas incisões podem ser pré-umbilicais, retro-umbilicais e pré-retroumbilicais.

Em relação à abertura do músculo reto do abdome, pode-se incisar de forma para-retal ou trans-retal. Existem ainda outras formas de acesso como o paracostal, pelo flanco ou combinação delas, de acordo com a necessidade cirúrgica e facilidade em expor o local de interesse do cirurgião, conforme ilustrado na Prancha 1, Figura 2 (AUER, 1992).

**Prancha 1. Composição tecidual e acessos cirúrgicos à cavidade abdominal**

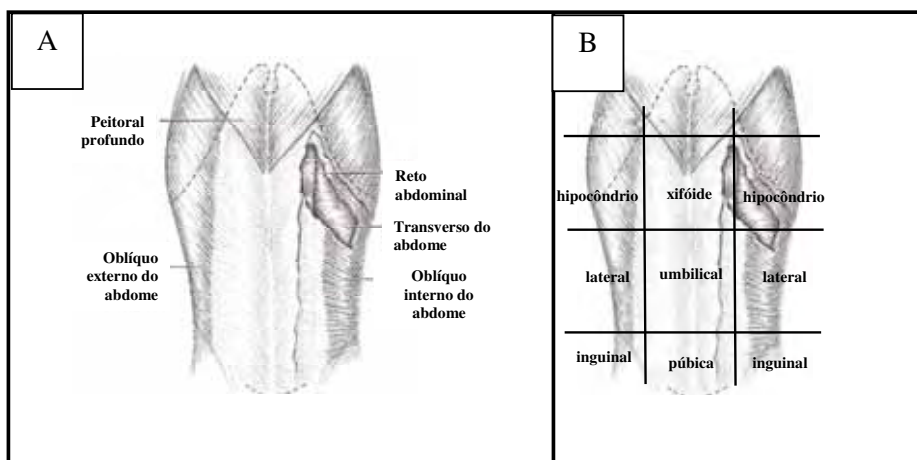


Figura 1. Ilustração esquemática da composição tecidual da porção ventral do abdômen na espécie canina. Músculos e fâscias da porção mais externa da parede abdominal (A). Em (B), representação da designação externa das regiões abdominais. Adaptado de LEGGI, 2000<sup>1</sup>.

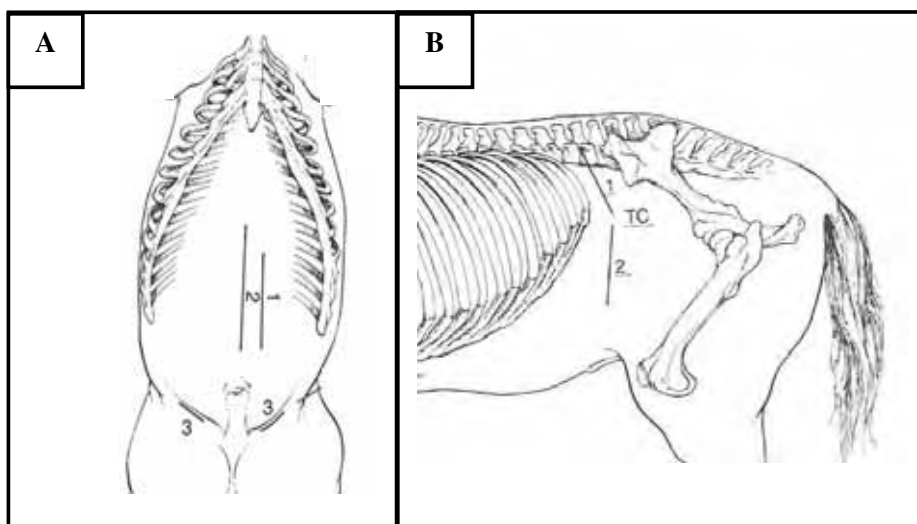


Figura 2. Representação esquemática das vias de acesso cirúrgico à cavidade abdominal de eqüinos. Acesso ventral em (A): 1- Incisão paramediana; 2 – Incisão mediana; 3 – Incisão inguinal. Acesso pela região do flanco em (B): 1 – Incisão paralombar; 2 – Incisão transversa; TC – tuberosidade coxal. Adaptado de AUER, 1992<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> LEGGI, T. C. S. S.; SOARES, T. R. S. **Atlas de anatomia veterinária**. Manole: São Paulo, 88p., 2000.

<sup>2</sup> AUER, J.A. **Equine Surgery**. W.B. Saunders. Philadelphia, 1214p., 1992.

### **3. BIOMATERIAIS PARA REPARAÇÃO DE TECIDOS DA CAVIDADE ABDOMINAL: ESTADO DA ARTE**

Em relação à utilização de biomateriais, os achados arqueológicos remetem aos etruscos, fenícios e egípcios, entre outros, que substituíam dentes perdidos por pontes obtidas a partir de ossos bovinos, ou utilizando materiais para manter a união dos dentes. Na tentativa de confecção de prótese de dedo amputado, os egípcios produziram peças de madeira que eram mantidas com cola e amarrados com couro ao pé do amputado. Foram encontradas múmias com essas próteses no século XX em bom estado de conservação (Prancha 2, Figuras 1 e 2) (KLEIN et al., 2000).

Atualmente, biomateriais podem ser resumidamente definidos como materiais para utilizações em organismos vivos e são classificados em sintéticos, que incluem os metais, cerâmicas, polímeros sintéticos e materiais compósitos; e biomateriais naturais, que incluem biopolímeros como: colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e os tecidos naturais (LANGER, 1990; HENCH, 1998).

Especificamente e de forma histórica, para utilização em abdômen, consta a utilização de telas de prata no fechamento de grandes hérnias em humanos por Witzel e Goepel, em 1889, telas de aço por Babcock em 1939, e telas de tântalo por Burke em 1940 (OTTO, 2003).

A partir de 1950 tornou-se comum o uso das próteses sintéticas não absorvíveis como náilon, politetrafluoroetileno, silicone, poliéster, polipropileno, esponja de polivinil, fibras de carbono e das próteses sintéticas absorvíveis feitas de poliglactina 910 ou ácido poliglicólico (BAERG et al., 2003).

No Brasil, o trabalho pioneiro de PIGOSSI (1964), que utilizou dura-máter homogênea conservada em glicerina em cães, impulsionou a realização de diversas aplicações de biomembranas, inclusive na parede abdominal de diversas espécies (ALVARENGA, 1992). Além disso, a importância da utilização de tecidos biológicos têm sido destacada em trabalhos recentes, indicando que a interface biomaterial/tecidos parece ser otimizada em relação ao crescimento celular, diminuição da infecção e aderências (GRECA et al., 2001).

CLARKE et al., (1996) utilizaram experimentalmente em cães, malhas de polipropileno e submucosa de intestino delgado suíno e, mediante análises histopatológica e imunohistoquímica no primeiro, segundo e quarto meses pós-



operatórios e inspeção diária da ferida cirúrgica, os autores concluíram que a submucosa de intestino delgado apresentou resultados mais satisfatórios que a malha de polipropileno.

BADYLAK et al., (2002), analisando o uso da matriz extracelular derivada da submucosa do intestino delgado de suínos no reparo de defeitos da parede abdominal de cães e ratos e, mediante análise histológica, verificaram que este material é tão efetivo a longo prazo quanto malhas de polipropileno, porém com menores índices de infecção e aderências.

GAMBA et al., (2002), pesquisaram o uso da matriz extracelular derivada da submucosa do intestino delgado de suínos em defeitos da parede abdominal de coelhos e concluíram que este tipo de enxerto sustenta a migração fibroblástica, o depósito de colágeno e a neovascularização.

Um estudo de correção da parede abdominal em ratos com tela de polipropileno (grupo 1) e tela de polipropileno revestida de colágeno (grupo 2), verificou-se maiores taxas de infecção nos animais do grupo 2, contudo, estes apresentaram também menor número de aderências (RIET et al., 2004).

SOIDERER et al., (2004) compararam em ratos as próteses utilizadas nos reparos da parede abdominal constituídas de diferentes materiais: tela de polipropileno, material colágeno derivado de suíno, submucosa de intestino delgado, matriz da cápsula renal e submucosa da bexiga urinária suína. Os autores concluíram que o tratamento com tela de polipropileno apresentou resposta inflamatória mais intensa.

Telas de propileno e implantes de submucosa intestinal porcina em ratos foram comparadas por GRECA et al., (2004), concluindo que a tela de polipropileno apresentou maior número de aderências entre a tela e as alças intestinais. A mesotelização, assim como a deposição de colágeno, foram significativamente mais intensa no grupo da submucosa.

BASTOS et al., (2005), compararam a resistência tênsil de implantes do peritônio bovino com tela de polipropileno, na correção de defeito provocado na parede abdominal de ratos. Os testes de resistência à tração não mostraram diferença entre os grupos estudados, tanto no 7º quanto no 28º dias de pós-operatório.

O baixo rendimento das próteses sintéticas em relação aos tecidos biológicos estimulou, recentemente, mudanças microestruturais das telas sintéticas. As próteses reticulares de polipropileno tiveram seus poros aumentados, diminuindo, conseqüentemente a quantidade de material utilizado. Essas próteses foram denominadas de polipropileno de poros amplos e baixa densidade “lightweight” e apresentaram integração tissular semelhante às convencionais sem perder características biomecânicas de resistência (BELLÓN, 2005).

As próteses laminares também sofreram alterações estruturais, como as de politetrafluoretileno expandido que receberam uma superfície rugosa para aumentar a adesão celular (BELLÓN, 2005), (Prancha 3, Figuras 1 e 2).

BELLON (2005), revisando essas alterações nas próteses de última geração mostrou melhora no desempenho dos materiais sintéticos e propôs uma nova classificação das próteses, incluindo a hibridação com materiais biológicos (Tabela1).

Tabela 1. Classificação dos biomateriais utilizados na reparação de defeitos da parede abdominal proposta por BELLÓN (2005).

<b>Próteses</b>	<b>Materiais</b>
<b>Reticulares</b>	
Não absorvíveis	<i>Polipropileno (alta e baixa densidade); poliéster</i>
Parcialmente absorvíveis	<i>Polipropileno/Poliglactina 910</i>
Absorvíveis	<i>Ácido poliláctico; Poliglactina 910</i>
<b>Laminares</b>	
Não absorvíveis	<i>Politetrafluoretileno expandido; Poliuretano;</i>
Absorvíveis	<i>Submucosa intestinal porcina; Pericárdio bovino; Centro Tendinoso Diafragmático</i>
<b>Compostas</b>	
Não absorvíveis	<i>Polipropileno/ Politetrafluoretileno expandido; Polipropileno/poliuretano</i>
Parcialmente absorvíveis	<i>Polietilenoglicol/poliéster; polietilenoglicol/polipropileno</i>

**Prancha 2. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes**



Figura 1. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes. Em A, fios metálicos par manter a união de dentes bovinos, utilizados pelos egípcios. Em B, Implantes dentários ornamentais, como forma de afirmação do estatuto social da Civilização Maia. Em C e D próteses de dedo, constituída de madeira, substituindo dedo amputado. Material encontrado em múmia egípcia datada de 1000 anos antes de Cristo. Disponível em <http://terraeantiquae.blogia.com/> acesso em 01/07/2006.

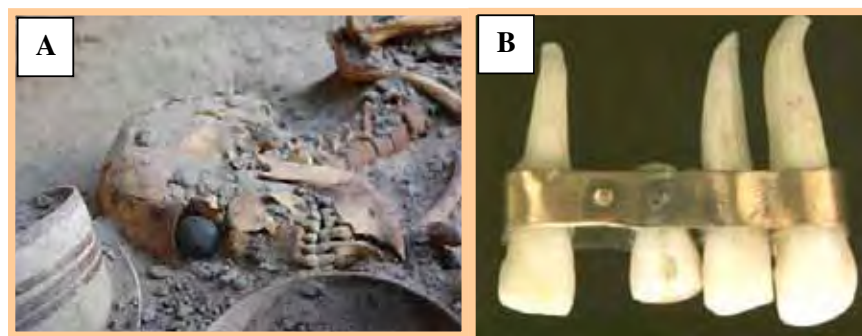


Figura 2. Achados arqueológicos de materiais utilizados como implantes. Em A, cadáver mumificado de uma mulher, com esfera de resina como prótese ocular. Encontrado no Irã e datado de 4800 anos. Em B, fragmento de dentadura etrusca, cujo dente pântico se perdeu. Refere-se que o dente perdido era de origem bovina e permanecia preso por rebite à lâmina de ouro. Disponível em <http://www.manuelgago.org/blog> Acesso em 01/07/2006.

### Prancha 3. Próteses de origem sintética

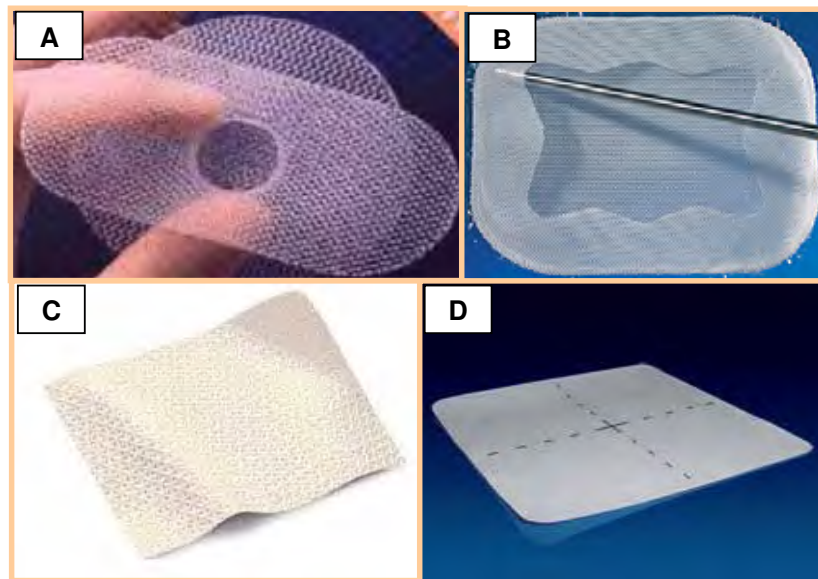


Figura 1. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, inabsorvíveis sintéticas. Em (A), malha de polipropileno (Marlex®); Em (B), malha de poliéster (gore-TEX®); Em (C) malha de politetrafluoretileno expandido (ePTFE – gore-TEX®); Em (D), malha de polipropileno associada a politetrafluoretileno expandido (Cousin biotech®). Disponível em: <http://hernia.tripod.com/> acesso em 01/07/2006.

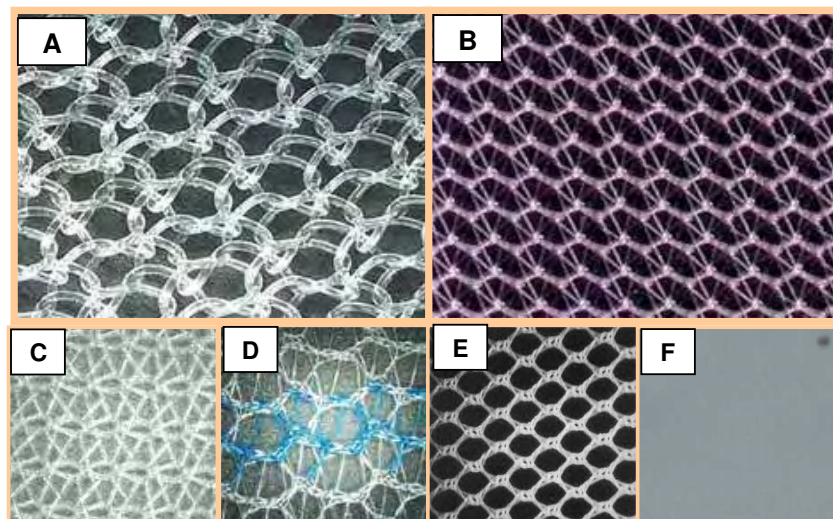


Figura 2. Microestruturas de próteses cirúrgicas para tecidos moles inabsorvíveis sintéticas. Em (A), malha de polipropileno (Marlex®); Em (B), malha de polipropileno (Prolene®); Em (C) malha de polipropileno de alta densidade (Prolene®); Em (D), malha de polipropileno de baixa densidade e poros amplos (Prolene®); Em (E), malha de polipropileno de baixa densidade e poros amplos com estrutura regular (Prolene®); Em (F), malha de Politetrafluoretileno expandido (ePTFE – gore-TEX®). Disponível em: <http://www.hernia.tv> acesso em 01/07/2006.

### **3.1. MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO DE TECIDOS ANIMAIS**

A utilização das membranas biológicas requer diferentes técnicas de conservação para preservar sua viabilidade e diminuir sua antigenicidade. Segundo PRISTA et al., (1990) citado por RABELO et al., (2004), a preservação dos implantes não pressupõe a manutenção da viabilidade celular, sendo que a eficiência da cirurgia reparadora, geralmente, está associada à reação biológica de reparação e não à sobrevivência dos elementos celulares presentes no implante, uma vez que o implante funciona como um arcabouço ou suporte temporário à migração de fibroblastos.

Além disso, os agentes conservantes são substâncias dotadas de ação germicida ou germiostática e se destinam a evitar as alterações que possam ocorrer em qualquer conservado, proveniente de proliferação microbiana. A preservação tem sido feita por congelamento ou por agentes químicos, como as soluções mercuriais (RAISER et al., 2001), ácido acético glacial (PAULO, 1997), ácido peracético e glicerina (PAULO, 1997).

A glicerina a 98% foi amplamente utilizada para conservar diferentes tecidos nas últimas quatro décadas, como dura-máter (PIGOSSI et al., 1964), peritônio de bovino e de cão (DALECK et al., 1992), pericárdio de equino (RANZANI et al., 1990), diafragma de cães (MAZZANTI et al., 2000), bexiga de cão (OLIVEIRA et al., 2000) entre outros. A glicerina 98% mantém a vitalidade celular (LEITE et al., 1979) e seu modo de ação está baseado na desidratação das células (PIGOSSI et al., 1964), à qual se atribui ação anti-séptica, atuando contra fungos e bactérias gram-negativas e gram-positivas, com exceção para as formas esporuladas (PIGOSSI, 1967).

Além da glicerina, verificou-se também a eficácia da solução alcoólica de tintura de timersol 1:1000 (ALVARENGA, 1992), polivinilpirrolidona (COSTA-NETO et al., 2000), solução hipersaturada de açúcar (COSTA-NETO et al., 1997), mel não processado (AMENDOLA, 2000) e solução hipersaturada de sal como alternativas de baixo custo (BRUN et al., 2002).

### **3.2 MÉTODOS DE ALTERAÇÃO MOLECULAR DE TECIDOS ANIMAIS**

Modificações químicas em alguns tecidos animais constituem-se em alternativas de elevado potencial para melhorar ou modificar as propriedades do

colágeno neles contidos, sejam elas mecânicas, estruturais ou físico-químicas. Matrizes colagênicas com superfícies carregadas podem ser produzidas por reações químicas como a esterificação, succinilação e desaminação (JAYAKRISHNAM & JAMELA, 1996).

GOISSIS et al., (1999) utilizaram solução alcalina em tecidos animais, o que reduziu a imunogenicidade, em virtude da hidrólise dos grupos carboxiamidas e otimizou as propriedades piezoelétricas do colágeno, atuando como estimulador físico-químico de crescimento celular. Esta modificação conduz a um aumento total de até 106 cargas negativas por unidade de tropocolágeno após tratamento alcalino (BET et al., 2001). Porém, caracterizações físico-químicas por espectroscopia na região do infravermelho sugeriram que a estrutura em hélice tripla do tropocolágeno foi preservada durante a hidrólise (GOISSIS et al., 1999).

PARREIRA (2004) utilizou o processo de hidrólise alcalina em pericárdio bovino em amostras tratadas por 24 e 48 horas e as implantou no subcutâneo de ratos, observando o comportamento de integração tissular até 180 dias. Essas matrizes tiveram diferença significativa ( $p \leq 0,01$ ), em relação ao grupo controle, na redução de fibrosamento e ausência de resposta inflamatória crônica.

VULCANI et al., (2006) utilizaram centro tendinoso diafragmático tratado em solução alcalina por 72 horas e liofilizado, obtendo biomembrana de quinze centímetros de comprimento e aproximadamente nove centímetros de largura. Após esterilizada em óxido de etileno aplicou-se cirurgicamente em égua com hérnia umbilical recidivante, em virtude de pouco tecido disponível para fechamento das bordas cirúrgicas. Não houve rejeição do material e nem alterações dos parâmetros clínicos observados. O implante foi avaliado por ultra-sonografia, na qual se observou que não houve aderência da biomembrana e a motilidade intestinal estava normal. Nenhuma alteração digna de nota foi descrita pelo avaliador.

O grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo têm trabalhado com a preparação de biomateriais a base de quitosana, um derivado da quitina, obtido principalmente de crustáceos. Por meio de reações de desacetilação parcial da quitina obtém-se a quitosana, um polieletrólito catiônico (em meio ácido), que estruturalmente é um polissacarídeo

linear com um número variável e randomicamente localizado de grupos N-acetilglucosamina.

Em meio às diversas aplicações da quitosana, é sabido do seu efeito cicatrizante, devido à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago. Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1, que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, N-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de Nacetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessárias à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos. Além disso, é um material que pode ter sua capacidade tênsil alterada por reticulações com outras substâncias, por isso têm sido indicado como regenerador de tecidos moles, inclusive na parede abdominal (Prancha 4, Figura 2B) (SILVA et al., 2006).

### **3.3 BIOMATERIAIS DE ORIGEM VEGETAL**

Biomembranas de látex natural da seringueira foram desenvolvidas no Laboratório de Neuroquímica do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Prancha 4, Figura 2C). Segundo PAULO et al., (2005), esse material se comporta induzindo a formação de uma base de tecido conjuntivo/fibroso, capaz de suportar o conteúdo abdominal, mas não se incorpora aos tecidos receptores, sendo eliminado aproximadamente aos 14 dias após a sua implantação.

Porém, RABELO et al., (2004), empregaram o látex em compósito com tela de náilon em herniorrafias em bezerras portadoras de hérnia umbilical e não houve eliminação do material. Todas as propriedades observadas no material têm sido atribuídas à presença de um possível fator de crescimento na sua composição, que atuaria promovendo a neovascularização, adesão celular e formação de matriz extracelular.

PAULO et al., (2005) utilizaram látex de seringueira associados ou não com polilisina e compararam com telas de polipropileno, concluindo similaridade da capacidade na reparação de defeitos abdominais em ratos.

#### Prancha 4. Próteses de origem natural

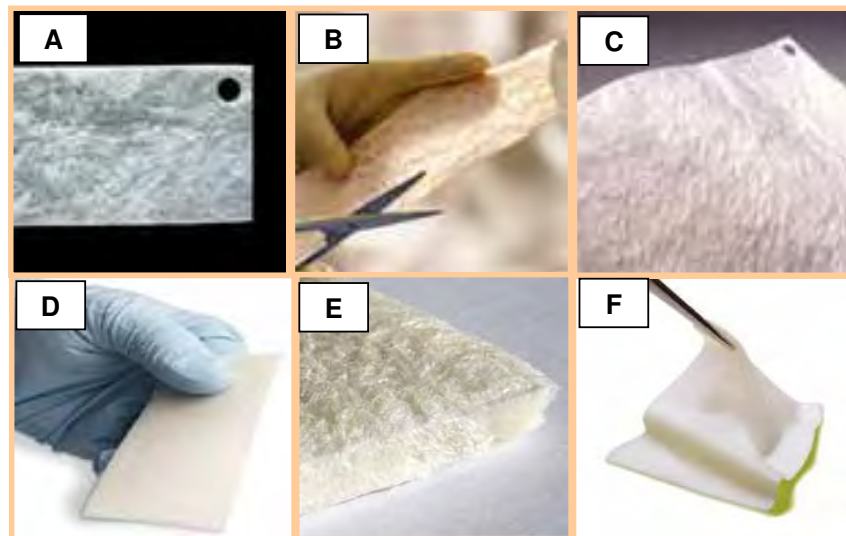


Figura 1. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, absorvíveis, de origem biológica. Em (A, B, e C), biomembranas de colágeno derivado de submucosa intestinal porcina e liofilizadas (Cook sis technology®); Em (D), biomembrana de colágeno extraído de tecido bovino (Zimmer®), detalhe da estrutura em (E). Em (F), biomembrana de colágeno derivado de pericárdio bovino (Synovis surgical innovations®); Disponíveis em: [www.cookbiotech.com](http://www.cookbiotech.com), [www.zimmer.com](http://www.zimmer.com), [www.synovis.com](http://www.synovis.com).



Figura 2. Próteses cirúrgicas para tecidos moles, absorvíveis, de origem biológica. Em (A), biomembrana de colágeno derivado de submucosa intestinal porcina e liofilizadas (Genderm® Baumer Ltda); Em (B), biomembrana de quitosana, estudo experimental. Em (C), biocurativos de látex de seringueira (Biocure® - Pelenova); Em (D), Biomembrana de colágeno e quitosana, estudo experimental. Disponíveis em: <http://www.genius.ind.br/>, [www.techreview.com](http://www.techreview.com), [www.cift.res.in](http://www.cift.res.in), [www.revistapesquisa.fapesp.br](http://www.revistapesquisa.fapesp.br), respectivamente.



#### 4. DISCUSSÃO

Conforme DIBELLO et al., (1996), a obtenção ou desenvolvimento de um biomaterial para utilização na parede abdominal deve seguir alguns conceitos: prevenir a eventração, incorporar o remanescente da parede abdominal, prover suporte muscular dinâmico, promover a aproximação livre de tensão e assegurar que a parede reconstruída tenha sua força aumentada ao longo do tempo.

As telas de material sintético apresentavam maior resistência em relação aos materiais naturais. No entanto, com novos métodos de preservação e obtenção de membranas biológicas, a resistência pode ser aumentada (GAMBA et al., 2002; RIET et al., 2004). Em verdade, os materiais biológicos adaptam-se mais facilmente como implantes e funcionam não apenas como arcabouços para migração de fibroblastos, mas também como sinalizadores celulares, proporcionando, muitas vezes, o crescimento de tecido regenerado (GRECA et al., 2004; SILVA et al., 2006).

Em discordância à colocação de PRISTA et al., (1990) de que o implante deve funcionar apenas como um arcabouço ou suporte temporário à migração de fibroblastos, as novas definições para biomateriais de última geração consideram necessária a estimulação, de alguma forma, na interface tecido/material:

Biomateriais modernos não devem apenas preencher espaço, mas sim, devem estar associados a uma resposta biológica específica, disparada por sinais que incluem: correntes elétricas, distribuição eletrônica, conformação molecular, estado de agregação ou propriedades físico-químicas locais particulares, características estas que podem ser introduzidas por arranjos especiais de grupos funcionais sobre uma estrutura polimérica, reações de reticulação, propriedades particulares de superfícies e arranjos macromoleculares (HENCH, 1998).

Além disso, os processos de tratamento, como o método alcalino (GOISSIS et al., 1999), tratamento do látex da seringueira (PAULO et al., 2005) e outros para a obtenção de biomateriais a partir de tecidos vegetais e animais podem ser mantidos em controle de qualidade por caracterizações físico-químicas, seguindo normas de produção e podem ser submetidos a esterilizações de grau cirúrgico.

## 5. CONCLUSÕES

Os trabalhos revisados sugeriram que o desenvolvimento de novas técnicas de alteração de tecidos orgânicos animais e vegetais proporcionaram melhor aceitação dos implantes pelos hospedeiros em relação aos materiais sintéticos. Isto em virtude do conhecimento multidisciplinar acerca dos mecanismos antigênicos presentes nos diversos materiais, das técnicas que possam modificá-los e da manutenção de estruturas moleculares que atuam como sinalizadores para a proliferação celular.

## 6. OBJETIVOS

Objetivou-se no presente trabalho processar biomembranas a partir de centros tendinosos diafragmáticos de eqüinos em solução alcalina por períodos de 24, 48, 72, 120 e 144 horas seguidas de liofilização e verificar as possíveis alterações macro e microscópicas proporcionadas pelo tratamento. Em seguida, implantar cirurgicamente na fáscia interna do músculo reto do abdome de eqüinos, amostras tratadas em solução alcalina por 72 horas seguida de liofilização, amostras tratadas em solução de glicerina a 98% e amostras apenas liofilizadas para serem posteriormente retiradas com sete, 63 e 126 dias após a implantação, para verificar a formação de aderência tecidual, aspectos morfométricos e eventos histopatológicos da cicatrização.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

ALVARENGA, J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: DALECK, C.R. **Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 1992. p.33-42.

AMENDOLA, G.F. et al. Traqueoplastia em coelhos com centro frênico canino conservado em mel. **Ciência Animal Brasileira**. v.1, suplemento, p.111, 2000.

---

<sup>2</sup>Conforme ABNT - NBR-6023/2002 - Atualizada em fevereiro de 2007

AUER, J.A. **Equine surgery**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1214p., 1992.

BADYLAK, S. et al. Estudo morfológico da submucosa do intestino delgado como dispositivo para reparo de paredes corporais. **Jornal da Pesquisa Cirúrgica**. v.8, p.190-202, 2002.

BAERG, J. Gastroschisis: A sixteen-year review. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v.38, n.5, p.771-774, 2003.

BASTOS, E.L. et al. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**. v.32, n.5, p.256-260, 2005.

BÉLLON, J.M. Propuesta de una nueva clasificación de prótesis destinadas a la reparación de defectos herniarios en la pared abdominal. **Cirúrgica Española**, v.78, n.3, p.148-151, 2005.

BET, M.R. et al. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. **Biomacromolecules**, v.2, p.074-1079, 2001.

BRUN, M.V. et al. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1019-1025, 2002.

CARLSON, M. A. Acute wound failure. **Surgical Clinics of North America**, Philadelphia, v.77, n.3, p.607-636, 1997.

CLARKE, K. M. et al. Intestine submucosa and polypropylene mesh for abdominal wall repair in dogs. **Journal of Surgical Research**, v.60, n.1, p.107-114, 1996.

COSTA-NETO, A. A.; PAES, J. L. L.; CARVALHO, R. G. et al. Concentração bactericida do açúcar em culturas de *Escherichia coli*. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 24, n. 3, p. 151-154, 1997.

COSTA-NETO, J. M. C. et al. Ação antimicrobiana da glicerina a 98% e da solução aquosa de iodo povidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, 4., 2000. Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia: CBCA, 2000. p. 97.

DALECK, C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

DAVENPORT, M. et al. Closed gastroschisis: Antenatal and postnatal features. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v.36, n.12, p.1834-1837, Dec. 2001.

DIBELLO, J.N., MOORE J.H. Sliding myofascial flap of the rectus abdominus muscles for the closure of recurrent ventral hernias. **Plastic Reconstructive Surgery**; v.98: p.464-699, 1996.

DRIVER, C. P. et al. The contemporary outcome of gastroschisis. **Journal of Pediatric Surgery**, New York, v.35, n.12, p.1719-1723, Dec. 2000.

GAMBA, P.G. et al. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. **Pediatric Surgery Internal**, New York, v.112, n.2, p. 110-120, 2002.

GOISSIS, G. et al. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.15, p.55-61, 1999.

GRECA F.H. et al. The influence of differing por sizes on the biocompatibility of two polypropylene meshes in the repair of abdominal defects: experimental study in dogs. **Hernia**; v.5 p.59-64, 2001.

GREER, R. T., PEARSON, P. T. Biomateriais In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**, v.1 1. ed. bras., São Paulo: Manole, 1998, Cap.3 p. 133-142.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, Guidford, v.19, n.4/5, p.419-423, 1998.

JAYAKRISHNAM, A.; JAMELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**, v.17, p.471-484, 1996.

KLEIN, A. W.; ELSON, M. L. The History of substances for soft tissue augmentation, **Dermatol. Surg.** v.26, p.1096-1105, 2000.

KOBLUK, C.N. et al. Factors affecting incisional complication rates associated with colic surgery in horses: 78 cases (1983-1985). **Journal of American Veterinary Medicine Assistance**, v.195, n.5, p.639-642, 1989.

LANGER, R. Future directions in biomaterials. **Biomaterials**, Guidford, v.11, n.9, p.738-745, 1990.

LEE, C.H. et al. Biomedical applications of collagen. **International Journal Pharma.**, v.221, p.1-22, 2001.

LEITE, J.B.F. et al. A glicerina e a preservação dos tecidos. **Revista Paulista de Medicina**, v.93, p.81-84, 1979.

MAZZANTI, A. et al. Reparação da traquéia de cão com segmento muscular homólogo de diafragma conservado em glicerina a 98%. **Ciência Rural**, v.30, n.6, p.1011-1016, 2000.

OLIVEIRA, L.O. et al. Implante homogêneo de bexiga conservada em glicerina a 98% para reparo da bexiga de cães. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, n.1, p.90-102, 2000.

OTTO, V. **Cures d'éventration avec renforcement par un filet de Mersilene® en position preperitoneale.** Genève, 2003, 90f. Tese (Doutorado) – Universidade de Genève.

PARREIRA, D. R. **Matrizes tridimensionais de colágeno aniônico:elastina como suporte para reconstrução de tecidos moles: um estudo de integração matriz:tecido.** 2004. 56p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

PAULO, N. M. **Estudo comparativo entre membrana amniótica de eqüino preservada em glicerina a 98% e em ácido acético glacial a 0,25 % no tratamento de feridas cutâneas experimentais no cão.** São Paulo, 1997. 62 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

PAULO, N. M. et al. Membrana de látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), com e sem polilisina a 0,1% e tela de marlex na reconstrução de defeitos iatrogênicos da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v.20, n.4, p.305-310, 2005.

PIGOSSI, N. **Implantação de dura-mater homogêna conservada em glicerina – estudo experimental em cães.** 1964. 41f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.

PIGOSSI, N. **A glicerina na conservação de dura-mater – estudo experimental.** 1967. 36f. Tese (Livre docência) - Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo.

RABELO R.E. et al. Características Físicas e Microbiológicas do Centro Tendíneo Diafragmático Bovino Conservado em Glicerina a 98% e no Glutaraldeído a 4% . **Ciência Animal Brasileira** v. 5, n. 4, p. 229-238, out./dez. 2004.

RABELO R.E. et al. Emprego da biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% na hernioplastias umbilical recidivante em bovinos leiteiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.41, p.233-234, 2004.

RAISER, A. G. Hérnia pós-incisão em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 29, n. 4, p. 689-695, 1999.

RAISER, A.G. et al. Homoimplante ortotópico de tendão calcâneo em cães. Conservação assepsia e implantação. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.89-94, 2001.

RANZANI, J.J.T. et al. Implante de pericárdio de eqüino em glicerina em solução de continuidade do diafragma de cão. **Brazilian of Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 1, p. 65-73, 1990.

RIET, M.V. et al. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating. **Surgical Endoscopy**, Berlin, v.18, n.4, p.681-685, 2004.

SILVA, H.S.R.C. et al. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quimica. Nova**, v.29, n.4, p.776-785, 2006.

SILVERMAN, R.P. et al. Restoring abdominal wall integrity in contaminated tissue-deficient wounds using autologous fascia grafts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v.113, n.2, p.673-675, Feb. 2004.

SISSON, S., GROSSMAN, J.D. **Anatomia dos animais domésticos**. 1. ed. bras. , Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 5 ed. v.1, 1986, p.85-89.

SOIDERER, E. E. et al. Morphologic study of three collagen materials for body wall repair. **Journal of Surgical Research**, New York, v.118, n.2, p.161-175, 2004.

STASHAK, T.S. Selected factors that affect wound healing. In: **Equine wound managment**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap.2, p.19-34.

VULCANI, V.A.S. et al. Biomembrana para reparação de hérnia incisional em laparotomia mediana em eqüino.. In: VII Congresso do Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 2006, Santos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2006. v.58, p.99-101.

WILSON, D.A. et al. Complications of celiotomy incisions in horses. **Veterinary surgery**, v.24, n.6, p.506-514, 1995.



## **CAPÍTULO 2 – OBTENÇÃO DE BIOMEMBRANAS DE COLÁGENO A PARTIR DE CENTROS TENDINOSOS DIAFRAGMÁTICOS DE EQUÍNOS: CONSIDERAÇÕES SOBRE A VARIÁVEL TEMPO NO TRATAMENTO ALCALINO DO MATERIAL**

### **RESUMO**

Neste trabalho, objetivou-se, a obtenção de biomembranas a partir de centros tendinosos diafragmáticos de eqüinos submetidos a soluções alcalinas por diferentes períodos de tempo. As amostras foram tratadas durante 24, 48, 72, 120 e 144 horas em solução alcalina, liofilizadas e analisadas quanto à flexibilidade, viabilidade para sutura e homogeneidade. Em seguida, as amostras obtidas e o material *in natura* foram caracterizados por calorimetria exploratória diferencial, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de degradação enzimática pela colagenase. As membranas tratadas por 72 horas em solução alcalina se mostraram mais homogêneas e flexíveis em relação às membranas tratadas por tempos menores e mais resistentes à sutura em relação às tratadas por tempos maiores em solução alcalina. A calorimetria exploratória diferencial demonstrou que não houve desnaturação do colágeno após o tratamento alcalino. Concluiu-se que o tratamento por 72 horas é o mais indicado para a implantação cirúrgica na parede abdominal de eqüinos.

**Palavras-chave:** membranas biológicas; tratamento alcalino; implante; análise térmica, caracterização físico química.

### **ABSTRACT**

The objective of this work was to obtaining biomembranes from equines tendineous diaphragmatic centers submitted to alkaline solutions at different times. The samples were treated during 24, 48, 72, 120 and 144 hours in alkaline solution and analyzed the flexibility, viability for suture and homogeneity. After that, the samples and the material *in natura* were characterized by differential scanning calorimetry, scanning electronic microscopy and biological stability *in vitro* hydrolysis of collagen by colagenase. The 72 hours alkaline treatment showed be intermediary in relation to flexibility, suture resistance and homogeneity. differential scanning calorimetry demonstrated that the alkaline treatment did not have denaturated the collagen. It

was concluded that the treatment for 72 hours is the most indicated for the surgical implantation.

**Key-words:** biological membranes; alkaline treatment; implant; thermal analyses, physical-chemical characterizations.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 COLÁGENO

Os organismos animais pluricelulares são abundantemente constituídos de colágeno, cuja principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta resistência elástica. Além de seu papel estrutural nos tecidos, o colágeno apresenta também a função de orientar tecidos em desenvolvimento (LEE et al., 2001).

Dentre os vários tipos de colágeno existentes, o colágeno do tipo I, o mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno, uma macromolécula linear, semiflexível com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. O tropocolágeno é formado por três cadeias polipeptídicas denominadas de cadeias  $\alpha$ , duas iguais ( $\alpha_1$ ) e uma diferenciada ( $\alpha_2$ ), contendo cada uma 1055 e 1029 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A estrutura primária destas unidades é caracterizada pela repetição do triplete Glicina (Gly), com conteúdo de 33%, Prolina (Pro), 12% e Hidroxiprolina (Hypro) 11%% (Prancha 5) (EASTOE, 1967).

Mediante interações entre as moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação de microfibrilas, as menores unidades estruturais do tecido conjuntivo que podem ser vistas em microscópio eletrônico de varredura como um filamento fino de 4 nm (NIMNI et al., 1998).

Após a formação das microfibrilas, inicia-se o processo de agregação denominado fibrilogênese para formar fibrilas insolúveis. Este processo in vitro, mostrou-se ser dependente da temperatura, força iônica e acidez e as fibrilas reconstituídas possuem características estruturais idênticas daquelas formas in vivo (AUBERTFOUCHER et al., 1992).

Como a formação das fibras no colágeno do tipo I ocorre a pH 6,4, tem-se neste valor a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja igual a zero (PIEZ, 1982) .

Prancha 5. Estrutura molecular do colágeno

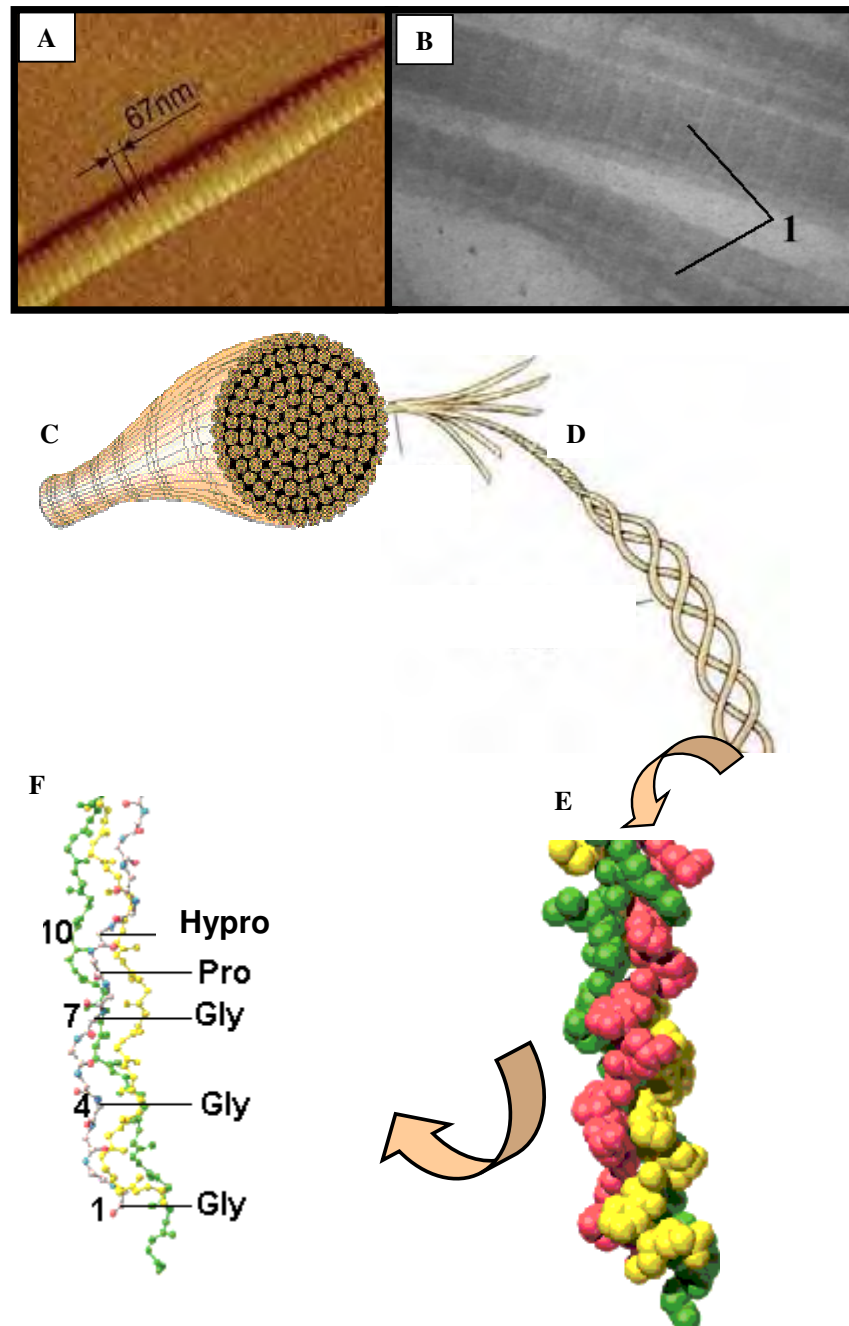


Figura 1. Estrutura do colágeno: Em A e B, microscopia eletrônica de transmissão de fibra de colágeno do tipo I. Em C, representação esquemática de fibra de colágeno composta pela subunidade tropocolágeno (D). Em E a formação em hélice tripla das subunidades do tropocolágeno. Na imagem F a composição pelos aminoácidos Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hypro) das subunidades de tropocolágeno. Disponível em <http://fig.cox.miami.edu> e <http://wwwfac.mcdaniel.edu>

Por meio de reações de esterificação, pode-se modificar a resultante das cargas produzindo matrizes carregadas positivamente (matrizes catiônicas). Sua aplicação como biomaterial é restrita, já que é um material altamente trombogênico quando comparada com matrizes de carga nula (nativas) (REID et al., 1993).

A produção de matrizes carregadas negativamente (matrizes aniônicas) pode ser feita por succinilação, tratamento com glutaraldeído, desaminação do grupo  $\epsilon$ -amino da lisina, proteção dos grupos guanidínicos dos resíduos de arginina ou por meio da hidrólise seletiva dos grupos amida das cadeias laterais dos resíduos de asparaginas e glutamina da proteína. As matrizes aniônicas são utilizadas como suporte para crescimento celular e em sistemas de liberação de fármacos (BET, 2000).

Até a década de 1980, a utilização do colágeno como biomaterial era restrita à produção de fios cirúrgicos principalmente devido à dificuldade de sua obtenção. A partir de então, a introdução de novos processos de obtenção de colágeno associadas às novas potencialidades de aplicação tanto na medicina quanto na odontologia, aumentaram significativamente o uso desta proteína como biomaterial nas formas de membranas, tubos, pós, esponjas, soluções injetáveis, entre outras (GOISSIS et al., 1999).

Essas aplicações do colágeno devem-se principalmente a algumas de suas propriedades importantes no desenvolvimento de biomateriais, como: baixa resposta imunológica; biodegradabilidade; habilidade em promover crescimento celular; propriedades hemostáticas; susceptibilidade a modificações químicas (GOISSIS et al., 1999).

Recentemente, seu uso vem aumentando consideravelmente como suporte biodegradável de crescimento celular na área da engenharia de tecidos, principalmente na forma de compósitos colágeno/elastina ou matrizes teciduais desvitalizadas. A extensão do seu uso nesta área está baseada no fato de que os polímeros naturais que formam a matriz extracelular, as proteoglicanas, colágenos e elastina, interagem com receptores específicos na superfície celular, participando ativamente dos processos que regulam a expressão fenotípica da célula e, portanto, na manutenção não apenas da morfologia e função do tecido, mas também de sua remodelagem (GRINNELL et al., 1999).

Colágeno solúvel é obtido por processos físico-químicos e pode ser utilizado na forma de filme, esponja ou gel na liberação controlada de fármacos. Sua combinação com fosfatos de cálcio tem sido relatada em estudos de liberação de antibióticos e na melhora da estabilidade dos lipossomas (GOISSIS et al., 1994). A Tabela 1 apresenta algumas das aplicações biomédicas do colágeno.

Tabela 1. – Possíveis aplicações biomédicas do colágeno. Adaptado de GRINNELL et al., 1999; GOISSIS et al., 1999.

<b>FORMA</b>	<b>APLICAÇÕES</b>
Colágeno: cerâmicas fosfatadas	<i>Reconstrução de tecidos</i>
Compósitos	<i>Reconstrução óssea.</i>
Esponjas	<i>Agentes hemostáticos</i>
Gel de colágeno injetável	<i>Preenchimento</i>
Membranas, esponjas, géis biodegradáveis	<i>Sistemas de liberação de fármacos</i>
Membranas	<i>Membranas periodontais</i>
Próteses	<i>Válvulas cardíacas</i>
Revestimento	<i>Próteses vasculares</i>

Em busca de métodos de tratamentos para obtenção de biomembranas, (GOISSIS et al., 1999) utilizaram solução alcalina em tecidos animais, o que reduziu a imunogenicidade, em virtude da hidrólise dos grupos carboxiamidas (Figura 1) e otimizou as propriedades piezoelétricas do colágeno, atuando como estimulador físico-químico do crescimento celular. Esta modificação conduz a um aumento total de até 106 cargas negativas por unidade de tropocolágeno após tratamento alcalino (BET et al., 2001). Porém, caracterizações físico-químicas por espectroscopia na região do infravermelho sugeriram que a estrutura em hélice tripla do tropocolágeno foi preservada durante a hidrólise (GOISSIS et al., 1999).

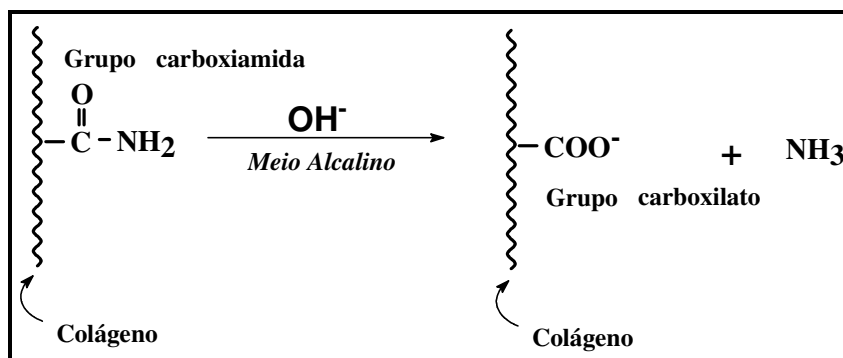


Figura 1. Ilustração esquemática da hidrólise dos resíduos de glutamina e asparagina presentes no colágeno em meio alcalino. Adaptado de BET et al., 2001.

## 2. OBJETIVOS

A partir destes dados, objetivou-se no presente trabalho processar biomembranas, a partir de centros tendinosos diafragmáticos de eqüinos em solução alcalina em tempos pré-determinados (24, 48, 72, 120 e 144 horas) e verificar as alterações macro e microscópicas mediante os seguintes parâmetros: flexibilidade e viabilidade para sutura, manutenção de resistência à sutura e homogeneidade; e por caracterizações físico-químicas: calorimetria exploratória diferencial, microscopia eletrônica de varredura e ensaio de degradação enzimática por colagenase.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os centros tendinosos diafragmáticos foram obtidos de eqüinos que foram a óbito por causa conhecida, com exclusão das infecto-contagiosas e de animais submetidos à eutanásia no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. A retirada se deu, no máximo, em três horas após os óbitos.

Os materiais foram preparados e caracterizados no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP pelo aluno de mestrado Mauro Henrique Lapena e pela Doutora Virgínia da Conceição Amaro Martins.

Após a remoção, os centros tendinosos diafragmáticos foram lavados em solução fisiológica a 0,9% e permaneceram imersos por quatro horas na mesma solução, trocada a cada hora.

Em seguida submeteu-se os centros tendinosos em solução alcalina contendo dimetilsulfóxido e sais (cloretos e sulfatos) de sódio, potássio e cálcio. Após 24, 48, 72, 120 e 144 horas de imersão, os sais residuais foram removidos por três lavagens sucessivas com  $H_3BO_3$  3% e EDTA 3%, congeladas gradativamente, sob temperatura de 15°C por 12 horas e -15°C por 12 horas e liofilizadas até apresentarem massas constantes, (GOISSIS, 1999), constituindo os grupos: G24, G48, G72, G120, G144. As amostras não tratadas foram designadas de grupo controle (GC) (Figura 2).

Foram confeccionadas amostras retiradas em diferentes tempos de tratamento a fim de verificar possíveis alterações morfológicas após tratamento alcalino do colágeno e decidir sobre qual seria mais adequada à utilização in vivo. Para esta finalidade, levou-se em consideração os seguintes aspectos: flexibilidade e viabilidade para sutura, manutenção de resistência mecânica à sutura e homogeneidade.

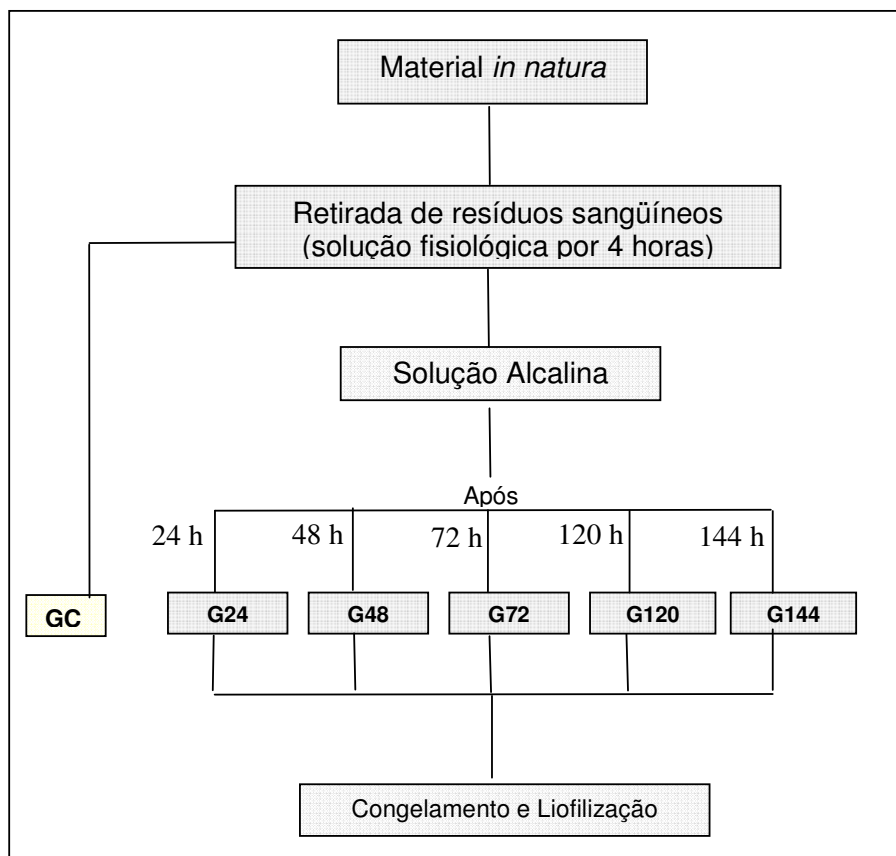


Figura 2. Algoritmo de obtenção das amostras de biomembranas a serem caracterizadas.

### 3.2 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Homogeneidade das amostras: foram utilizadas dez amostras de cada tempo de tratamento (5x5 cm), divididas em quatro quadrantes. Cada quadrante foi inspecionado visualmente, com auxílio de lupa e recebeu a classificação: r – predomínio de áreas rugosas; l – predomínio de áreas lisas; rl – equivalência entre áreas rugosas e áreas lisas; i – indefinido. Para a amostra toda, considerou-se: R – pelo menos três quadrantes com predomínio de áreas rugosas; L – pelo menos três quadrantes com predomínio de áreas lisas. RL – dois quadrantes com predomínio de áreas rugosas e dois quadrantes com predomínio de áreas lisas. I – dois ou mais quadrantes com áreas indefinidas.

Flexibilidade e viabilidade para sutura: foram utilizadas dez amostras de (8x4 cm) de cada tempo de tratamento. As amostras foram hidratadas em solução fisiológica 0,9% durante 15 minutos. Fixou-se uma extremidade das amostras em prancha de isopor. Dobrando-se a amostra ao meio, somente com a utilização de pinças e porta agulhas, as extremidades foram unidas e suturadas em padrão simples contínuo com fio de náilon. Durante o procedimento relacionou-se a dificuldade em unir as duas extremidades com a flexibilidade da amostra, classificando em 0 – extremamente fácil de unir; 1 - fácil de unir; 2 – dificuldade média de unir; 3 – difícil de unir; 4 – extremamente difícil de unir.

Resistência à sutura: foram utilizadas dez amostras de (4x4 cm) de cada tempo de tratamento. As amostras foram hidratadas em solução fisiológica 0,9% durante 15 minutos. Posteriormente uma das extremidades da amostra foi fixada em suporte de metal com presilha única em contato com toda a sua superfície. Na extremidade oposta foi fixada com fio de náilon distante 2 cm da borda, uma esfera de chumbo com ponto simples. A esfera permaneceu fixada por 24 horas e sob ação da gravidade, quando classificou-se a extensão do dano causado à amostra: 0 – não houve dano; 1 – corte no tecido menor que 0,5 cm; 2 – corte no tecido maior que 0,5 cm e menor que 1 cm; 3 – corte no tecido maior que 1 cm e menor que 2 cm; 4 – rompimento total. Todas as amostras foram posicionadas de modo a manterem o mesmo sentido de direcionamento das fibras colagênicas e o fio de sutura aplicado na posição perpendicular às fibras;



### **3.3 ANÁLISE TÉRMICA**

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): utilizou-se aproximadamente 10 mg de amostras, que foram submetidas a fluxo de O<sub>2</sub>, sob 10<sup>0</sup>C/min, com intervalo de temperatura de 25 a 150<sup>0</sup>C.

A análise calorimétrica por DSC permite a medida de estabilidade das estruturas helicoidais das moléculas de colágeno, relativas à transição colágeno→gelatina. A quebra da estrutura da hélice tripla dá lugar a uma estrutura amorfa formada por cadeias polipeptídicas e de polipeptídicos (gelatina). Essa transição aparece como uma descontinuidade na linha de base, que é proporcional à diferença na capacidade de calor antes e após a desnaturação (WENDLAND, 1986).

### **3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

As amostras foram recobertas com uma camada de liga de ouro-paládio de 20nm, sobre as quais se aplicou feixe de elétrons de 20 keV, a fim de se observar as características microscópicas.

### **3.5 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA POR COLAGENASE**

Realizou-se ensaio de degradação enzimática com colagenase de origem bacteriana (Sigma tipo V - 435 unidades.mg<sup>-1</sup>), cuja solução foi preparada com tampão tris-HCl 100mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4, contendo 25 mmol.L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio. A solução final utilizada continha a concentração de enzima de 20UI/mL.

As amostras GC, G24, G48, G72, G120 e G144 foram colocadas em tubos de ensaio, aos quais se adicionou a solução na quantidade a se obter 20UI de enzima por miligrama de colágeno. Em seguida os tubos foram submetidos em estufa bacteriológica (FANEN modelo 216) à 37<sup>0</sup>C durante 3 horas.

Após serem retirados da estufa, os tubos de ensaio contendo as amostras foram imediatamente submersos em água a 50<sup>0</sup>C para a inativação da colagenase e conseqüente término da hidrólise. Posteriormente a solução da enzima foi retirada e adicionou-se água deionizada nos tubos para retirada de resíduos da enzima e de sais da amostra e da parede dos tubos, repetindo-se esse procedimento cinco vezes.

A extensão da digestão enzimática foi determinada pela diferença de massa das amostras antes e depois do tratamento enzimático e os resultados obtidos pela média de três determinações independentes.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 ASPECTO MACROSCÓPICO**

Homogeneidade das amostras: para o tratamento durante 24 horas, verificou-se que 40% das amostras foram classificadas em I – um ou mais quadrantes com áreas indefinidas, 30% foi classificada em RL – dois quadrantes com predomínio de áreas rugosas e dois quadrantes com predomínio de áreas lisas e 20% em R – pelo menos três quadrantes com predomínio de áreas rugosas. As amostras do grupo tratado durante 48 horas apresentaram 30% classificadas em I, 30% classificadas em RL, 20% em R e 20% em L – pelo menos três quadrantes com predomínio de áreas lisas. No tempo de tratamento por 72 horas obteve-se 80% em L e 20% em RL. Nas amostras tratadas durante 120 e 144 horas 100% das amostras foram classificadas em L.

Flexibilidade e viabilidade para sutura: as amostras tratadas em 24 e 48 horas apresentaram 90% e 80% na classificação 3 – difícil de unir e 10% e 20% na classificação 2 – dificuldade média de unir, respectivamente. As amostras tratadas por 72 horas apresentaram 90% em classificação 1 – fácil de unir e 10% em 2 – dificuldade média de unir. As amostras tratadas em 120 e 144 horas apresentaram-se 100% em classificação 0 – extremamente fácil de unir.

Resistência à sutura: no tratamento por 24 e 48 horas, 90% e 80% das amostras, respectivamente, foram classificadas em 0 – não houve dano e 10% e 20% classificadas em 1 – corte no tecido menor que 0,5 cm. Para o tratamento de 72 horas, 60% das amostras foi classificada em 0, 30% em 1 e 10% em 2 – corte no tecido maior que 0,5 cm e menor que 1 cm. As amostras tratadas em 120 horas apresentou 70% das amostras em classificação 3 – corte no tecido maior que 1 cm e menor que 2 cm, 20% em 2 – corte no tecido maior que 0,5 cm e menor que 1 cm e 10% em 4 – rompimento total. As amostras tratadas durante 144 horas apresentaram 80% em 3 e 20% em 4.

## **4.2 ANÁLISE TÉRMICA**

As curvas de calorimetria exploratória diferencial permitiram comprovar que o colágeno não foi desnaturado durante o tratamento alcalino. Há deslocamento da linha de base dos gráficos, o que denota desnaturação protéica após submissão em temperatura controlada (Prancha 6, Figura 1).

## **4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

As fotomicrografias ilustram que as matrizes têm aspecto irregular, com zonas bastante densas e outras menos densas com a presença de arranjos de fibras randomicamente dispostos, mas compactos em alguns pontos. Observou-se, também, que o aumento do tempo de tratamento proporciona expansão das zonas menos densas, como pode ser comparado entre as fotomicrografias da amostra não tratada com a tratada por 48 horas (Prancha 6, Figura 2).

**Prancha 6. Análise térmica e microscopia eletrônica de varredura**

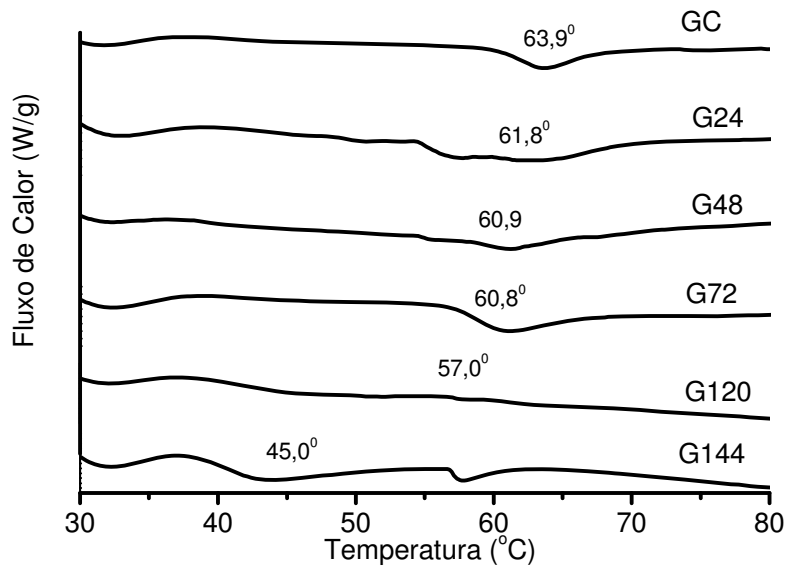


Figura 1. Gráfico das curvas de calorimetria exploratória diferencial com as respectivas temperaturas de desnaturação do colágeno para as amostras dos grupos controle (GC), tratados por 24 horas (G24), 48 horas (G48), por 72 horas (G72), por 120 horas (G120) e por 144 horas (G144). Fluxo O<sub>2</sub>, sob 100C/min, com intervalo de temperatura de 25 a 80°C.

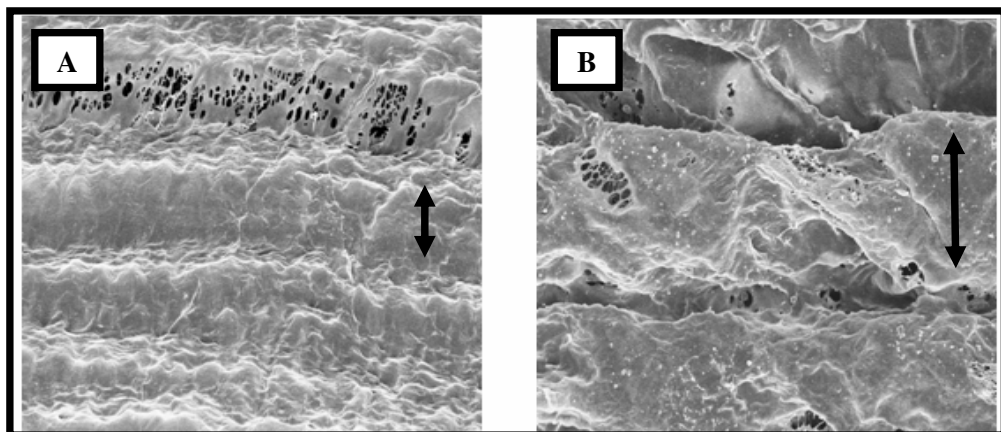


Figura 2. Fotomicrografias das amostras de centro tendinoso diafragmático equino. Em (A) material *in natura* (não tratado em solução alcalina). Em (B) material tratado em solução alcalina por 48 horas. Observa-se a expansão das zonas menos densas do material em virtude do tratamento em solução alcalina (vetores de sentido duplo). Aumento de 500 vezes.

#### 4.4 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO ENZIMÁTICA POR COLAGENASE

Observou-se que o aumento do tempo de tratamento proporcionou diminuição da resistência frente à degradação enzimática por colagenase das amostras, conforme a média dos valores tabulados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias e desvios padrões das porcentagens de massa degradada das amostras obtidas a partir de centro tendinoso diafragmático de eqüinos, submetidas à solução de colagenase durante 3 horas.

Amostras*	Degradação (%)
GC	18,3 ± 1,4
G24	17,8 ± 2,3
G48	12,6 ± 1,9
G72	25,1 ± 2,0
G120	35,6 ± 1,3
G144	38,8 ± 3,5

\*Médias obtidas em triplicata

#### 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, verificou-se que o tempo de tratamento em solução alcalina é diretamente proporcional à flexibilidade e homogeneidade e, inversamente proporcional à resistência à sutura e enzimática das amostras. É provável que estes resultados tenham relação com o aumento das zonas menos densas do material, que se expandiram, também, em função do tempo de tratamento alcalino, pois a diminuição de massa, de interações moleculares e aumento de superfície de contato diminuem a capacidade tênsil e proporcionam melhor interação entre as enzimas e os tecidos (HENCH et al., 2006).

No entanto, COSTA et al., (2005) comparam a tensão de ruptura de amostras de pericárdio bovino decelularizado por solução alcalina com amostras não tratadas. Foi observado que a tensão de ruptura e energia para o rompimento do grupo não tratado são significativamente menores, mesmo havendo diferença de espessuras das amostras dos dois grupos. Esse resultado é conflitante, pois existe uma

correlação linear entre espessura e índice de tenacidade, atribuindo-se, portanto, à presença de células, o aumento da resistência das amostras, corroborando com a hipótese de GOISSIS et al. (1999).

Apesar de não ter sido observada relação linear nos tempos propostos para o tratamento alcalino com os parâmetros medidos para caracterização macroscópica das amostras, notou-se que, em tempos superiores a 72 horas, a expansão das zonas menos densas era muito superior e que a resistência diminuía consideravelmente. Em tempos inferiores a 72 horas a flexibilidade da amostra não se adequava à manipulação do cirurgião.

Porém, o tratamento em solução alcalina não alterou a molécula de tropocolágeno, conforme observado por calorimetria exploratória diferencial, sendo importante para demonstrar que não há dependência do tempo de tratamento para se obter biomembranas que conservem moléculas da matriz extracelular, sinalizadoras de crescimento de células do organismo receptor do implante (GOISSIS, 1999; BET, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

Concluiu-se, portanto, que a flexibilidade, homogeneidade e resistência das amostras variaram em função do tempo de tratamento. E que para utilização em parede abdominal de eqüinos, seria viável a utilização do tratamento alcalino em período intermediário aos propostos, ou seja, por 72 horas, levando-se em conta a exigência tênsil do material e a facilidade de manipulação pelo cirurgião.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

AUBERTFOUCHER, E. et al. Purification and characterization of native type-XIV collagen. **Journal Biology Chemical**. v.265, n.22, p.157-159, 1992.

BET, MARCOS ROBERTO. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. São Carlos, 2000. 107p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

---

<sup>3</sup>Conforme ABNT - NBR-6023/2002 - Atualizada em fevereiro de 2007

COSTA, J.N.L. et al. Comparação entre o pericárdio bovino decelularizado e o pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v.20, p.14-22, 2005.

EASTOE, J. E. Composition of collagen and allied proteins. In: RAMACHANDRAN, G. N., ed. **Treatise on collagen**, London, Academic Press, 1967. v.1, p.1-67.

GOISSIS, G. et al. **Processo de extração de colágeno em tecidos animais com auxílio de solvente orgânico em meio alcalino**. BR. PI 9.405.043-0, 1994.

GOISSIS, G. et al. Surface tension control of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v.15, p.55-61, 1999.

GRINNELL, F. et al. Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. **Journal Biology Chemical**, v.274, p.918-923, 1999.

HENCH, L.L. et al. Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos. In: ORÉFICE, R.L. et al. **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap.16. p.479-506.

LEE, C.H. et al. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmacy**. v.221, p.1-22, 2001.

NIMNI, M. E. **Collagen**. Boca Raton, CRC, v.1, p.3-23, 1998.

PIEZ, K.A. Structure and assembly of the native collagen fibril. **Connective Tissue Research**. v.10, p.25-36, 1982.

REID, G.G. et al. The attachment, spreading, and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrata. **Journal of Material Science and Medical Material.** v.4, p.201-9, 1993.



### **CAPÍTULO 3 – IMPLANTAÇÃO EXPERIMENTAL DE BIOMEMBRANAS COLAGÊNICAS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA POR 72 HORAS, NA PAREDE ABDOMINAL DE EQÜINOS: ESTUDO COMPARATIVO COM CONTROLE POSITIVO E BIOMEMBRANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE GLICERINA A 98%**

#### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a integração tecidual e a biocompatibilidade de biomembranas de colágeno aniônico obtidas de centro tendinoso diafragmático de eqüinos e tratadas em solução alcalina por 72 horas. Foram utilizadas membranas não tratadas e membranas tratadas em solução de glicerina a 98% como controle e comparativo para as membranas em estudo, as quais foram implantadas na fáscia interna do músculo reto do abdome de eqüinos e observadas aos sete, 63 e 126 dias pós-operatórios. Avaliou-se a formação de aderências durante a retirada dos implantes, aspectos morfométricos e alterações histopatológicas da cicatrização. Foram observadas diferenças ( $P \leq 0,05$ ) quanto à capacidade de indução de processo inflamatório e integração tissular, concluindo-se que as membranas de colágeno aniônico estimularam processo inflamatório menos intenso em relação ao processo inflamatório crônico proporcionado pelas amostras não tratadas e tratadas em glicerina.

**Palavras-chave:** colágeno; integração tissular; eqüinos; biocompatibilidade; morfometria; cicatrização.

#### **ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate the tissue integration and biocompatibility of anionic collagen biomembranas gotten from tendineous diaphragmatic center of equines and treated in alkaline solution by 72 hours. Not treated and glycerin solution 98% treated membranes were used as control and comparative degree for the membranes in study. The three membranes types were implanted in the internal fascia of recto abdominis muscle of equines during seven, 63 and 126 days. It was evaluated tacks formation during the withdrawal of the implantations and the healing morphometry aspects. Differences of inflammatory process induction and tissue

integration had been observed, concluding that the membranes of anionic collagen had stimulated less intense inflammatory process in relation to the chronic inflammatory process proportionate by not treated and glycerin treated samples.

**Key-words:** collagen; tissue integration; equines; biocompatibility; morphometry; healing.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 INTERFACE TECIDOS/BIOMATERIAIS: DEFINIÇÕES E CONCEITOS**

O fundamento básico da produção de biomateriais é o desenvolvimento e tratamento de materiais para interação com sistemas biológicos de maneira a otimizar a implantação de próteses, tornando-as biocompatíveis, bioativas ou ainda, biodegradáveis, dependendo da utilização. Inicialmente, biocompatível era considerado o material totalmente inerte ao organismo vivo, ou seja, não haveria resposta orgânica à presença do implante. No entanto, percebeu-se que qualquer material sempre proporciona algum tipo de resposta no organismo hospedeiro, não havendo possibilidade de inerticidade de um biomaterial. Por outro lado, em muitas, senão na maioria dos casos, há necessidade de interação do material com os tecidos circunvizinhos, seja estimulando o crescimento celular, servindo de suporte e influenciando fenômenos físico-químicos, entre outros (HENCH et al., 2006).

Portanto, biocompatibilidade só poderia ser definida pelo entendimento global sobre as várias formas de interação dos organismos com um determinado material, dando-se ênfase especial à interface tecido/implante. Contudo, a classificação de um material como biocompatível ou não, deve levar em consideração a espécie animal, raça, idade, sexo e as reações individuais, entre outras (WILLIAN, 1987).

De forma geral, existem quatro categorias da interação tecidos e materiais, que definem, resumidamente, o conceito de biocompatibilidade a ser aplicado aos diversos biomateriais (HENCH et al., 2006) fenômenos físico-químicos de interface relacionados com os primeiros instantes de contato entre biomaterial, tecido e ambiente de implantação; respostas dos tecidos e meio orgânico à presença do material; mudanças ocorridas nos materiais como resultado da ação do meio (tecido, fluidos orgânicos) sobre o material (degradação e corrosão), e reações sistêmicas

ou de alguma parte específica do organismo, não diretamente em contato com o implante.

A partir da década de 1970, foi associada à capacidade de materiais específicos se ligarem, ou aderirem a tecidos vivos. De forma mais abrangente, pode-se definir bioatividade como a capacidade dos materiais de interagirem com tecidos vivos de tal modo a estimular processos físico-químicos inerentes a sistemas biológicos que favoreçam a integração do biomaterial no ambiente receptor. Nesse sentido, materiais biodegradáveis apresentam um grau de bioatividade tal que sua interação com o ambiente de implantação leva à degradação ou solubilização desses (HENCH, 1998).

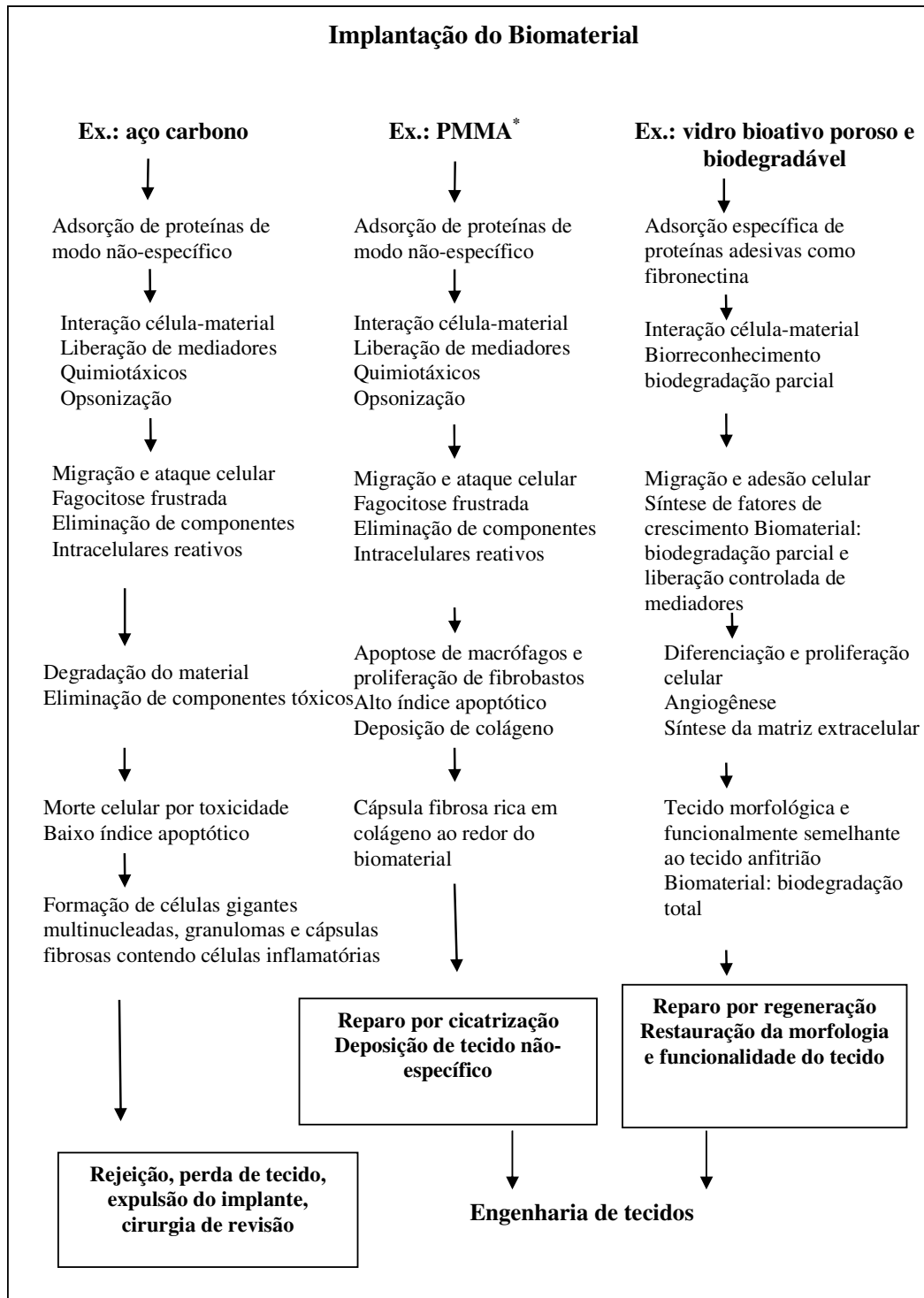
## **1.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO RELACIONADO COM A PRESENÇA DE BIOMATERIAIS**

Inflamação pode ser conceituada como um conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos sucessivos, ativos e complexos, pelos quais se exterioriza a reação vascular e tissular dos tecidos vivos a qualquer agressão, cujos objetivos finais são dominar, minimizar, enclausurar, neutralizar, destruir e eliminar a causa da agressão e induzir reparação (reposição de células saudáveis, oriundas do epitélio adjacente – reepitelização; do parênquima – regeneração; ou do estroma – cicatrização) (COTRAN et al., 2000).

A implantação cirúrgica de biomateriais é por si só, suficiente para gerar um processo inflamatório, já que o trauma da incisão necrosará células. As propriedades físicas e químicas dos compósitos de biomateriais, assim como a topografia e forma do material na interface com os tecidos, ajudarão a definir o tipo, a intensidade e a duração da resposta inflamatória (HENCH et al., 2006).

O tecido de granulação e as células gigantes tipo corpo estranho poderão compor a reação quando o organismo reconhece no implante um corpo estranho. Por outro lado, pode haver interação do implante com o tecido, cuja resposta inflamatória seja mínima, com rápida absorção das células inflamatórias, gerando apenas uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso proporcional ao dano causado aos tecidos vizinhos (HENCH et al., 2006), conforme pode ser visto na Prancha 7.

**Prancha 7. Reações orgânicas à implantação de biomateriais**



1. Fluxograma das respostas inflamatórias quando biomateriais são introduzidos em um organismo vivo. Adaptado de HENCH et al., (2006). \*PMMA - Polimetilmetacrilato

### 1.3 ATIVIDADE CELULAR DURANTE O PROCESSO INFLAMATÓRIO

As células do tecido conjuntivo são fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos. Algumas células do tecido conjuntivo se originam localmente, enquanto outras, como os leucócitos, vêm de outros locais e são habitantes temporários desse tecido. As células do conjuntivo têm a capacidade de se multiplicarem para regenerar o tecido destruído, pois esse tipo de tecido é dotado de grande capacidade de regeneração, constituindo as cicatrizes (ANSTEAD, 1998).

Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas e elásticas, as glicoproteínas e as proteoglicanas da matriz extracelular, sendo a célula mais ativa geralmente denominada de fibroblasto, enquanto a quiescente é conhecida como fibrócito (LEMOS, 2002).

Há uma célula que tem características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa, o miofibroblasto. Este participa do fechamento dos ferimentos, pela contração da cicatriz formada. Essa célula tem a morfologia de um fibroblasto, mas contém maior quantidade de actina (microfilamentos) e de miosina. No tecido conjuntivo de adulto, os fibroblastos não se dividem com frequência, entrando em mitose apenas quando ocorre uma solicitação, como por exemplo, nas lesões do tecido conjuntivo (ANSTEAD, 1998).

Ao conjunto de células da medula óssea que são precursoras dos monócitos, mais os próprios monócitos e os macrófagos, denomina-se sistema fagocitário mononuclear. Portanto, o monócito e o macrófago são a mesma célula, em diferentes fases de maturação. Durante o processo de transformação do monócito em macrófago, ocorre aumento da síntese protéica, do tamanho da célula, do tamanho do aparelho de Golgi, do núcleo de lisossomos, dos microtúbulos e microfilamentos (BIANCO et al., 2001).

O macrófago é uma célula muito ativa na movimentação amebóide, com grande capacidade de fagocitose, morfologia variável conforme seu estado funcional e sua localização, núcleo ovóide ou em forma de rim, com cromatina condensada. Tem importante papel na remoção de restos de células, de elementos extracelulares que se formam nos processos involutivos fisiológicos e de material extracelular alterado. Influenciam a atividade celular e a homeostase em vários tecidos, são

células apresentadoras de antígenos para o reconhecimento inicial e remoção de células senescentes e providenciam uma linha frontal de defesa contra antígenos invasores e células tumorais recém-formadas (GORDON et al., 1988).

Além das moléculas envolvidas nos mecanismos microbicidas e citotóxicos, os macrófagos secretam uma série de citocinas regulatórias, como fator de necrose tumoral alfa, interleucinas e fator de crescimento de fibroblastos. Essas citocinas podem exercer efeitos autócrinos ou parácrinos, controlando a proliferação, diferenciação e função efetora dos próprios macrófagos, linfócitos e outras células envolvidas na resposta imunológica (GORDON et al., 1988).

Os macrófagos interagem com outras células e com a matriz extracelular em diversas situações durante sua ontogenia e diferenciação, assim como em resposta a estímulos fisiológicos apropriados. Sua habilidade de interagir com moléculas da matriz extracelular, tais como colágeno, laminina e fibronectina, é um fator determinante para o desenvolvimento de suas funções. Essa interação permite que as células possam aderir-se e espalhar-se sobre a matriz e acontece via receptores específicos presentes na membrana celular, entre os quais destacam-se as integrinas. Além de serem receptores de adesão, as integrinas funcionam como transdutores de sinal via fosforilação de resíduos de tirosina. Assim, a interação dos receptores integrínicos com seus ligantes na matriz extracelular desencadeia uma série de cascatas de sinalização intracelular, influenciando a expressão gênica e regulando, dessa forma, processos como crescimento celular e apoptose (ABBAS et al., 2000).

Os linfócitos são exemplos de células do sistema imune que reconhecem antígenos estranhos, proteínas sanguíneas, e respondem com barreiras físico-químicas. As respostas imunes específicas são mediadas pelos linfócitos, as únicas células do organismo capazes de reconhecer e distinguir especificamente determinantes antigênicos diferentes (ABBAS et al., 2000).

#### **1.4 POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DOS BIOMATERIAIS**

Os mecanismos de indução de formações neoplásicas pelos biomateriais não são conhecidos, mas acredita-se que os fatores já estabelecidos que induzem diferenciações celulares devam ocorrer em consequência dos implantes. A partir de

estudos sobre formação de tumores, podem-se compilar as características das substâncias envolvidas com alterações celulares (SATO, 2002): As substâncias são de estrutura diversa e incluem produtos naturais e sintéticos; Alguns são reagentes diretos, enquanto outros necessitam de conversão metabólica; Alguns carcinogênicos químicos são eletrófilos altamente reativos (possuem átomos deficientes em elétrons); Diversos carcinogênicos químicos podem atuar em conjunto ou com outros tipos de influências carcinogênicas; Materiais implantados podem liberar subprodutos ou reagir com substâncias orgânicas e formar carcinogênicos; Materiais implantados podem atuar como agentes físicos na indução de neoplasias; Os agentes físicos e/ou químicos podem promover alterações no DNA; Os agentes físicos e/ou químicos podem ativar os oncogenes ou suprimir a atividade dos genes supressores de tumores.

No trabalho de SUZIGAN et al., (2001), no qual se utilizou colágeno aniônico recobrimo malhas de polipropileno, verificou-se metaplasia óssea das células musculares da parede abdominal, atribuindo-se esse resultado à característica osteoindutora do colágeno.

## **2. OBJETIVOS**

Objetivou-se verificar e quantificar o processo inflamatório e outras alterações patológicas envolvidos na implantação de membranas tridimensionais de colágeno tratadas em solução alcalina durante 72 horas. Foram utilizadas amostras não tratadas e amostras tratadas em glicerina a 98% como comparativos para avaliação do processo inflamatório e integração com tecidos circunvizinhos.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 ANIMAIS, ALIMENTAÇÃO E ACOMODAÇÕES**

Foram utilizados seis eqüinos, três machos e três fêmeas, sem raça definida, adultos e hípidos. Os animais foram avaliados clinicamente, medicados com ivermectina e submetidos a um período de adaptação alimentar e de manejo de dez dias.

Os eqüinos permaneceram em piquetes durante todo o período de experimentação, salvo durante o jejum alimentar e hídrico pré-cirúrgicos e a

recuperação pós-operatória, durante os quais permaneceram em baias do Hospital Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Foram alimentados diariamente com feno, ração para eqüinos e água à vontade.

### **3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Os centros tendinosos diafragmáticos foram obtidos de eqüinos que foram a óbito por causa conhecida, com exclusão das infecto-contagiosas, e de animais eutanasiados no Hospital Veterinário Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal.

Após a remoção, os centros tendinosos diafragmáticos foram lavados em solução fisiológica a 0,9% e permaneceram imersos por quatro horas na mesma solução, trocada a cada 1 hora. Uma parte das amostras foi submetida a congelamento gradativo, sob temperatura de 15°C por 12 horas e -15°C por 12 horas. Em seguida, foram liofilizadas até apresentarem massas constantes e esterilizadas em óxido de etileno, constituindo o grupo controle (Grupo GC). Outra parte das amostras foi submetida à solução de glicerina a 98% durante 60 dias, conforme metodologia descrita por DALECK et al., (1992), constituindo o grupo glicerina (GG).

Para obter as amostras do grupo experimental (GE), tratou-se em solução alcalina contendo dimetilsulfóxido e sais (cloretos e sulfatos) de sódio, potássio e cálcio. Após 72 horas de imersão, os sais residuais foram removidos por três lavagens sucessivas com H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 3% e EDTA 3%, congeladas gradativamente conforme realizada com as amostras do grupo controle, liofilizadas e esterilizadas em óxido de etileno, conforme ilustrado na Figura 1 (GOISSIS et al., 1999).



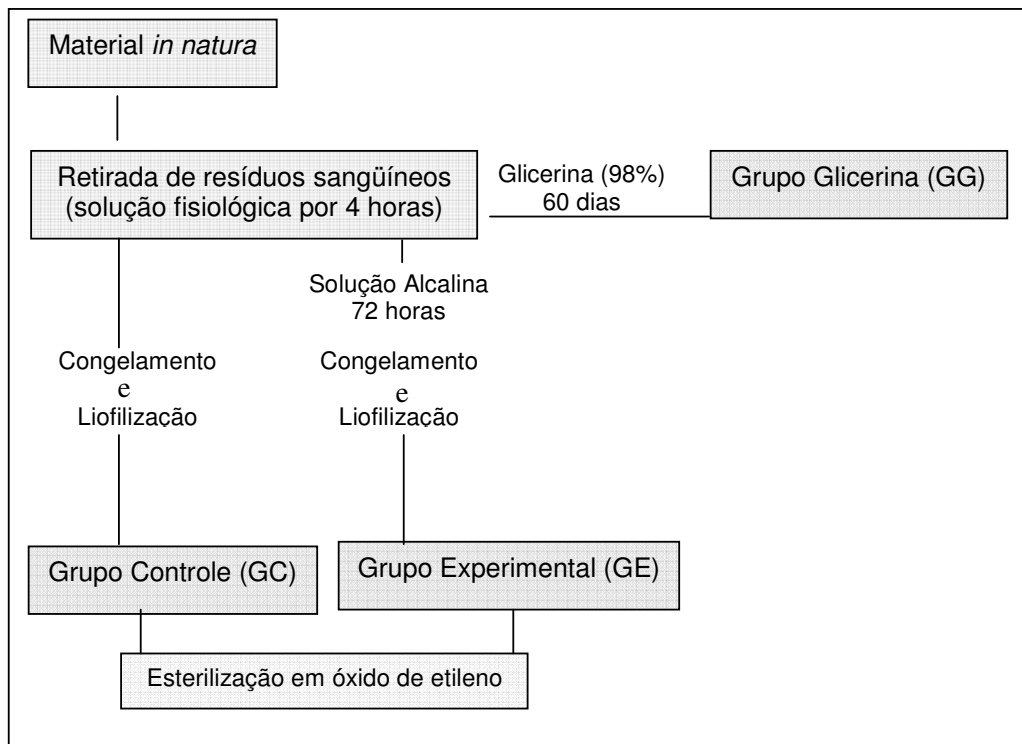


Figura 1. Algoritmo de obtenção das amostras de biomembranas a serem implantadas.

### 3.3 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Em virtude da desidratação ocasionada pela liofilização, estudou-se o tempo necessário para a hidratação das amostras do grupo controle e do grupo experimental em tampão fosfato, para posterior implantação nos animais.

O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado adicionando-se 0,67 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 7,02g de NaCl e 0,20g de KCl em 800mL de água destilada. Em seguida, ajustou-se o pH desta solução para 7,4 com solução de NaOH e completou-se o volume para um litro, com água destilada, sendo a solução armazenada sob refrigeração (5°C).

Em seguida, aferiu-se a massa de todas as amostras, que foram colocadas em solução tampão, na qual permaneceram imersas em tempos pré-determinados, variando de três a noventa minutos.

Após serem retiradas da solução, as amostras foram colocadas entre duas folhas de papel filtro e mantidas sob o peso de um objeto de 60g, durante 3 minutos, a fim de se retirar o excesso de água superficial e estabelecer um padrão para a coleta de dados. Para cada grupo utilizou-se 10 amostras.

A quantidade de tampão absorvida foi calculada pela equação a seguir:

$$CH = \frac{(m_u - m_s)}{m_u} \times 100$$

na qual: CH é capacidade hidratação (expresso em porcentagem) e  $m_u$  e  $m_s$  são as massas das matrizes úmidas e secas respectivamente.

### 3.4 IMPLANTAÇÃO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental envolvendo a utilização de animais foi submetido e aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL, sob protocolo nº. 005024-05, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP.

Para o procedimento realizou-se a tranqüilização dos animais com maleato de acepromazina ( $0,10\text{mg.kg}^{-1}$  por via intravenosa), indução da anestesia com éter gliceril guaicol ( $50\text{mg.Kg}^{-1}$ ) associado a tiopental sódico ( $1\text{g.200Kg}^{-1}$  por via intravenosa) e a manutenção da mesma por via inalatória com halotano, vaporizado em oxigênio a 100% em circuito semi-fechado.

Após tricotomia e anti-sepsia, foram feitas três incisões cutâneas paramedianas, divulsão do subcutâneo, afastamento das fibras do músculo reto abdominal, exposição da fáscia interna do músculo reto do abdome e retirada de três fragmentos ( $2 \times 3\text{cm}$ ) desta, para a fixação de uma amostra ( $2 \times 3\text{cm}$ ) de cada grupo, com sutura padrão contínuo simples com fio poliglactina 910 nº0. A fáscia externa foi suturada em padrão contínuo simples e a pele suturada em padrão colchoeiro horizontal contínuo, ambas com fio monofilamentar de poliamida 2-0. No período pós-cirúrgico imediato, os animais receberam penicilina procaína ( $22.000\text{UI.kg}^{-1}$ ) por via intramuscular a cada 24 horas, durante três dias consecutivos.

Em cada animal, foi feito, portanto, três blocos cirúrgicos constituídos por amostras dos três grupos, em posição alternada, de forma a minimizar o erro

experimental, totalizando nove amostras por animal (Prancha 8, Figura 1 (A e B) e Figura 2A. As amostras do grupo GG foram submetidas à solução de antibiótico durante 15 minutos, em seguida foram lavadas com solução fisiológica 0,9%, antes da implantação (Figura 2B).

Nas primeiras 12 horas pós-cirúrgicas, os animais permaneceram em baía e receberam feno e água à vontade. Decorrido este período, foram colocados em piquetes, recebendo água à vontade, feno e ração. Em virtude da possível contaminação da ferida cirúrgica durante a estada nos piquetes, realizou-se diariamente a limpeza da ferida cirúrgica com líquido de Dakin, aplicação de tintura de iodo a 2% e aplicação de repelente ao redor da ferida, durante oito dias consecutivos, quando foram removidas as suturas de pele.

Após as intervenções cirúrgicas, os animais foram avaliados clinicamente a fim de se verificar o estado de saúde dos mesmos e prevenir complicações, considerando-se os seguintes parâmetros: frequências cardíaca e respiratória, tempo de preenchimento capilar, temperatura retal, avaliação de mucosas e condições de cicatrização da ferida cirúrgica.

**Prancha 8. Procedimento de implantação das amostras**

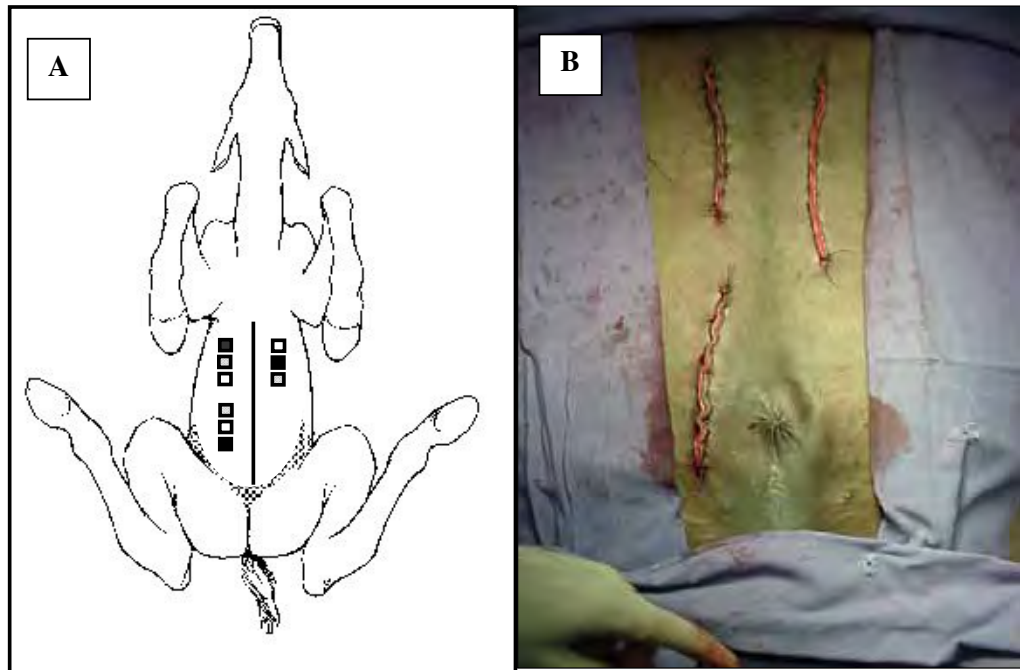


Figura 1. Em (A), esquema representativo das amostras implantadas na fáscia interna do músculo reto do abdome dos eqüinos. Alternou-se a posição das amostras dos três grupos, conforme a variação de cores na ilustração. Em (B), fotografia Digital do abdômen de eqüino após o procedimento cirúrgico de implantação e sutura da pele.

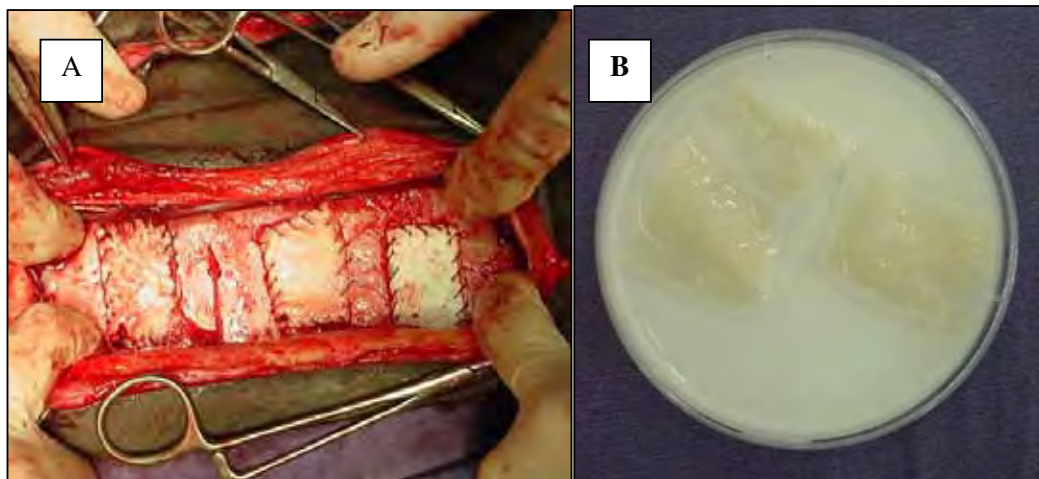


Figura 2. Aspecto das amostras recém implantadas na fáscia interna do músculo reto do abdome (A). As amostras foram colocadas em uma distância mínima de 4 cm em relação às adjacentes do mesmo bloco de implantes. Em (B), amostras do grupo 2 submetidas à solução de antibiótico 15 minutos antes da implantação.

### **3.5 RETIRADA DOS IMPLANTES E TECIDOS ADJACENTES**

O primeiro bloco foi retirado sete dias após a implantação, o segundo após 63 e o terceiro após 126 dias de implantação, seguindo-se os mesmos protocolos anestésico e cirúrgico descritos para a implantação das amostras.

Durante a retirada das amostras, avaliou-se no ato cirúrgico a ocorrência de aderência tecidual sobre o implante, segundo a classificação: aderência mínima (+), ou seja, liberação da amostra dos tecidos adjacentes por dissecação romba delicada; aderência moderada (++), quando da liberação da amostra dos tecidos adjacentes por dissecação romba grosseira; aderência máxima (+++), quando da impossibilidade de liberação por dissecação romba (SUZIGAN et al., 2001).

### **3.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

Os fragmentos retirados cirurgicamente foram fixados em solução de formalina (10%), tamponada com fosfato (pH 7,2) por pelo menos 24 horas. Após esse período, o material foi processado para inclusão em parafina. Foram feitos cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espessura e coloração com hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Gomori e Von-Kossa, sendo os cortes avaliados sob microscopia óptica e graduadas por um patologista não conhecedor de suas identidades, com graduações de alterações histológicas descritas na Tabela 1, além de outras possivelmente observadas pelo patologista.

A análise microscópica foi acrescida de dados objetivos obtidos por meio de histometria. Para tanto, utilizou-se microscópio binocular (Olympus BX 60 s.r) com equipamento para fotomicrografia, câmera de captação de imagem e analisador de imagens (Image Pro-plus. Cybernetics. Califórnia, USA). De cada corte histológico foram escolhidos 20 campos aleatórios (área estabelecida de 23089,96  $\mu^2\cdot\text{m}^{-1}$  por campo).

Tabela 1. Alterações histopatológicas examinadas nas lâminas preparadas a partir da retirada de amostras dos grupos controle, glicerina e experimental implantadas no reto do abdome de eqüinos. Distribuição em ordem alfabética.

<b>Achados ao exame histológico</b>	
Avaliação do processo inflamatório	Avaliação de metaplasia
Cápsula Fibrosa	Mineralização
C.G.M*	Tecido osteóide
Fibroblastos	Osteoblastos
Macrófagos	Osteoclastos
Neovascularização	Osso primário
Polimorfonucleares	
Mononucleares	
Outros achados**	Outros achados**

\* Célula gigante multinucleada

\*\* Possíveis variáveis não previstas

### 3.7 DELINEAMENTO

Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial três por três, com os fatores grupo controle, grupo glicerina e grupo experimental e coletas das amostras aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação. Analisou-se, também a interação dos fatores estudados com o sexo dos animais.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de normalidade dos erros estudentizados (teste de Cramer-Von Mises) e de homogeneidade de variâncias (teste de Brown-Forsythe). Após verificação do atendimento dessas pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância empregando-se o General Linear Model do programa SAS® (SAS, 1999) e, em caso de diferença ( $P \leq 0,05$ ), as médias foram comparadas pelo teste Tukey, considerando-se o nível de 5% de probabilidade.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO**

Os dados sobre a capacidade de hidratação das amostras do grupo controle (GC) e do grupo glicerina (GE) estão compilados na Tabela 2 e na Figura 2. Quando se observa os resultados em 90 minutos de imersão, o grupo controle (GC) apresenta uma capacidade de 70% de hidratação, ao passo que o grupo experimental (GE) chega a 90%. O resultado apresentado aos noventa minutos pelo GC é o mesmo que perdurou a partir dos 20 minutos de imersão, sugerindo que 70% é o limite ou pelo menos está próximo da capacidade máxima de hidratação.

O GE apresentou a capacidade de hidratação próxima dos 90% a partir dos 10 minutos de experimento, sugerindo, da mesma forma, ser a capacidade máxima de absorção de líquido.

Tabela 2. Médias e desvios padrões da capacidade de hidratação das amostras de biomembranas dos grupos controle e experimental, imersos em solução tampão fosfato durante períodos que variaram de três a 90 minutos.

Hidratação (%)		
Tempo (min)	Grupo controle	Grupo Experimental
3	27,20 ± 1,80	33,90 ± 1,35
5	39,48 ± 2,30	58,64 ± 1,97
10	52,28 ± 1,76	88,32 ± 2,98
15	62,43 ± 3,14	89,21 ± 2,13
20	72,73 ± 3,48	88,39 ± 1,82
25	71,90 ± 3,12	89,11 ± 2,33
30	72,10 ± 2,41	89,16 ± 1,52
45	71,31 ± 1,26	88,46 ± 2,31
60	71,70 ± 2,10	88,65 ± 1,98
90	72,35 ± 3,13	89,24 ± 2,40

\* médias obtidas a partir de 10 repetições

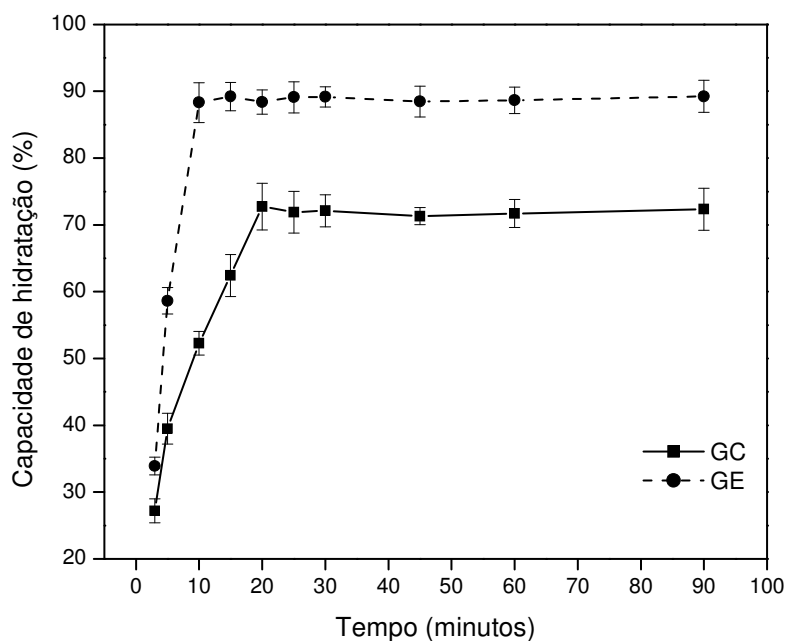


Figura 2. Gráfico ilustrativo da capacidade de hidratação das amostras dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Cada círculo, ou quadrado nas linhas do gráfico representa a média a partir de dez amostras. Ensaio realizado com imersão das amostras em tampão fosfato salino, pH 7,4, durante períodos de tempo que variaram de três a 90 minutos.



## 4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Durante todo o período de experimentação não foram observadas alterações clínicas dignas de nota. Dois animais sofreram perda de 5% do peso vivo após o primeiro procedimento cirúrgico, no entanto, retornaram ao peso inicial em dois meses, permanecendo saudáveis.

## 4.3 AVALIAÇÃO CIRÚRGICA

Os resultados da classificação do nível de dificuldade de retirada por dissecação das amostras estão expostos na Tabela 3.

Observou-se que as amostras tratadas em solução alcalina foram liberadas dos tecidos com maior facilidade em relação ao grupo controle e ao grupo tratado em glicerina a 98%. As amostras retiradas após 126 dias não foram classificadas segundo o critério proposto, uma vez que os fragmentos não eram visíveis macroscopicamente.

Tabela 3. Classificação do nível de dificuldade de retirada das amostras dos grupos controle, glicerina e experimental, implantados na parede abdominal dos eqüinos.

Animal	7 dias			63 dias		
	GC	GG	GE	GC	GG	GE
1	+++	++	+	+++	++	+
2	+++	++	+	+++	+++	++
3	+++	++	+	+++	++	+
4	+++	+	+	+++	++	++
5	+++	++	+	+++	+++	+
6	+++	++	+	+++	++	+

+ Aderência Mínima – Liberação por dissecação romba suave

++ Aderência Moderada – Liberação por dissecação romba agressiva

+++ Aderência Máxima – Não liberada por dissecação romba

## 4.4 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

### 4.4.1 POLIMORFONUCLEARES

Na contagem de polimorfonucleares houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos e para a interação entre os tratamentos e os períodos de coleta (Tabela 4). Fotomicrografias dos implantes contendo infiltrado inflamatório de polimorfonucleares podem ser vistos na Prancha 9, Figuras 1 e 2.

Na coleta das amostras aos sete dias pós-implantação houve maior infiltrado de polimorfonucleares para os grupos controle e glicerina, que não diferiram entre si, mas diferiram do grupo experimental. Porém, aos 63 e 126 dias pós-implantação houve diferença entre os três tratamentos, sendo que o grupo controle apresentou média maior, seguido dos grupos glicerina e experimental em ordem decrescente para as médias de células contadas.

Analisando-se os tratamentos nos diferentes períodos de coleta, observou-se que houve decréscimo das médias das contagens de polimorfonucleares para os três tratamentos.

Tabela 4. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de polimorfonucleares.

Tratamento (grupos)	Retirada dos implantes (dias pós-implantação)		
	7	63	126
Controle	401,83 Aa	385,50 Ab	293,50 Ac
Glicerina	398,33 Aa	369,00 Bb	257,67 Bc
Experimental	306, Ba	224,83 Cb	7,50 Cc

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

#### 4.4.2 LINFÓCITOS

Na contagem de linfócitos houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos e para a interação entre os tratamentos e os períodos de coleta (Tabela 5).

Observou-se, aos sete dias pós-implantação, que não houve diferença entre os tratamentos. Aos 63 e 126 dias os grupos controle e glicerina não diferiram entre si, mas diferiram do grupo experimental, que apresentou média menor.

Analisando-se a interação entre os tratamentos e períodos de coleta, verificou-se, para os grupos controle e glicerina, que houve aumento das médias de linfócitos no sexagésimo terceiro dia pós-implantação e decréscimo das médias do no setuagésimo sexto dia. Para o grupo experimental, houve queda das médias da contagem de linfócitos a partir do sétimo dia pós-implantação

Tabela 5. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de linfócitos.

Tratamento (grupos)	Retirada dos implantes (dias pós-implantação)		
	7	63	126
Controle	42,33 Ab	63,67 Aa	38,33 Ab
Glicerina	42,67 Ab	64,50 Aa	38,83 Ab
Experimental	39,33 Aa	25,67 Bb	6,83 Bc

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

#### 4.4.3 MACRÓFAGOS

Na contagem de macrófagos houve diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre os tratamentos e para a interação entre os tratamentos e os períodos de coleta (Tabela 6).

Aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação houve diferença entre o grupo experimental e os demais grupos. Porém não houve diferença entre os grupos glicerina e controle.

Observando-se a interação entre os tratamentos com os períodos de coleta, para a contagem de macrófagos, observa-se que os três grupos apresentaram aumento das médias aos 63 dias. Aos 126 dias pós-implantação observa-se diminuição das médias dos grupos controle e experimental.

Tabela 6. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de macrófagos nas lâminas analisadas.

Tratamento (grupos)	Retirada dos implantes (dias pós-implantação)		
	7	63	126
Controle	26,00 Aa	48,17 Ab	27,67 Aa
Glicerina	23,17 Aa	35,83 Ab	33,50 Ab
Experimental	15,50 Ba	27,50 Bb	11,33 Ba

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

#### 4.4.4 FIBROBLASTOS

Na contagem de fibroblastos houve diferença ( $P\leq 0,05$ ) entre os tratamentos e para a interação entre os tratamentos e os períodos de coleta (Tabela 7). O aspecto microscópico pode ser visto na Prancha 10, Figura 2A.

Aos sete e 63 dias pós-implantação, houve menor média do grupo controle em relação aos grupos glicerina e experimental. Aos 126 dias houve maior média do grupo experimental.

Na interação entre os tratamentos com os períodos de coleta, para a contagem de fibroblastos, observou-se que os três tratamentos tiveram aumento progressivo da média de fibroblastos, culminando aos 126 dias com diferença do grupo experimental em relação aos grupos controle e glicerina que não diferiram entre si.

Tabela 7. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de fibroblastos.

Tratamento (grupos)	Retirada dos implantes (dias pós-implantação)		
	7	63	126
Controle	7,17 Bc	44,67 Bb	57,50 Ba
Glicerina	16,33 Ab	65,50 Aa	62,83 Ba
Experimental	17,67 Ac	68,67 Ab	77,00 Aa

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ).

#### 4.4.5 NEOVASCULARIZAÇÃO

No presente estudo foi contado o número de vasos em toda extensão do fragmento observado. Notou-se, em todas as amostras, que a formação de vasos restringiu-se à periferia do implante, não havendo formação de vasos no interior das biomembranas (Prancha 10, Figura 2B).

Observou-se que aos sete dias não ocorreu a formação de novos vasos sanguíneos nos três grupos estudados. Porém, após 63 e 126 dias pós-implante verificou-se neovasos nos três grupos, com médias diferentes ( $P\leq 0,05$ ) em relação aos sete dias (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado do desdobramento dos fatores estudados (diferentes tratamentos e períodos de retirada das amostras) para a média do número de vasos sanguíneos formados, nas lâminas analisadas.

Tratamento (grupos)	Retirada dos implantes (dias pós-implantação)		
	7	63	126
Controle	0,00 Aa	3,00 Bb	3,00 Bb
Glicerina	0,00 Ab	4,00 Ba	4,00 Ba
Experimental	0,00 Aa	4,00 Bc	2,00 Bc

Médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ).

Médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ).

#### 4.4.6 ATIVIDADE CELULAR EM FIOS DE SUTURA

Foram observados, nos três grupos estudados, atividade celular em fios de sutura (Prancha 10, Figura 1A)

#### 4.4.7 CÉLULA GIGANTE MULTINUCLEADA

As células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho foram observadas apenas no grupo controle (Prancha 10, Figura 1B).

#### 4.4.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS SEXOS

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os sexos em nenhum dos fatores estudados.

**Prancha 9. Aspecto microscópico dos implantes.**

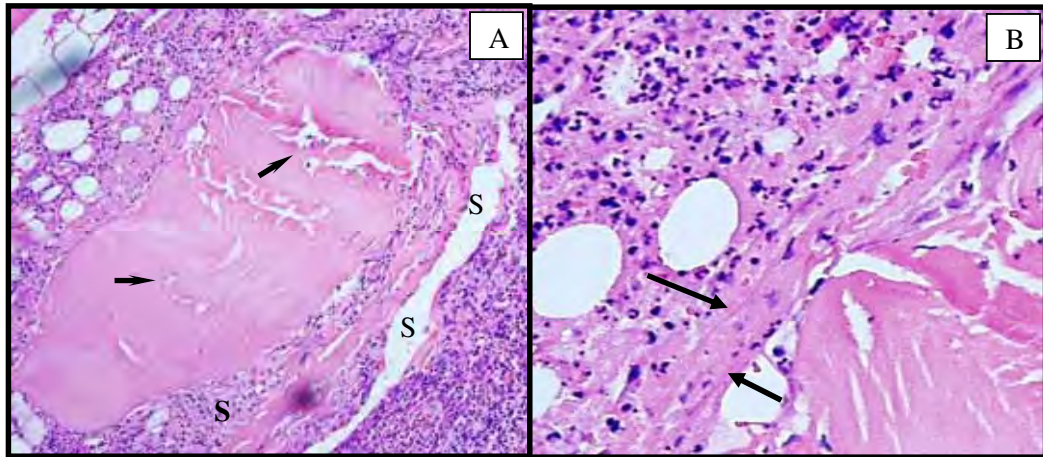


Figura 1. Fotomicrografia digital ilustrando o aspecto da membrana colagênica tratada em solução alcalina (A), nas quais se pode verificar discreto infiltrado inflamatório no interior do implante (setas) e os locais de passagem da sutura, indicadas por "S", fragilizando a membrana e expondo-a às células leucocitárias. H.E. 10X. Em B nota-se, em objetiva de 40X, a formação inicial de cápsula fibrosa (entre as setas). Coloração H.E. Amostra retirada sete dias pós-implante

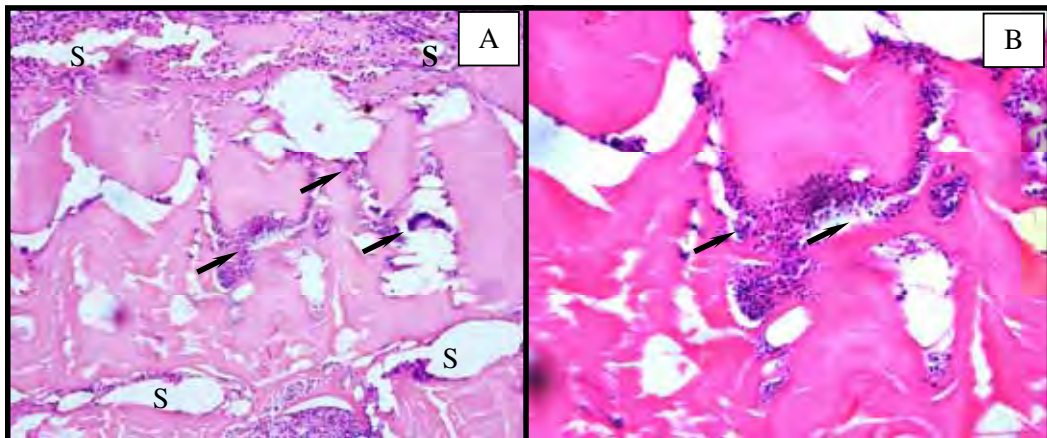


Figura 2. Fotomicrografia digital ilustrando o aspecto da membrana colagênica tratada em glicerina a 98% (A), nas quais se pode verificar infiltrado inflamatório no interior do implante mais acentuado (setas) em relação ao grupo experimental e os locais de passagem da sutura, indicadas por "S", fragilizando a membrana e expondo-a às células leucocitárias. H.E.10X. Em B nota-se, em objetiva de 40X, as células inflamatórias no interior do implante. Coloração H.E. Amostra retirada sete dias pós-implante

**Prancha 10. Aspecto microscópico dos implantes**

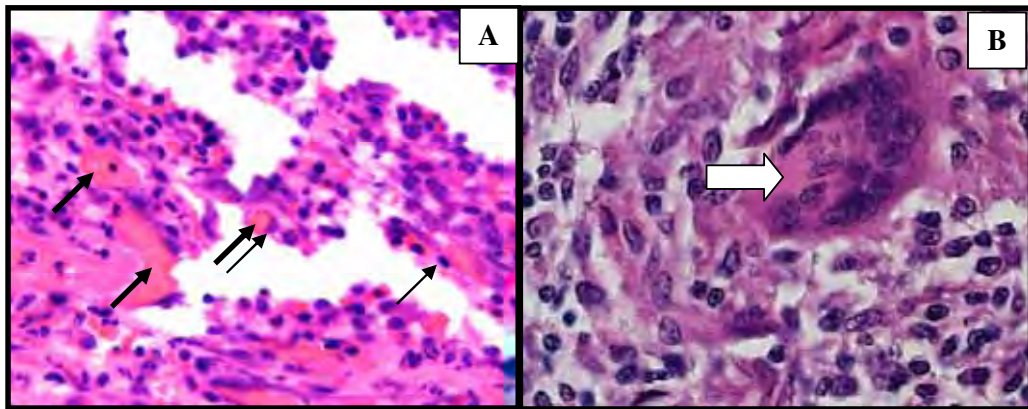


Figura 1. Em (A), fotomicrografia digital de amostra do grupo glicerina onde se notam partículas do fio de sutura (setas escuras largas) sob ação celular (setas escuras estreitas). Objetiva de 40X. Coloração H.E. Amostras retiradas sete dias pós-implantação. Comportamento semelhante em todas as amostras dos três tratamentos. Em (B), fotomicrografia digital de amostra do grupo controle, destacando célula gigante multinucleada do tipo corpo estranho (seta branca). Objetiva de 40X. Coloração H.E.

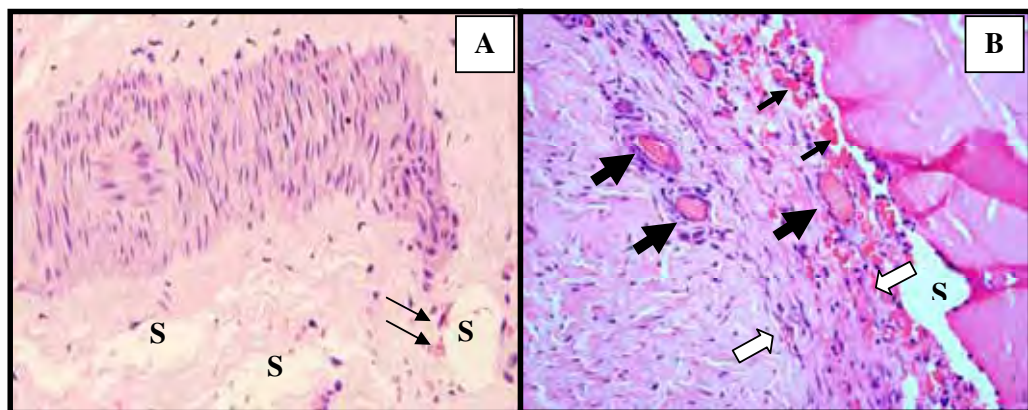


Figura 2. Em (A), fotomicrografia digital de amostra tratada em solução alcalina, retirada após 126 dias de implantação. Verifica-se ao centro, preenchimento do local, antes ocupado pela biomembrana, por fibroblastos e fibrócitos, tipificando cicatrização da ferida. Ao redor da cicatriz nota-se a composição de fibras colagênicas. Em "S", verifica-se local de passagem de sutura e fragmentos de fio de sutura apontados pelas setas. H.E. 20X. Em (B), fotomicrografia digital de amostra tratada em solução alcalina, retirada após 63 dias de implantação. Observam-se vasos neoformados próximos à membrana (setas escuras largas) e fragmentos de fio de sutura sob ação celular (setas escuras estreitas). O local de passagem do fio de sutura está indicado por "S". As setas brancas delimitam o espaço no qual nota-se a formação de cápsula fibrosa. H.E. 20X.



#### **4.4.9 METAPLASIA E FORMAÇÃO DE CÉLULAS ÓSSEAS**

Não foi observada metaplasia de células musculares que estiveram em contato com os implantes em nenhum dos grupos estudados nos três períodos.

### **5. DISCUSSÃO**

#### **5.1 ABÁLISE DA CAPACIDADE DE HIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DO TEMPO**

O tratamento alcalino do material proporciona a hidrólise dos grupos carboxiamidas, favorecendo a formação de carboxilato, cujas moléculas são hidrófilas (GOISSIS, 1999). Portanto, conforme observado pelos resultados, o aumento de tempo de tratamento culminou em maiores capacidades de hidratação.

#### **5.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A TÉCNICA DE IMPLANTAÇÃO**

O local eleito para implantação das amostras foi a fáscia interna do músculo reto do abdome, em virtude da possibilidade de contato com musculatura e outros tecidos da parede abdominal. Com isso, deve-se considerar que a implantação de telas ou biomembranas nos tecidos da parede abdominal são realizadas com suturas, sendo difícil a implantação de grandes áreas com colas biológicas (GARFIEN et al., 2003).

Portanto já se previa certa interferência do fio de sutura no processo inflamatório, uma vez que o contato e o trauma por si só são suficientes para o recrutamento de células leucocitárias, mesmo que em caráter agudo. Considera-se que o experimento aproximou-se das condições reais, nas quais não se podem isolar os efeitos do fio de sutura utilizado. O processo inflamatório pode ter sido superestimado, porém semelhante em todas as amostras dos três tratamentos da experimentação.

#### **5.3 RETIRADA DOS IMPLANTES – PERCEPÇÃO SOBRE A FIBROSE DURANTE O ATO CIRÚRGICO**

Os resultados obtidos na retirada das amostras evidenciaram que o tratamento ao qual foram submetidas influenciou na integração tecido/biomaterial.

Houve maior facilidade na remoção das amostras tratadas em solução alcalina, provavelmente devido à capacidade do tratamento em remover resíduos teciduais e alterar grupos carboxiamidas das moléculas de colágeno (GOISSIS et al., 1999), que são responsáveis por ocasionar respostas nos organismos hospedeiros, inclusive na formação de fibrose.

#### **5.4 PROCESSO INFLAMATÓRIO E RESOLUTIVO CICATRICIAL**

Em relação ao processo inflamatório envolvido, verificou-se que ocorreu diminuição gradual de polimorfonucleares dos sete ao 63º dia pós-implantação nos três grupos estudados, o que está de acordo com SANADA et al., (2003), os quais citaram que, geralmente, os polimorfonucleares são encontrados na área de implante em grande número nos primeiros sete dias pós-implantação, que decrescem com o tempo, tendo em vista que sua existência é típica de inflamação aguda (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

No entanto, no 63º e 126º dias pós-implantação, observou-se que os grupos controle e glicerina expressaram aumento no número de células polimorfonucleares, enquanto que o grupo experimental apresentou decréscimo no número de células. Esse comportamento de ambos os grupos de comparação é característico de processo inflamatório crônico ativo, no qual observa-se que há sobreposição dos elementos característicos de um processo agudo com outro crônico de inflamação (COTRAN et al., 2000).

A reação de células agranulares com maior intensidade, característica de inflamação crônica (KIRKPATRICK et al., 2002), foi mais intensa nos grupos controle e glicerina. Nota-se que a quantidade de linfócitos aumenta consideravelmente em ambos os grupos aos sete e 63 dias após a implantação das amostras. Comportamento oposto pode ser verificado no grupo experimental, no qual se observa decréscimo da quantidade de linfócitos a partir dos sete dias pós-implantação. A diferença observada entre o grupo experimental e os grupos glicerina e controle é sugestiva quanto à característica imunogênica das amostras, ou seja, é diretamente proporcional à quantidade de mononucleares, confirmando os achados de (CARNEIRO et al., 2005) e reforçando a característica de processo crônico ativo dos grupos controle e glicerina (Prancha 11, Figuras 1 e 2).

**Prancha 11. Atividade celular no processo inflamatório**

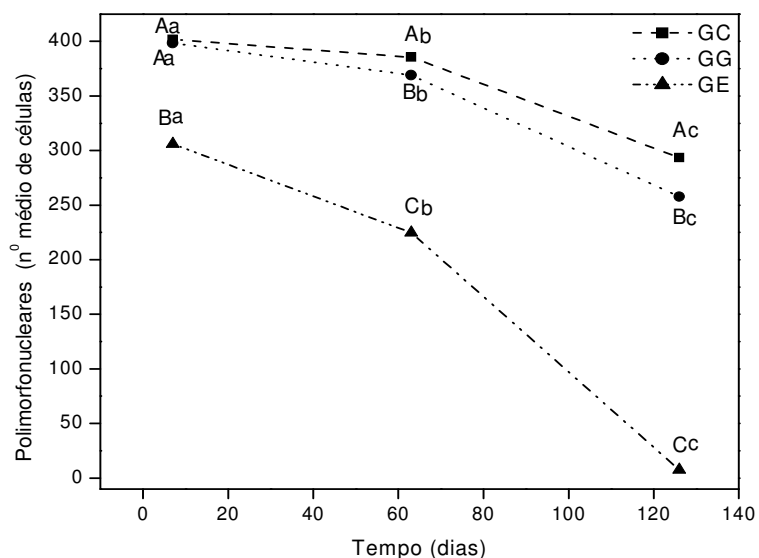


Figura 1. Gráfico da concentração de polimorfonucleares das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).

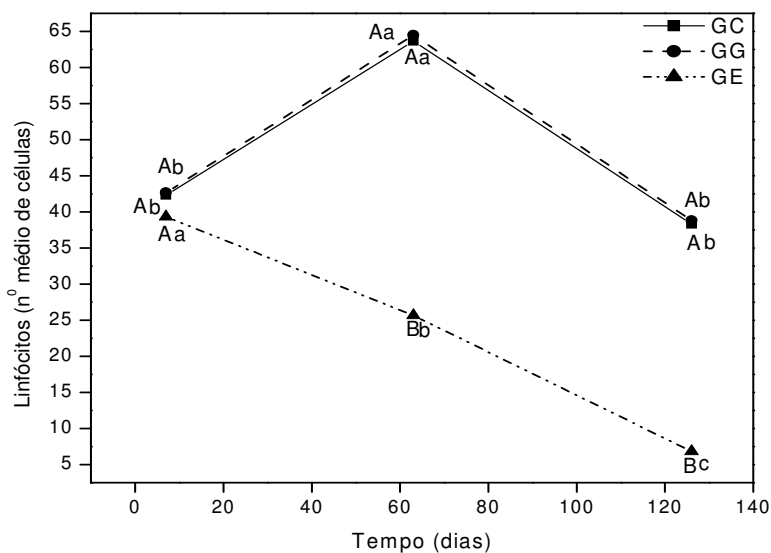


Figura 2. Gráfico da concentração de linfócitos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P > 0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).

A formação e manutenção de cápsula fibrosa mais regular nas amostras do grupo experimental em relação aos grupos controle e glicerina, sugere que o processo inflamatório causado por biomateriais sofreria resolução mais rápida no grupo experimental, fato que foi reforçado pelas quantidades de macrófagos e fibroblastos observados nos três grupos (ANSTEAD, 1998; LEMOS 2002).

No entanto, não houve persistência na formação completa de cápsula fibrosa no grupo experimental, o que pode estar relacionado à degradação das amostras, cuja diminuição gradual de massa favorece a cicatrização ou regeneração, não havendo a necessidade de encapsulamento, comportamento típico da bioatividade de materiais degradáveis (HENCH et al., 2006). Contudo, deve-se levar em consideração que houve interferência do fio de sutura, o qual estimulou processo inflamatório e fragmentou as membranas, tornando-as mais irregulares ao longo do tempo.

O aumento de macrófagos no sétimo e no 63<sup>o</sup> dias pós-implantação e queda aos 126 dias sugere relação com o tempo de degradação das amostras, pois como observado na experimentação com degradação enzimática, o tratamento alcalino diminui a resistência da membrana frente à colagenase, em relação às amostras *in natura*. Há maior quantidade de massa das amostras *in natura* em contato com tecidos circunvizinhos, estimulando a proliferação de macrófagos para biodegradação do material (GORDON et al., 1988).

É provável que a degradação da membrana, observada no grupo experimental e ausência de processo inflamatório crônico, em relação aos grupos controle e glicerina, estimularam a cicatrização mais rápida no local desses implantes, expressado pelo aumento do número absoluto de fibroblastos (GORDON, et al., 1988). (Prancha 12, Figuras 1 e 2).

**Prancha 12. Atividade celular no processo inflamatório**

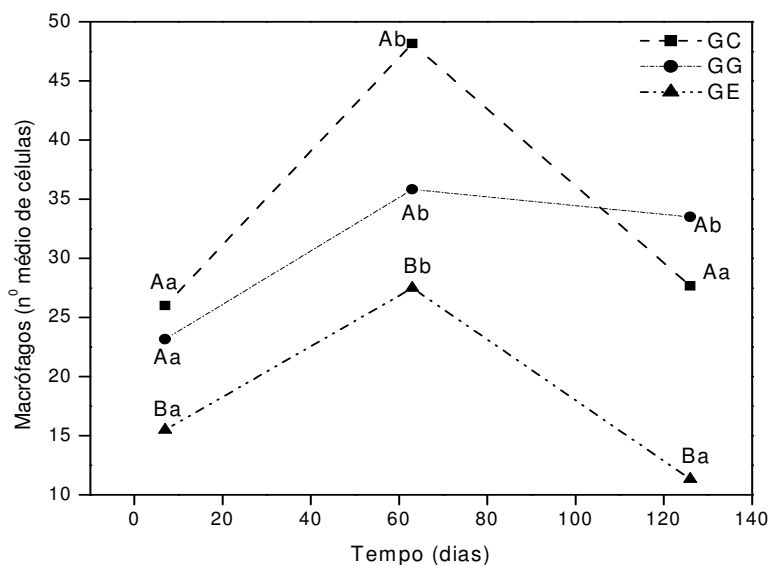


Figura 1. Gráfico da concentração de macrófagos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).

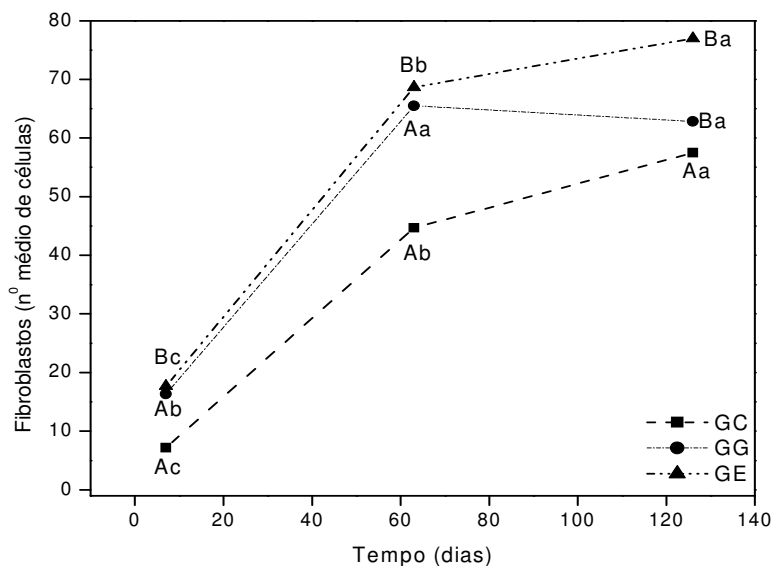


Figura 2. Concentração de fibroblastos das amostras retiradas aos sete, 63 e 126 dias pós-implantação dos três grupos estudados. Cada quadrado, círculo, ou triângulo nas linhas do gráfico representa uma média obtida do número total de células contadas em seis cortes histológicos. Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum, dentro de uma mesma linha, não diferem pelo teste Tukey ( $P>0,05$ ). Grupo controle (GC); Grupo glicerina (GG); Grupo Experimental (GE).

#### **5.4 NEOVASCULARIZAÇÃO**

A neovascularização não foi expressiva no grupo experimental em relação ao controle e ao grupo glicerina.

As matrizes constituídas por colágeno atuam como arcabouço para a invasão de novos vasos sanguíneos, ou seja, como suporte estrutural, mas também são responsáveis pela estimulação da proliferação celular (FERREIRA, 2005). No entanto, deve-se considerar que o tempo de degradação do material, que é diretamente proporcional ao tempo de tratamento em solução alcalina, pode interferir na estimulação e suporte de novos vasos sanguíneos. É muito provável que modificações no tempo de tratamento ou reticulações com outras substâncias que alterem o tempo de degradação, ou até mesmo a inclusão de fatores químicos estimulantes de angiogênese, proporcionassem melhora no aparecimento de novos vasos.

#### **5.5 VERIFICAÇÃO DE METAPLASIA E FORMAÇÃO DE CÉLULAS ÓSSEAS**

Os resultados obtidos contrapõe-se aos achados de SUZIGAN et al., 2001, os quais recobriram malhas de polipropileno com colágeno e verificou-se metaplasia de células musculares.

### **6. CONCLUSÕES**

A partir da comparação e análise estatística dos resultados obtidos na retirada das amostras dos grupos controle, glicerina e experimental, conclui-se que o processo inflamatório proporcionado pelo grupo experimental foi agudo, consistindo apenas de uma resposta considerada normal a uma agressão ao organismo. As amostras tratadas em glicerina apresentaram um processo inflamatório crônico, porém menos intenso que do grupo controle.

Portanto, como não houve fatores que provocassem reações danosas nos eqüinos receptores do implante e o processo inflamatório foi de caráter agudo e de menor intensidade em relação às membranas utilizadas como controle e comparativo, pode-se concluir que há biocompatibilidade das biomembranas tratadas em solução alcalina por 72 horas e sua utilização é admissível em parede

abdominal de eqüinos como suporte e repositor de tecidos em necessidades cirúrgicas como hérnias, tumores, deiscências de suturas entre outras possíveis.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>4</sup>

ABBAS, A.K. et al. **Cellular and Molecular immunology**. 4ed. Philadelphia: Saunders, 2000, p.40-52.

ANSTEAD, G.M. Steroids, retinoids, and wound healing. **Advanced Wound Care**, New York, v.11, n.6, 1998, p.277-285.

BET, MARCOS ROBERTO. **Colágeno aniônico: propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. São Carlos, 2000. 107p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**. Switzerland, v.19, p.180-192, 2001.

CARNEIRO, E. et al. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**. Bauru, v.13, n. 2, p.157-163, 2005..

COTRAN, R.S et al. **Patologia estrutural e funcional**, 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.112-144

DALECK, C.R. et al. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, v.22, n.2, p.179-183, 1992.

---

<sup>4</sup>Conforme ABNT - NBR-6023/2002 - Atualizada em fevereiro de 2007

FERREIRA, C.F. et al. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v.16, p.456-460, 2005.

GARFEIN, E. S. et al. Clinical applications of tissue engineered constructs. **Clinics in Plastic Surgery**, Philadelphia, v.30, n.4, p.485-498, 2003.

GOISSIS, G. et al. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. v.15, p.55-61, 1999.

GORDON, S. et al. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal of Cell Science**, v.9, p.1-26, 1988.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, Guildford, v.19, n.4/5, p.419-423, 1998.

HENCH, L.L. et al. Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos. In: ORÉFICE, R.L. et al. **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap.16. p.479-506.

KIRKPATRICK, C.J. et al. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. **Biomolecular Engineering**, v.19, p.211-217, 2002.

LEMOS, I.C.M.C. **Influência da desnutrição intra-uterina na cicatrização da parede abdominal de ratos lactentes avaliada mediante estudo tensiométrico e da morfometria do colágeno**. Curitiba, 2002, 89f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná.

SANADA, J.F. et al. Análise histológica, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v.11, n.3, p. 209-215, 2003.



SAS/STAT. **User's guide**. Version 8.8, 4.ed. Cary NC, 1999. v.1.

SATO, D.Y.O. **Efeito do Método Canova sobre os parâmetros leucocitários em camundongos normais e portadores de Sarcoma 180**. Curitiba, 2002, 78. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná.

SIQUEIRA, J.F; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000, p.112-127.

SUZIGAN, S. et al. Anomalous metaplastic ossification of anionic collagen coated polypropylene mesh after implantation in the abdominal wall. **IV CONGRESO VIRTUAL HISPANO AMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**. Disponível em <http://conganat.uniovi.es/posters/120/texto.htm:1-9>, 2001.

WILLIAM, D.F. **Definitions in Biomaterials**, New York, Elsevier, 1987. p.9-29.

## **CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### **2. CONSIDERAÇÕES SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO PROJETO**

#### **2.1 INTERDISCIPLINARIDADE**

O desenvolvimento do projeto “Obtenção e processamento de matrizes tridimensionais de colágeno e implantação em parede abdominal de eqüinos” foi possível mediante interação do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal com o Departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (USP – São Carlos).

Os trabalhos desenvolvidos nas duas instituições foram complementares e supriram a necessidade de ambos os setores, ou seja, a aplicação de materiais desenvolvidos em um laboratório de biomateriais e novas alternativas em cirurgia veterinária. Essa cooperação mútua é conseqüência de uma nova necessidade dos campos de pesquisa, que se atenta para trabalhos conjuntos e resultados mais objetivos e direcionados, indo ao encontro das propostas mais modernas acerca da pesquisa nacional.

Segundo SOARES et al., (2005), de uma forma geral, pesquisas em biomateriais estão sendo realizadas em departamentos de engenharias, física, química, entre outros e em departamentos ligados à área de ciências da saúde, que tendem a atuar em parceria com as áreas tecnológicas, contribuindo fortemente para o desenvolvimento das ciências básicas e aplicadas e à formação de recursos humanos.

Porém, algumas estratégias, entre outras, seriam necessárias para otimizar o potencial nacional na formação de recursos humanos específicos para a área de biomateriais, como:

- formação mais generalista em nível de pós-graduação;
- incentivar cursos de graduação e de pós-graduação interdepartamentais e interdisciplinares;
- definir políticas de fixação de recursos humanos qualificados.

Segundo dados do Fórum de Biotecnologia Biomateriais, realizado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2005, as matrizes extracelulares

atualmente produzidas ainda estão aquém do desejado, pela dificuldade de compatibilizar propriedades biológicas com requisitos mecânicos.

Dessa forma, há espaço para os grupos brasileiros pesquisarem e inovarem. Outra vantagem apresentada pelo Brasil é a possibilidade de realização de testes em cobaias (desde que devidamente aprovados pela CONEP), etapa fundamental para se viabilizar o desenvolvimento de um produto/processo (SOARES et al, 2005). Para isto, algumas ações governamentais são necessárias para impulsionar a área, como as descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo dos entraves e ações necessárias para o desenvolvimento da área de produção de enxertos e arcabouços no Brasil. Fórum de Biotecnologia Biomateriais – UFRJ, 2005, adaptado de SOARES et al., 2005.

<b>Gargalos atuais</b>	<b>Ações necessárias</b>
Enxertos: setor tradicional	- substituir importações - garantir qualidade do produto
Scaffolds: intensa atuação de P&D com forte interação entre os grupos ligados a “materiais” com os de formação “bio”	- identificar nichos possíveis de atuação competitiva e investir maciçamente para se chegar o mais rapidamente a produtos - incubação de empresas, inovação

## **2.1 ESCOLHA DO MODELO ANIMAL E DO MATERIAL A SER EMPREGADO COMO IMPLANTE**

Em virtude da necessidade constante de biomateriais na cirurgia, foram verificados quais aspectos seriam imperativos na busca de um material para ser empregado em um local de grande exigência tênsil, além dos fatores biocompatibilidade e bioatividade (VATS et al., 2003).

O centro tendinoso diafragmático é um material de grande extensão que pode ser utilizado como membrana em locais de grandes exigências teciduais. Sua constituição tendinosa favorece a resistência, além de ser facilmente obtido e manipulável.

Os animais domésticos de grande porte são modelos adequados para a experimentação de materiais na parede abdominal, em virtude do peso considerável exercido pelas vísceras na porção ventral da parede (KOBLUK et al., 1989; WILSON, 1995). Além disso, especificamente os eqüinos, constantemente são submetidos à laparotomias medianas, o que é um fator de risco potencial para intercorrências cirúrgicas, por isso selecionado para os testes de biocompatibilidade das membranas obtidas (STASHAK, 1991; SILVERMAN et al., 2004).

## **2.2 RESULTADOS OBTIDOS E DIRECIONAMENTOS FUTUROS**

Apesar da relativa superioridade das membranas tratadas em solução alcalina em relação às tratadas em glicerina 98%, deve-se considerar que um biomaterial pode ser otimizado para não servir apenas de arcabouço de sustentação. A indução de cicatrização nem sempre é desejada, podendo ser benéfica apenas em alguns casos.

GAMBA et al., (2002) utilizaram matrizes acelulares para a reparação de defeitos musculares, obtendo, segundo os pesquisadores, resultados pouco satisfatórios, uma vez que não houve o estímulo de crescimento celular e apenas cicatrização. Portanto, decidiram utilizar as matrizes em associação com células musculares homólogas, observando crescimento de células musculares pós-implantação.

Segundo HENCH et al. (2006), a hipótese para governar o futuro desenvolvimento de novos materiais biomédicos é: “Uma terceira geração de materiais bioativos pode ser projetada para ativar genes e estimular a regeneração de tecidos vivos”.

Portanto, conclui-se que o método proposto para obtenção de matrizes colagênicas é eficiente em relação à biocompatibilidade e que é o passo inicial para direcionar trabalhos futuros que foquem a hibridação de biomembranas com células, substâncias e outros materiais que estimulem a proliferação celular, compondo matrizes da categoria denominada “materiais inteligente”.

### 3. REFERÊNCIAS<sup>5</sup>

GAMBA, P.G. et al. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. **Pediatric Surgery Internal**, v.112, n.2, p.110-120, 2002.

HENCH, L.L. et al. Biocompatibilidade, bioatividade e engenharia de tecidos. In: ORÉFICE, R.L. et al. **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. Cap.16. p.479-506.

KOBLUK, C.N. et al. Factors affecting incisional complication rates associated with colic surgery in horses: 78 cases (1983-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.195, n.5, p.639-642, 1989.

SOARES, G.A. et al. Biomateriais. **Fórum de biotecnologia e biomateriais, 2005**. Disponível na internet www.URL:<http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr10.biomateriais.pdf>

SILVERMAN, R.P. et al. Restoring abdominal wall integrity in contaminated tissue-deficient wounds using autologous fascia grafts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.113, n.2, p.673-675, 2004.

STASHAK, T.S. Selected factors that affect wound healing. In: **Equine wound management**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991. Cap.2, p.19-34.

VATS, A. et al. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications, **Clinical Otolaryngology**. v.28, p.165-172, 2003.

WILSON, D.A. et al. Complications of celiotomy incisions in horses. **Veterinary Surgery**, v.24, n.6, p.506-514, 1995.

---

<sup>5</sup>Conforme ABNT - NBR-6023/2002 - Atualizada em fevereiro de 2007