

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA E
ESTEREOLÓGICA DE IMPLANTE DE BIOMEMBRANA EM
ESTÔMAGO DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

Alessandra Regina Freixo Scavone

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Cirurgia Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRA REGINA FREIXO SCAVONE – nasceu na cidade de Limeira, em 08 de abril de 1981. Em março de 2002, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal, UNESP, que foi concluído em dezembro de 2006. Foi bolsista pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP no período de março de 2003 a março de 2006. Em março de 2007, ingressou no curso de Mestrado, pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária, da FCAV, Câmpus de Jaboticabal, UNESP; e conseguiu cota de Bolsa de Mestrado com duração de 24 meses, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP. Em 19 de fevereiro de 2009 obteve o título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

Aos meus pais Benedito e Maria de Lourdes que me nunca mediram esforços para realizar meus sonhos. Que muitas vezes abdicaram dos seus sonhos, para que, eu pudesse realizar o meu.

A minha família, Fábio e Isabela, por renunciarem momentos preciosos de suas vidas, para que eu pudesse realizar meus sonhos. Meu amor e reconhecimento eterno. Vocês são a minha vida, meu espelho, meu orgulho. Amo vocês!

Dedico

A minha querida orientadora, Márcia Rêta Fernandes Machado, obrigada pela confiança depositada em mim. Você é um exemplo a ser seguido e pode ter certeza, que onde quer que eu vá, levarei comigo uma grande bagagem de conhecimento que adquiri ao seu lado Nunca esquecerei o que fez por mim. Serei sempre grata a você.

Ofereço

Agradecimentos especiais

A minha linda Isabela, que me acompanha em todos os momentos, amo muito você, obrigada por você existir.

Ao meu marido Fábio, obrigada por estar ao meu lado.

Ao meu maior exemplo de vida, meu Pai, obrigada por tudo, esse mestrado é seu também... Meu companheiro.

A minha amiga e mãe Lourdes, pelo colo nos momentos mais difíceis.

Deus por guiar, iluminar e proteger a minha vida.

A minhas irmãs Kátia, Cassiane, Taís obrigada por serem minhas amigas.

A minha grande amiga e colega de profissão Sandra Solano de Melo, por acreditar e participar da concretização de meus maiores sonhos. Você é um exemplo para mim.

A minha vó Feliciano por eu sempre estar em suas orações.

Aos meus sobrinhos Giovanna, Lucas, Guilherme e Gustavo minhas alegrias nos momentos de relax.

A minha sogra Regina, minha cunhada Adriana por me incentivarem em todos os momentos.

À Clínica Veterinária "Tia Sandra" pelo acolhimento. Em especial a Sandrinha que muito me ajudou.

Ao médico veterinário Vitor Solano de Melo, que muito contribuiu e auxiliou na avaliação histológica do meu trabalho.

A grande amiga Tatiana, saudades de nossas conversas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de mestrado e de auxílio à pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

Ao Prof. Dr Joaquim Coutinho Neto por ter cedido a Biomembrana de Látex,

A querida Luciana pela amizade e grande ajuda.

Aos amigos e orientados da Profa. Márcia: Leandro e Ana Carolina.

Ao Sr. Orandir, na ajuda do processamento de meu material. Obrigada!

Aos funcionários Iara, D. Marilda, Cobrinha, Clara, por me ajudarem sempre quando necessário.

Aos professores que participaram das bancas de qualificação, Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo e Profa. Dra. Paola de Castro Moraes; e de defesa da minha Dissertação, Profa. Dra. Paola de Castro Moraes e Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, pela contribuição na redação final deste trabalho.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos coelhos, que não puderam optar pela participação na pesquisa. Sem vocês não atingiria meu objetivo. Agradeço e peço desculpas.

SUMÁRIO

	“Página”
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ESQUEMAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. ESTÔMAGO.....	3
2.1.1. Aspectos gerais sobre anatomia, histologia e fisiologia.....	3
2.1.2. Materiais utilizados em cirurgias do estômago.....	5
2.2. BIOMEMBRANA.....	7
2.3. ESTEREOLOGIA.....	12
2.4. REPARAÇÃO TECIDUAL.....	14
III. OBJETIVO.....	16
IV. MATERIAL E MÉTODO.....	17
4.1. Animais.....	17
4.2. Considerações Éticas.....	17
4.3. Aquisição da biomembrana de látex natural.....	18
4.4. Delineamento experimental.....	18
4.4.1. Pré-operatório.....	18

4.4.2. Trans-operatório.....	19
4.4.3. Pós-operatório.....	22
4.4.4. Avaliação clínica.....	22
4.4.5. Avaliação macroscópica	23
4.4.6. Avaliações microscópica e estereológica.....	23
4.4.7. Análise estatística.....	27
V. RESULTADOS.....	28
5.1. Avaliação clínica.....	28
5.2. Avaliação macroscópica.....	28
5.2.1. Grupo Biomembrana Fundo (GBF).....	29
5.2.2. Grupo Biomembrana Corpo (GBC).....	32
5.2.3. Grupo Controle Fundo (GCF).....	33
5.2.4. Grupo Controle Corpo (GCC).....	35
5.3. Avaliação microscópica.....	37
5.3.1. Grupo controle após 15 dias de pós-operatório.....	37
5.3.2. Grupo biomembrana após 15 dias de pós-operatório.....	41
5.3.3. Grupo controle após 30 dias de pós-operatório.....	43
5.3.4. Grupo biomembrana após 30 dias de pós-operatório.....	45
5.3.5. Grupo controle após 60 dias de pós-operatório.....	47
5.3.6. Grupo biomembrana após 60 dias de pós-operatório.....	50
5.4. Avaliação estereológica e estatística.....	52
VI. DISCUSSÃO.....	59

VII. CONCLUSÃO.....	65
VIII. REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fotografia de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho inteiro onde se observa no período pré-operatório a tricotomia ampla da região abdominal.	19
Figura 2	Fotografias de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho inteiro onde em A observa-se no período trans-operatório a incisão pré-umbilical sobre a linha média ventral do abdômen (círculo) e em B os quatro pontos de reparo nas extremidades cranial e caudal do plano a ser incisado.	20
Figura 3	Fotografias de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho não castrado onde se observa no período trans-operatório, após a retirada de um fragmento de 1,5cm x 1,5cm, este foi substituído pela Biomembrana (BM), de mesma dimensão e fixado fio absorvível sintético 5-0, seguido de sutura simples e contínua, em único plano.	21
Figura 4	Sistema-Teste triangular M-42 de “multiuso”. O sistema tem 21 linhas com comprimento conhecido (d) e 2 pontos de teste em cada extremidade (total de 42 pontos-teste). As linhas grossas são proibidas, ou seja, todas as estruturas que tocam as linhas grossas não são consideradas. Ao lado, o teste M-42, sobreposto à imagem a ser analisada.	26
Figura 5	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o fígado (quadrado) e aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta cheia). Em B nota-se aderências da área do implante com o omento (círculo), aderências da área do implante com alças intestinais (seta fina).	29
Figura 6	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de	30

	pós-operatório. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o fígado (F), aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta), com o baço (*) alças intestinais (▲) e omento (O). Em B nota-se a ausência de aderências da área do implante	
Figura 7	Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se a ocorrência de aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen	31
Figura 8	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o omento (círculo). Em B nota-se aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta), alças intestinais (a), fígado (F) e baço (b).	32
Figura 9	Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório. Observa-se a ocorrência de aderência da área do implante com o omento (▲), o qual foi retirado para a visualização da aderência em alças intestinais (seta).	32
Figura 10	Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se a ocorrência de aderência da área do implante com o omento (quadrado).	33
Figura 11	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o omento (seta grossa) e em B aderências da área do implante com peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta fina).	34
Figura 12	Fotografias de um coelho macho, adulto. Em A aos 30 dias de pós-operatório e em B aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se em ambos a ausência de aderências na região do implante (seta).	34
Figura 13	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Observa-se em A e B a ocorrência de aderências da área do implante com o omento (seta grossa e seta fina).	35

Figura 14	Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório. Observa-se em A a ocorrência de aderências da área do implante com o omento (seta) e com o baço (quadrado). Em B nota-se a ausência de aderências (círculo).	36
Figura 15	Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se a não ocorrência de aderências na área do implante	36
Figura 16	Fotomicrografias da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa neoformada (traço), desorganizada. Em B infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (quadrado) (Paraplast, TM, 4X e 20 X respectivamente).	37
Figura 17	Fotomicrografias da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa hiperplásica e neoformada (traço), com moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso (*) em submucosa (S). Em B nota-se o infiltrado inflamatório mononuclear difuso em maior aumento (Paraplast, TM, 4X e 20 X respectivamente)	38
Figura 18	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam camada muscular apresentando núcleos redondos e aumentados, sugerindo proliferação. (Paraplast, TM, 10X).	38
Figura 19	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam descontinuidade (círculo) da camada muscular (MU), mucosa neoformada e hiperplásica (M). Na camada muscular as fibras estão desorganizadas no foco da lesão, acompanhada de fios de sutura (F) e foco de necrose (seta). Serosa (SE), Submucosa(S) (Paraplast, TM, 10X).	39

Figura 20	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam a serosa hiperplásica com acentuada formação de tecido de granulação, necrose (seta vermelha) e fios de sutura (seta preta) (Paraplast, TM, 10X).	40
Figura 21	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam presença de infiltrado inflamatório misto multifocal na região da serosa, composta por linfócitos (seta vermelha) e pseudo eosinófilos (seta preta) (Paraplast, TM, 20X).	41
Figura 22	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam descontinuidade das camadas mucosa (M) e muscular representada por fibras musculares (seta vermelha), unidas por tecido de granulação na região da serosa (TG). (Paraplast, TM, 4X).	42
Figura 23	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas vermelha), vasos sanguíneos (V) e fibras musculares neoformadas (setas preta) (Paraplast, TM, 10X).	42
Figura 24	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam mucosa neoformada (M) com presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso (setas vermelhas) em submucosa (S) (Paraplast, HE, 4X).	43
Figura 25	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de	44

	pós-operatório, em que nota-se a mucosa (M) neoformada, desorganizada, camada muscular (MU) descontínua e ambas unidas por tecido de granulação (TG). Notou-se também a presença de fios de sutura (seta preta). Presença de fibras musculares (seta vermelha) próxima á submucosa (S) (Paraplast, TM, 10X).	
Figura 26	Fotomicrografias da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório onde em A notou-se formação de tecido de granulação (TG) na serosa, células adiposas (A) e fio de sutura (seta preta). Na figura B observou-se presença de infiltrado inflamatório misto representado por linfócitos (seta vermelha) e pseudoeosinófilos (seta preta) (Paraplast, TM, 10X e 20 X respectivamente).	44
Figura 27	Fotomicrografias da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa neoformada (quadrado) e em A e B presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso (seta) (Paraplast, HE, 4X e 10 X respectivamente)	45
Figura 28	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam camadas muscular (MU) e mucosa (M) neoformadas, descontínuas. No centro da lesão, a presença de fios de sutura (seta), necrose e discretos feixes musculares entremeados a esse tecido (seta vermelha) (Paraplast, HE, 4X).	46
Figura 29	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam infiltrado inflamatório polimorfonuclear representado por	46

	pseudoeosinófilos e linfócitos (Paraplast, TM, 40X).	
Figura 30	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório, em A observou-se serosa hiperplásica com formação de tecido de granulação com acentuado infiltrado inflamatório difuso. Em B notou-se infiltrado inflamatório difuso e (Paraplast, HE, 4X e 20X respectivamente).	47
Figura 31	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde a mucosa mostrou-se formada e hipoglandular. Observou-se tecido fibroso na região da serosa. A camada muscular neoformada e descontínua Paraplast, TM, 4X).	48
Figura 32	Fotomicrografias da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde observou-se em A proliferação de miócitos (setas) e em B infiltrado inflamatório mononuclear focal (seta) entremeados às fibras musculares (*) (Paraplast, TM, 20X e 10X respectivamente).	48
Figura 33	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde observou-se em serosa hiperplásica (SE) com tecido de granulação, e presença de fio de sutura (seta) (Paraplast, HE, 4X).	49
Figura 34	Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde observou-se infiltrado inflamatório mononuclear representado por linfócitos e células gigantes (Paraplast, TM, 20X).	49
Figura 35	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório, onde observou-se que	50

	as camadas mucosa (M), muscular interna e externa apresentaram-se completamente formadas (Paraplast, TM, 10X).	
Figura 36	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório, onde observou-se Infiltrado inflamatório mononuclear difuso em submucosa, representado por linfócitos (Paraplast, HE, 10X).	50
Figura 37	Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório, onde observou-se em A serosa (SE) hiperplásica, presença de fio de sutura (seta) e em B presença de infiltrado inflamatório mononuclear (l), representado por linfócitos (seta) (Paraplast, HE, 10X).	51

LISTA DE ESQUEMAS

		"Página"
Esquema 1	Desenho esquemático do estômago de coelho, onde se observam as regiões do cárdia (C), fundo (F), corpo (Co) e piloro (P), com destaque para as regiões do fundo e corpo, onde se realizaram os implantes (□) e onde está delimitada a área coletada	23
Esquema 2	Desenho esquemático onde estão representados o segmento colhido inicialmente em azul; a película de acetato quadriculada sobre esse segmento e, em vermelho as amostras colhidas com auxílio de "punch" para serem processadas em resina plástica.	24

LISTA DE TABELAS

		“Página”
Tabela 1	Registros referentes à densidade numérica (Nv) do Grupo Controle dos: mononucleares ,polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	52
Tabela 2	Registros referentes à densidade numérica (Nv) do Grupo Membrana de Látex dos: mononucleares ,polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	52
Tabela 3	Registros referentes à densidade de volume (Vv) do Grupo Controle dos: mononucleares, polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	53
Tabela 4	Registros referentes à densidade de volume (Vv) do Grupo Membrana de Látex dos: mononucleares, polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	53
Tabela 5	Registros referentes ao volume médio celular (V.m.c) do Grupo Controle dos: mononucleares, polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008	54
Tabela 6	Registros referentes ao volume médio celular (V.m.c) do Grupo Membrana de Látex dos: mononucleares, polimorfonuclearese vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	54
Tabela 7	Registros referentes ao número total das partículas (N) do Grupo Controle dos: mononucleares, polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	55
Tabela 8	Registros referentes ao número total das partículas (N) do Grupo Membrana de Látex dos: mononucleares, polimorfonucleares e vasos sanguíneos, observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, 2008.	55
Tabela 9	Análise de variância das variáveis: densidade numérica (Nv) dos mononucleares, densidade de volume (Vv), volume médio celular (V.m.c) e número total das partículas (N), dos perfis: vaso sanguíneos,	56

	mononucleares e polimorfonucleares avaliados em 2 grupos (biomembrana e controle) , na região do fundo e corpo e nos tempos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Os dados foram analisados na escala logarítmica de log (obs +1).	
Tabela 10	Desdobramento da interação grupo x posição para a variável densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos (Vs). Dados transformados segundo a escala logarítmica log (obs+1).	57
Tabela 11	Desdobramento da interação posição x tempo para a variável densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos (Vs). Dados transformados segundo a escala logarítmica log (obs+1).	57

**AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA, MICROSCÓPICA E ESTEREOLÓGICA DE
IMPLANTE DE BIOMEMBRANA EM ESTÔMAGO DE COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*)**

RESUMO- Neste estudo, implantou-se biomembrana de látex natural em defeito (1,5 x 1,5 cm) induzido na parede de estômago de coelhos, com o intuito de se avaliar o processo de reparação tecidual no que se refere à biocompatibilidade, capacidade de reparação e possíveis complicações. Utilizaram-se 24 coelhos, albinos, raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos inteiros, divididos em grupos experimentais: Grupo Biomembrana Fundo (GBF), Grupo Biomembrana Corpo (GBC), Grupo Controle Fundo (GCF) e Grupo Controle Corpo (GCC). Aos quinze, 30 e 60 dias de pós-operatório, os animais foram sacrificados, para as avaliações. Macroscopicamente, aos quinze dias de pós-operatório observou-se em 100% dos animais presença de aderências na face serosa e a presença da biomembrana na face luminal. Aos 30 dias de pós-operatório 37,5% dos animais avaliados apresentaram aderências na face serosa e em 62,5% dos animais não ocorreram aderências em nenhuma estrutura. Neste mesmo período, todos os animais ainda apresentavam a biomembrana na face mucosa. Aos 60 dias de pós-operatório, 50% dos animais estudados não apresentaram aderências em nenhuma estrutura e em 50% dos animais, foi observada aderências na face serosa. Neste período, em todos os animais avaliados a biomembrana não foi encontrada. Sob microscopia de luz, no grupo Biomembrana aos quinze e 30 dias verificaram-se descontinuidade das camadas muscular e mucosa, presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Foi visualizado vasos sanguíneos e fibras musculares. Aos 60 dias as camadas mucosa, muscular estavam completamente reconstituídas. No grupo GC, aos quinze e 30 dias de pós-operatório verificou-se descontinuidade da camada muscular e mucosa neoformada e presença de infiltrado inflamatório mononuclear em submucosa. Já aos 60 dias, a mucosa mostrou-se reconstituída e hipoglandular. A camada muscular neoformada apresentou-se completamente formada. As avaliações estereológicas e estatísticas foram fundamentais nas análises comparativas entre os resultados

propiciando dessa forma constatar que a densidade de volume de vasos foi significativa, fato que explica a ação cicatrizante da biomembrana. Os implantes foram compatíveis e forneceram arcabouço para orientação e desenvolvimento dos tecidos que compõem o órgão.

Palavras-chave: coelhos, estereologia, estômago, implante, látex

MACROSCOPIC, MICROSCOPIC AND STEREOLOGIC EVALUATION OF BIOMEMBRANE IN RABBITS STOMACH (*Oryctolagus cuniculus*).

SUMMARY- In this study, biomembrane of natural latex was utilized to replace a section of face of the stomach of rabbits, with purpose of evaluation of the tissue repair process in regard of its biocompatibility, scar formation ability and possible complications. Twenty-four New Zealand rabbits, adult and non-castrated males were divided in experimental groups: Biomembrane Fund Group (GBF), Biomembrane Body Group (GBC), Control Fund Group (GCF) and Control Body Group (GCC). The animals were euthanized at fifteen, 30 and 60 days of post operative, followed by analysis. Macroscopically, in fifteen days of post operative were observed in 100% of the animals presence in the serosal face, the adherences and in the luminal face the biomembrane. In 30 days of post operative 37,5% of the animals, presence in the serosal face, the adherences and 62,5% were observed in of the animals absence of the adherences. In this time, all of the animals were observed in the luminal face the biomembrane. In 60 days of post operative 50% of the animals were observed absence of the adherences, and in 50% of the animals, presence in the serosal face, the adherences. In this time the biomembrana is not in the stomach. Under light microscopy, in the Biomembrane group at fifteen and 30 days, were observed discontinuity of muscle layer and mucosa layer, presence of polimorfonuclear population of inflammatory cells. New vessels and muscle fibers were observed. In 60 days the mucosa, muscle layers were complete reconstituted. In the GP group, at 15 and 30 days of post operative were observed discontinuity of muscle layer and mucosa formed and presence of mononuclear population of inflammatory cells in submucosa. In 60 days, hypoglandular and complete layer reconstituted mucosa and muscle layers were complete reconstituted. The stereologic and statistic evaluations were fundamental to comparatives analysis, observed density volume was significant; this observation confirm of the biomembrane tissue repair process. The implants were

biocompatible and had provided the mainframe for orientation and development of the tissue layers, through repairing processes thus reestablishing the organ structure.

Keywords: rabbits, stereology, stomach, implant, latex,

I. INTRODUÇÃO

A utilização de membranas biológicas em Medicina Veterinária, como implantes na substituição parcial e reconstrução de tecidos, vem sendo praticada desde a década de 1960. O primeiro relato foi o trabalho de PIGOSSI (1967) que trabalhou experimentalmente com dura-máter homóloga de cães conservada em glicerina.

As membranas biológicas consistem em implantes de natureza orgânica, livres, inertes, podendo ser aplicadas em locais variados e são constituídas quase que exclusivamente por colágeno, substância esta que lhes confere baixa antigenicidade. Associado a essas características, as membranas apresentam, ainda, baixo custo; facilidade de obtenção e de estocagem; esterilização viável e praticidade ao manuseio (ALVARENGA, 1992).

A biomembrana de látex natural foi desenvolvida pelos pesquisadores Fátima Mrué e Joaquim Coutinho Netto, na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), da Universidade de São Paulo. Utilizou-se como matéria prima o látex natural extraído da *Hevea brasiliensis*, árvore popularmente conhecida como seringueira, o qual foi processado através de uma técnica de vulcanização diferente da convencional, que consiste no mecanismo pelo qual a Indústria da borracha produz materiais amplamente usados na prática médica como, por exemplo luvas, tubo traqueal, preservativos, entre outros (MRUÉ, 1996; MRUÉ et al., 2004).

Este compósito de látex natural com polilisina a 0,1% é promissor, não somente na área de Medicina Humana, como também em Medicina Veterinária. Por ser de origem vegetal, não apresenta potencial de transmissão de doenças ao receptor (PINHO et al., 2004).

Quanto à avaliação da eficácia do emprego deste biomaterial, vale salientar que além das análises morfológicas usuais é importante realizar avaliações mais precisas como é o caso da estereologia, que é o método mais utilizado para contagens de células ou de qualquer outro constituinte de um organismo, em que se obtém um número estimado do objeto estudado, sem subestimar ou sobreestimar o resultado, o

que poderia ocorrer em contagens utilizando métodos convencionais (BITTENCOURT, 2007).

Dessa forma objetivou-se com este estudo avaliar o processo de reparação tecidual da Biomembrana quando implantada em substituição aos fragmentos da parede do estômago em leporinos, no que se refere à biocompatibilidade, capacidade de cicatrização e possíveis complicações, mediante realização de análises macroscópicas, histológicas e do estudo estereológico de amostras colhidas de quatro grupos experimentais com seis animais cada, denominados GBF (grupo Biomembrana fundo), GBC (grupo Biomembrana corpo), GCF (grupo controle fundo) e GCC (grupo controle corpo), aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório, comparando os achados entre os grupos e os tempos experimentais.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTÔMAGO

2.1.1 Aspectos gerais sobre anatomia, histologia e fisiologia

O estômago unicavitário situa-se entre o esôfago e o intestino delgado, representando um segmento dilatado do aparelho digestório; apresenta músculos esfintéricos na entrada gástrica, denominado de cárdia, e na saída, denominado de piloro. A cárdia situa-se a esquerda do plano mediano da cavidade abdominal, representando a continuação do esôfago; já, o piloro, situa-se a direita, continuando-se com o duodeno (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1972; NICKEL et al., 1979; SISSON, 1986; DYCE et al., 1997; KÖNIG et al., 2002).

No estômago podem ser diferenciadas algumas regiões anatômicas e funcionais: a convergência dos músculos do esôfago e do estômago forma a entrada gástrica ou cárdia. O fundo é uma porção do estômago em forma de cúpula, localizado à esquerda e dorsalmente à cárdia. O corpo é a porção central, maior deles, do estômago e se estende da cárdia e do fundo à região pilórica, correspondendo ao terço distal deste órgão, de forma tubular, estendendo-se da incisão angular da curvatura menor ao orifício pilórico, onde se conecta ao duodeno (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1972; NICKEL et al., 1979; SISSON, 1986; DYCE et al., 1997; KÖNIG et al., 2002; De NOVO, 2005).

SCHWARZE & SCHRÖDER (1972); NICKEL et al. (1979) DELLMAN & BROWN (1982) e BANKS (1992) relatam que a parede deste órgão consiste, internamente de uma membrana mucosa, em sequência, de uma camada muscular e, externamente, de uma camada serosa. A membrana mucosa subdivide-se em epitélio, lâmina própria da mucosa, muscular da mucosa e submucosa. Especificamente à mucosa não glandular,

se situa próxima à cárdia apresentando-se levemente ondulada, esbranquiçada, lisa e firme, coberta com uma grossa camada de epitélio escamoso estratificado cornificado.

A lâmina muscular da mucosa está presente em todas as regiões do estômago, é constituída por duas camadas e é formada por tecido conjuntivo frouxo que permite o deslizamento da mucosa na camada muscular subjacente. A frouxa submucosa permite que a mucosa apresente dobras temporárias em decorrência pela ação da muscular da mucosa quando o estômago se contrai. A túnica muscular do estômago consiste em uma camada muscular longitudinal externa e uma camada circular interna, embora uma terceira camada de fibras oblíquas internas está restrita à região que vai do fundo ao corpo, ao redor da curvatura maior. Também, em todos os animais, a parede do canal pilórico apresenta uma espessa camada muscular longitudinal, independente dos feixes de músculo longitudinal que tomam a direção das curvaturas. Externamente, a túnica serosa reveste a maior parte do estômago e se continua na curvatura maior com o omento maior, dirige-se ao diafragma pelo ligamento gastrofrênico e à curvatura menor com o omento menor. (NICKEL et al., 1979; DELLMAN & BROWN, 1982; BANKS, 1992). A serosa, originária do peritônio, é histologicamente constituída por mesotélio associado a tecido conjuntivo (BANKS, 1992; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Esta estrutura participa das aderências pós-cirúrgicas que ocorrem na cavidade peritoneal, que são decorrentes de baixa atividade fibrinolítica no local da lesão cirúrgica, favorecendo o acúmulo de matriz de fibrina e, conseqüentemente, uma fibroproliferação, que se caracteriza por adesão (LIAKAKOS et al., 2001).

Especificamente à morfologia do estômago do coelho, BARONE (1976), descreve que este é relativamente volumoso, com capacidade de aproximadamente de 350 a 400 centímetros cúbicos. No animal vivo, ele é muito espesso, semi-cheio ou totalmente cheio. O corpo é alongado, cilindróide e apresenta uma luz restritamente circular na parte medial, nivelada por uma incisura angular clara. O fundo está situado sobre a cárdia, formando um relevo pronunciado, às vezes um pouco estreito na sua base. A superfície interna é toda atapetada por uma mucosa péptica, porque a mucosa do esôfago se arrasta bruscamente na altura da cárdia, à esquerda. Geralmente, existe

uma clara e marcante diferença de cor e de aspecto entre a parte fúndica, que é acinzentada e quase lisa, e a parte pilórica, que se apresenta muito espessa, pregueada e avermelhada ou rósea. Os orifícios da cárdia e do piloro são facilmente expansíveis. A camada muscular é muito mais delgada no fundo e na parte pilórica. A mucosa cárdica ocupa uma estreita área circular de poucos milímetros, ao redor da cárdia e suas glândulas são relativamente ricas em células parietais; já, quanto à mucosa fúndica, esta ocupa o fundo e o corpo, (exceto a metade direita que é a pequena curvatura), apresenta-se com glândulas relativamente pouco profundas, não havendo estruturação uniforme. As células parietais são muito numerosas na região vizinha da parte pilórica e sobre o fundo, sendo mais difíceis de serem encontradas na parte adjacente do corpo. A mucosa pilórica apresenta glândulas largas, ramificadas e muito sinuosas, formadas fora das células da mucosa. No piloro, esta mucosa é provida de uma camada subepitelial com nódulos linfáticos abundantes (BARONE, 1976).

2.1.2 Materiais utilizados em cirurgias do estômago

SMYRNIS (1982) utilizando “dracon patch” em coelhos para fechar defeitos na parede do estômago, não observou perda de conteúdo para a cavidade, peritonite ou aderências na área implantada. Relatou completa regeneração da mucosa e serosa após duas semanas de pós-operatório. Aos seis meses de pós-operatório, a área do implante foi recoberta e um ano e meio depois se observou completa regeneração. Para este autor a técnica mostrou-se simples, segura, com resultados satisfatórios e aplicável para o tratamento de fístulas gastrointestinais.

As anastomoses esôfago-gástricas, são frequentemente utilizadas no restabelecimento do trânsito esofágico após ressecções de doenças do esôfago distal e cárdia (SOARES et al.,1996).

Assim realizaram-se anastomoses esôfago-gástricas em cães, mediante a utilização de anel biofragmentável e de sutura por invaginação. Em ambos os grupos a reepitelização ocorreu aos 30 dias de pós-operatório e não foram observada fístulas ou

estenoses. No caso das anastomoses esôfago-gástricas com o uso do anel biofragmentável, verificou-se reação inflamatória aguda mais intensa aos sete dias de pós-operatório, com predominância de polimorfonucleares. Na fase mais tardia de pós-operatório não ocorreram diferenças evidentes na resposta celular entre as duas técnicas, observando-se predominância de mononucleares. Aos 30 dias de pós-operatório em ambos os grupos, havia tecido conjuntivo com proliferação fibroblástica normal, presença de colágeno e ausência de infiltrado inflamatório (SOARES et al., 1996).

Também em anastomoses esôfago-gástricas, CUI et al. (2000) aplicaram, em ratos, um material de látex (dreno de penrose) verificando a perda destas anastomoses.

HORI et al. (2001) implantaram esponja de colágeno na região anterior do estômago de cães para avaliação da regeneração da parede do órgão. Com quatro semanas de pós-operatório, a parede do estômago (serosa) estava regenerada, embora houvesse uma grande úlcera na região do implante, a qual não estava recoberta com mucosa; em 16 semanas de pós-operatório a lesão estava totalmente recoberta pela mucosa gástrica e a região da serosa apresentava-se recoberta por omento. Verificou-se, microscopicamente, que na quarta semana de pós-operatório, a região regenerada era formada por tecido conjuntivo e infiltrado inflamatório composto de neutrófilos e na décima sexta semana verificou-se presença de camada muscular.

Foi utilizado material de politetrafluoretileno (ePTFE) de diferentes origens de) em algumas regiões do trato gastrointestinal de cães (estômago, intestino delgado e cólon). No estômago, aplicou-se o PDX® (preclude dura membrane) observando-se na sexta semana de pós-operatório a completa cicatrização da camada serosa, embora a mucosa não estivesse cicatrizada. Além disso, não foram evidenciados sinais de peritonite (OH et al., 2002).

Para KUNG (2002), quando se elege o fechamento primário através de suturas de tensão em casos de obstruções gástricas, o risco de deiscência e mortalidade é grande. Assim, este autor optou por utilizar em seres humanos um material bioinerte de politetrafluoretileno, o Teflon-Felt®, empregados em defeitos vasculares, para o

fechamento de grandes perfurações gastroduodenais, desta forma, o extravazamento de conteúdo, ocorrência de tensão na sutura, mas permitindo a cicatrização das úlceras na presença do material implantado.

De la FUENTE et al. (2003) utilizaram a submucosa de intestino delgado de suínos para estimular a cicatrização de defeitos realizados experimentalmente no estômago de ratos. Após três semanas do pós-operatório todos os animais sobreviveram, obtiveram ganho de peso e não demonstraram sinais de peritonite. Microscopicamente, o defeito, foi completamente fechado por tecido de granulação e fibrose na face externa, observando-se na face luminal completa ulceração.

2.2 BIOMEMBRANA

Dentre os princípios do emprego de membranas, originárias de diferentes espécies animais, assim como de implantes sintéticos, salienta-se a característica de fornecer arcabouço para orientação e desenvolvimento de novos tecidos mediante processos de reparação, que restabeleçam a estrutura e a função do órgão atingido (BATISTA et al., 1996), além de permitir aderência celular e estimular os vários tipos celulares, especialmente os polimorfonucleares envolvidos nos processos de cicatrização de feridas (SOUZA et al., 2007).

No implante da biomembrana em substituição parcial de segmento esofágico cervical em oito cães, MRUÉ (1996) verificou que, em média, no décimo dia após o procedimento, todos os animais expeliram as próteses, que apareceram íntegras nas fezes. Ao realizarem endoscopias e colheita de material para análise histológica, constataram presença de tecido esofágico neoformado semelhante ao tecido nativo, com epitelização, fibras musculares de tamanho variados e acentuada neovascularização.

A biomembrana foi utilizada como implante transitório em miringoplastia de 35 pacientes humanos com perfuração timpânica, em graus variáveis, verificando-se que

em 100% dos casos a reparação foi acelerada e apresentou intensa neovascularização (OLIVEIRA et al., 1998).

O biopolímero foi inicialmente utilizado, na rotina clínica médica, para tratamento de úlceras crônicas de membros inferiores. POTÉRIO-FILHO et al. (1999) aplicaram a membrana sob forma de curativos diários em 11 pacientes que possuíam úlceras isquêmicas nessa região há mais de quatro meses, observando a acelerada ocorrência de reparação tecidual, decorrente da potente ação angiogênica do produto. Seis pacientes apresentaram recuperação completa das úlceras, quatro tiveram resolução de até 50% da ferida e em somente um indivíduo a regeneração foi mínima. Salienta-se que, em nenhum caso, constataram reação adversa advinda do uso do produto.

O biopolímero foi implantado em substituição a fragmento de pericárdio, em cães, mostrando-se efetivo: houve a regeneração da serosa original, sem sinais de infecção local. Não foi observada aderência da membrana a nenhuma estrutura da cavidade torácica. Quanto aos aspectos histológicos da interface do implante com o tecido nativo pôde-se evidenciar proliferação fibroblástica e vascular, infiltrado linfoplasmocitário, além de crescente revestimento mesotelial, a partir do décimo dia de pós-operatório (SADER et al., 2000).

Na busca de material ideal para a confecção de cápsula como dispositivo de isolamento celular, especificamente no isolamento de ilhotas pancreáticas para implante em diabéticos, MENTE & GENEVIVA (2001) implantaram segmento de material a base de látex no subcutâneo do dorso de ratos normais e diabéticos, avaliando a biocompatibilidade e ocorrência de neoformação vascular; assim verificaram que após 21 dias, os dois tipos de membranas (com e sem polilisina) mostraram-se biocompatíveis com o organismo, tanto nos animais normais quanto nos diabéticos. Observaram aumento da vascularização local, também não houve aderências com o tecido adjacente, sendo as membranas facilmente removíveis. Analisando os cortes histológicos de material de todos os animais constataram que na interface tecido-membrana houve formação de epitélio constituído por células alongadas que lembravam endotélio, e também infiltrado mononuclear. No tecido frouxo de cerca de 40

µm da membrana havia discreto infiltrado inflamatório crônico, poucos fibrócitos e fibroblastos, discreta fibrose e aumento moderado da quantidade de capilares. Concluíram que mediante achados iniciais, o material pode apresentar algum potencial para a confecção de dispositivos de isolamento celular.

Em 21 pacientes que apresentavam úlceras crônicas de membros inferiores, secundárias, tanto a insuficiência venosa isolada, quanto associadas à hipertensão arterial, 16 foram submetidos a terapêutica com biomembrana e cinco com neomicina pomada. Decorridos sete dias de tratamento, em todos os indivíduos, em que se aplicou a membrana, observou-se presença de tecido de granulação; e, em média de 41,4 dias, mediante exame histopatológico, evidenciou-se reepitelização (FRADE et al., 2002a).

Em uma mulher com úlcera de aspecto necrótico e sensibilidade dolorosa local, nos membros inferiores, em decorrência de diabetes tipo II, o biopolímero foi aplicado na lesão em dias alternados e após uma semana, constatou-se tecido de granulação presente além da ausência de dor. No 15^o dia de tratamento, havia reparação em 70% da lesão; e no quarto mês, o local da ferida estava totalmente reepitelizado (FRADE et al., 2002b). Este evento também foi constatado em outros quatro pacientes portadores de diabetes tipo II que apresentavam, há mais de seis meses, úlceras em membros inferiores não responsivas às terapias convencionais (FRADE et al., 2004b).

No uso da membrana em miringoplastia realizada em 200 pacientes, nos quais havia perfuração timpânica, constatou-se que 90,5% dos ouvidos apresentaram integração total do implante, em média, aos 28 dias pós-operatório; também foi observada a ocorrência de exuberante vascularização e hiperemia, fato este não verificado em miringoplastias clássicas. Após dois meses, os tímpanos estavam normais. (OLIVEIRA et al., 2003).

Experimentalmente, na reconstrução conjuntival de 15 coelhos, a biomembrana não aderiu ao tecido subjacente e manteve-se fixa somente pelos fios de sutura; a recuperação foi satisfatória em nove animais, sugerindo que a membrana acelerou a reparação da conjuntiva, à semelhança do que ocorre quando implantada em outros tecidos. No estudo histopatológico foi relevante a presença de elevado número de

vasos, por campo óptico que foram analisados mediante escore, sendo estes o dobro do constatado no tratamento convencional, este fato confirma a capacidade desta membrana em promover a neoangiogênese, além de propiciar rápida epiteliação, que pôde ser constatada aos cinco dias de pós-operatório (PINHO et al., 2004).

A biomembrana de látex natural com polilisina a 0,1% foi utilizada no tratamento cirúrgico de um cão da raça Poodle, macho, de 10 anos de idade, que apresentava hérnia perineal esquerda. O biomaterial foi suturado aos músculos da região, visando à oclusão do anel herniário. A membrana induziu a formação de um arcabouço de tecido fibroso, reconstruindo o diafragma pélvico e evitando recidivas; todavia, houve a necessidade de remoção do implante após cinco meses de pós-operatório, uma vez que surgiu um orifício de drenagem na região operada (PAULO et al., 2005a).

A eficácia do implante de três tipos de materiais (biomembrana de látex sem polilisina 0,1%, com polilisina 0,1% e malha de marlex), utilizados na reparação de defeitos iatrogênicos da parede muscular abdominal ventral de 31 ratos Wistar, foi analisada, aos cinco e 120 dias após o procedimento cirúrgico. Pela avaliação macroscópica observou-se deiscência e evisceração. Já através de avaliação histopatológica de fragmentos da lesão verificou-se, então, a eliminação de ambas as biomembranas de látex, em período médio de 13,8 dias após o seu implante, com a permanência de tecido fibroso, que sustentou a parede abdominal, tal ocorrência também foi verificada com o uso da tela de márlex, embora este material necessitou de retirada mecânica, pois não foi eliminado (PAULO et al., 2005b).

RABELO et al. (2005) utilizaram o compósito de látex, poliamida e polilisina a 0,1%, na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em 12 bovinos leiteiros. Macroscopicamente, verificaram-se associação intensa entre o tecido conjuntivo neoformado e o tecido muscular adjacente, promovendo adequada estabilidade. Além disto, sob microscopia de luz, constatou-se, aos 15 dias de pós-operatório, proliferação de fibroblastos, neovascularização, áreas com a presença de hemácias e infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN).

Aos 30 e 40 dias de observação, a neovascularização não era tão evidente e no infiltrado inflamatório predominavam os macrófagos.

Para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomia foram analisadas 64 orelhas de humanos submetidos a esta técnica e a meatoplastia. A membrana de látex foi utilizada em 54 das orelhas operadas, sendo que, nas outras 10 orelhas, foi realizado o tamponamento da cavidade, somente com fita cardíaca. Na maioria das 54 orelhas onde a membrana foi utilizada observou-se grande eficácia como uma interface biocompatível entre a área cruenta de osso da neocavidade e o tecido de algodão utilizado para seu tamponamento, forrando toda a extensão da neocavidade, com capacidade de neoangiogênese e cicatrização, facilitando a remoção do tampão e a epitelização da neocavidade (SOUZA *et al.*, 2007).

Foram implantados dois tipos de membranas de látex confeccionadas no Laboratório de tecnologia química da Universidade de Brasília (LATEQ – UnB) e uma membrana já em uso no comércio: M1 - látex *in natura* (não centrifugado), M2 - látex *in natura*, mais enxofre (3ml) e ácido fórmico; M3 - látex centrifugado, polilisina 0,1%^a (modelo comercial) no intuito de verificar a biocompatibilidade e a resistência dos três diferentes tipos de membranas de látex. Os implantes foram colocados entre os músculos cutâneo e reto do abdome, em seis cadelas, mediante procedimento cirúrgico e, após 45 dias, foram removidos e submetidos a exames histológicos e verificou-se que as diferentes formulações para as membranas de látex testadas oferecem resistência apropriada para a sua implantação na reparação da bainha muscular em cães; no entanto, apenas as formulações das membranas M1 e M3 são biocompatíveis (ZIMMERMANN *et al.*, 2007).

FUGIMOTO *et al.* (2007), utilizaram a biomembrana de látex para estimular a cicatrização da cavidade orbitária em humanos. A granulação da cavidade orbitária com o uso deste biomaterial não foi satisfatória devido à grande área para que ocorresse a granulação.

2.3 ESTEREOLOGIA

Estudando a composição mineralógica constituintes de algumas rochas, o geólogo DELESSE (1848) desenvolveu a partir da observação de que o volume de minerais contidos na rocha era o mesmo que a área dos cristais contidos na superfície polida. Isto é a base metodológica da estereologia, que atualmente é aplicada a partir de grades estereológicas ou sistemas-testes (LOPES-PAULO, 2002).

O emprego de avaliações morfológicas e, principalmente, estereológicas foram fundamentais na análise comparativa entre mucosa vesical normal e comprometida por variados graus de carcinoma em humanos, pois permitiu a estimativa imparcial do volume nuclear das células epiteliais vesicais sendo esses dados mais precisos essenciais na diferenciação entre lesões neoplásicas e não neoplásicas (NIELSEN et al., 1986).

Nos últimos 50 anos, estudos estereológicos apareceram com maior frequência na literatura. O objetivo destes é determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas, a partir de cortes bidimensionais. Utiliza a geometria e os cálculos são baseados na estatística, sendo os dados obtidos provenientes diretamente da microscopia óptica e eletrônica. Eles têm como conceito básico determinações “sem desvio” (sem viés) e pouca variabilidade (PEREIRA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2001 *apud* THIEL, M., 2006).

A Estereologia apresenta ainda vantagens científicas sobre estudos qualitativos, uma vez que os resultados são numéricos e não subjetivos, sendo portanto reproduzíveis em qualquer outro laboratório, além é do fundamento estatístico bem estabelecido que respalda este método (PEREIRA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2001 *apud* THIEL, M., 2006).

Realizou-se experimentalmente a obstrução uretral em “minipigs” para observar a ocorrência de possíveis alterações morfológicas na bexiga destes animais. À análise estereológica pode-se quantificar o tamanho e o número de células vesicais, além do tipo de colágeno presente, sendo observada, após o período de recuperação, mudança

irreversível quanto ao aumento no número de células musculares lisas e maior proporção de colágeno tipo I em relação ao II. Por outro lado, constatou-se que todas as outras alterações foram reversíveis (NIELSEN, 1997).

Em estudo sobre os efeitos da obstrução uretral parcial na musculatura da bexiga urinária de coelhos da raça Norfolk, realizado através de ferramentas estereológicas, SASAHARA et al. (2007), obtiveram os seguintes resultados: o volume referencial apresentou um aumento de 11,07x, 7,98x e 31,7x quando comparado com o grupo controle; a densidade numérica aumentou 0,06x e 0,05x para os grupos de 3 e 7 semanas, respectivamente, em relação ao grupo controle; os grupos de 3, 7 e 12 semanas apresentaram, respectivamente, um aumento de 0,81x, 12,56x e 38,43x em número total de células; a densidade de volume para os grupos de 3, 7 e 12 semanas apresentou um aumento de 0,97x, 0,56x e 0,86x em relação ao grupo controle; e finalmente, o volume médio da fibra muscular apresentou um aumento de 0,62x, 0,81x e 0,82x, respectivamente para os animais de 3, 7 e 12 semanas. Além disso, relataram que os dois mecanismos: hipertrofia e hiperplasia ocorrem na bexiga urinária de coelhos, porém detalha a seqüência exata em que aparecem.

ÁGUILA et al. (1998) fizeram uso desta metodologia para comparar as diferenças quantitativas na composição e estrutura do miocárdio de ratos jovens e idosos, revelando que no envelhecimento ocorre perda de miócitos cardíacos e hipertrofia das células remanescentes.

Entre outras aplicabilidades, a estereologia possibilitou detectar e quantificar as alterações que ocorrem na parede do cólon em consequência da derivação. Embora reversíveis com a reconstituição do trânsito intestinal, são passíveis de sofrer alterações tróficas e inflamatórias e adquirem importância nos pacientes cuja derivação torna-se permanente por razões de ordem clínica, assim como no diagnóstico diferencial com outras doenças inflamatórias (LOPES, 2002).

O diagnóstico de algumas formas de hiperplasia endometrial é complicado devido a controvérsias sobre os critérios histológicos. No entanto, com microscopia óptica e estereologia foram estudadas as glândulas (epitélio e luz) e o estroma, determinando-se

as densidades de volume, de superfície e de comprimento. Após a análise dos resultados obtidos, estes corroboram com estudos prévios que demonstraram a importância de parâmetros quantitativos no diagnóstico das patologias do endométrio, oferecendo novos parâmetros estereológicos para esta análise (AVVAD-PORTARIL et al., 2003).

2.4 REPARAÇÃO TECIDUAL

Os processos de cicatrização tecidual, essenciais para a sobrevivência dos seres vivos, de um modo geral, são fenômenos que podem ser apresentados subdivididos nas seguintes fases: (1) fase de Coagulação, de início imediato logo após o trauma, caracterizada pela formação de um tampão hemostático primário (crosta hemato-fibrinosa), formado por plaquetas, ativação dos fatores da coagulação e liberação de mediadores químicos solúveis, responsáveis pelo desencadeamento dos estágios subsequentes; (2) fase inflamatória, responsável por alterações vasculares e influxo de células inflamatórias (polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos) para o sítio da lesão; (3) fase de proliferação, caracterizada pela proliferação de células endoteliais de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese), fibroblastos e produção de matriz colágeno, responsáveis pela formação do tecido de granulação, e início da proliferação de células epiteliais das camadas basais; e (4) fase reparadora, responsável pela remodelagem tecidual, com a substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso, e a recomposição celular da epiderme (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998; STEVENS, 2000; ROBINS et al; 2005).

Em feridas cirúrgicas, aproximadas por suturas, ocorre cicatrização por primeira intenção, evento este também denominado de união primária. A cicatrização por segunda intenção acontece quando a perda de células e tecidos é mais intensa. No processo de cicatrização tanto por primeira, quanto por segunda intenção, ocorrem as seguintes etapas: No período inicial de 24 horas, surgem neutrófilos nas margens da incisão, que se deslocam para o coágulo de fibrina. A epiderme sofre espessamento

nas bordas seccionadas em decorrência da atividade mitótica das células basais, e, entre 24 a 48 horas, projeções de células epiteliais das bordas migram e crescem ao longo das margens cortadas da derme, depositando componentes da membrana basal (MB) à medida que se deslocam. Essas células fundem-se na linha média, abaixo da crosta superficial, produzindo, assim, uma camada epitelial contínua, porém fina. A partir do terceiro dia, os neutrófilos são, em sua maior parte, substituídos por macrófagos. O tecido de granulação invade progressivamente o espaço da incisão. Nesse momento, aparecem fibras de colágeno nas margens da incisão; sendo que, inicialmente, possuem orientação vertical e não estabelecem pontes sobre a incisão. A proliferação de células epiteliais prossegue com conseqüente espessamento da camada epidérmica de revestimento. Até o quinto dia, o espaço incisional é preenchido por tecido de granulação. A neovascularização torna-se máxima. As fileiras de colágeno ficam mais abundantes e começam a formar pontes na incisão. A epiderme recupera a sua espessura normal, e a diferenciação das células superficiais produz uma arquitetura epidérmica madura com queratinização superficial (COTRAN et al., 2000).

COTRAN et al., (2000) acrescentaram que durante a segunda semana, ocorre acúmulo contínuo de colágeno, bem como proliferação dos fibroblastos. O infiltrado de leucócitos, o edema e o aumento da vascularização já desaparecem em sua maior parte. Nessa ocasião, inicia-se o longo processo de empalidecimento, devido ao aumento do acúmulo de colágeno na cicatriz incisional, acompanhado de regressão dos canais vasculares. No final do primeiro mês, a cicatriz consiste em tecido conjuntivo celular destituído de infiltrado inflamatório, recoberto por uma epiderme intacta. Os anexos dérmicos destruídos na linha de incisão são perdidos permanentemente. A força elástica da ferida aumenta posteriormente, mas podem ser necessários meses para que a recuperação tecidual consiga sua força máxima. Embora ocorra cicatrização eficiente da maioria das lesões cutâneas, a cicatriz final pode não ser funcionalmente perfeita. Os anexos epidérmicos não se regeneram, e pode permanecer uma cicatriz densa de tecido conjuntivo no lugar da rede mecanicamente eficiente de colágeno na derme não lesada.

III. OBJETIVO

Com este estudo objetivou avaliar o processo de reparação tecidual da Biomembrana quando implantadas em substituição aos fragmentos da parede do estômago em leporinos. Foram avaliadas a biocompatibilidade, capacidade de cicatrização e possíveis complicações, mediante realização de análises macroscópicas, histológicas e do estudo estereológico de amostras colhidas de quatro grupos experimentais com seis animais cada, denominados GBF (grupo Biomembrana fundo), GBC (grupo Biomembrana corpo), GCF (grupo controle fundo) e GCC (grupo controle corpo), aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório, comparando os achados entre os grupos e os tempos experimentais.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 24 coelhos albinos, neozelandeses, adultos, machos, inteiros e com peso de aproximadamente 2 a 2,5 kg provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Anatomia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da instituição acima mencionada, em gaiolas individuais de dimensões de 80cm x 50cm x 35cm. Foi fornecida ração comercial¹, própria para a espécie, e água “*ad libitum*”.

Os coelhos foram distribuídos, aleatoriamente, em quatro grupos experimentais com seis animais cada, denominados GBF (grupo Biomembrana fundo), GBC (grupo Biomembrana corpo), GCF (grupo controle fundo) e GCC (grupo controle corpo).

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV, Câmpus de Jaboticabal, UNESP, sob protocolo n° 009819-07, pois está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

¹ Purina, Linha Natural Coelhos, Caixa Postal 21100, CEP 04602-970

4.3 AQUISIÇÃO DA BIOMEMBRANA DE LÁTEX NATURAL

A Biomembrana, nome comercial Biocure²® produzida pela empresa Pelenova Biotecnologia S. A., inscrita no CNPJ sob o nº 05 051 581/0001-01, foi fornecida pelo Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O produto foi mantido em sua embalagem original até o momento do procedimento cirúrgico e armazenado em local fresco e seco.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 PRÉ-OPERATÓRIO

Os coelhos foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas. Realizou-se medicação pré-anestésica (sedação) com a utilização de acepromazina 1%³, na dose de 1mg/kg, por via intramuscular (IM) e butorfanol⁴, na dose de 1mg/kg, por via IM.

A veia auricular intermediária (BARONE, 1996) foi canulada com cateter apropriado, no qual foi conectada solução fisiológica de NaCl a 0,9%, que foi mantida em infusão contínua e lenta até o término do procedimento cirúrgico. Em seguida, a anestesia foi conduzida com a associação tiletamina e zolazepam⁵, na dose de 10 mg/kg, por via intravenosa (IV). Para manutenção anestésica foi utilizado o anestésico volátil halotano⁶, por meio de máscara conectada a um circuito semi-fechado.

² Pelenova Biotecnologia S. A., inscrita no CNPJ sob o nº 05 051 581/0001-01

³ Acepran a 1%-Univet S.A. R. Clímaco Barbosa, 700. São Paulo – SP

⁴ Tengesic Fort Dodge Saúde Animal Ltda. Rod. Luiz Fernando Rodrigues, 1701. Campinas –SP

⁵ Zoletil 50. Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda. Av. eng. Eusébio Stevaux, 1368 São Paulo – SP

⁶ Tanohalo. Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda. Rod. Itapira-Lindóia, Km 14 Itapira – SP

Posicionou o coelho e realizou-se ampla tricotomia da região abdominal mediana (Figura 1). Na sequência, uma anti-sepsia, nesta região, foi efetuada como de rotina.

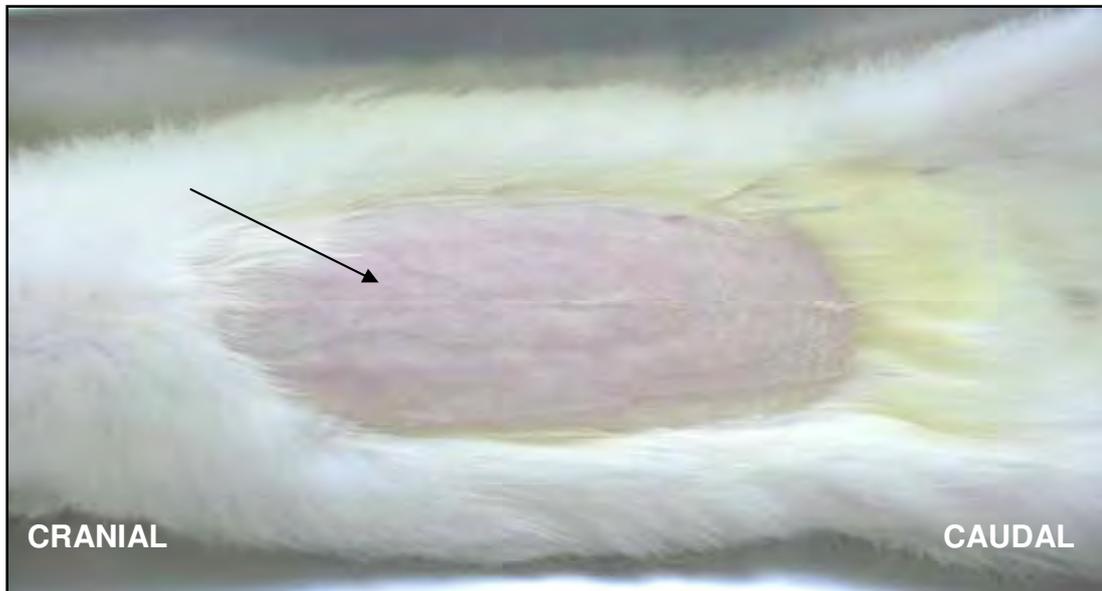


Figura 1. Fotografia de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho não castrado onde se observa no período pré-operatório a tricotomia ampla da região abdominal (seta)

4.4.2 TRANS-OPERATORIO

Realizou-se uma incisão pré-umbilical sobre a linha média ventral do abdômen (Figura 2A). Foi divulsionado o subcutâneo e incisado em estocada a musculatura abdominal, sobre a linha alba, com posterior prolongamento cranial e caudal da incisão, usando-se tesoura romba. Localizado o estômago, ele foi tracionado, inspecionado próximo à incisão abdominal e isolado do restante das estruturas adjacentes com compressas cirúrgicas úmidas.

Foram colocados quatro pontos de reparo nas extremidades cranial e caudal do plano a ser incisado, para auxílio e facilitação da manipulação do órgão (STONE, 1996) (Figura 2B).

A incisão do estômago foi realizada em sentido longitudinal, no ponto médio entre a curvatura maior e menor, no local de menor irrigação visceral.

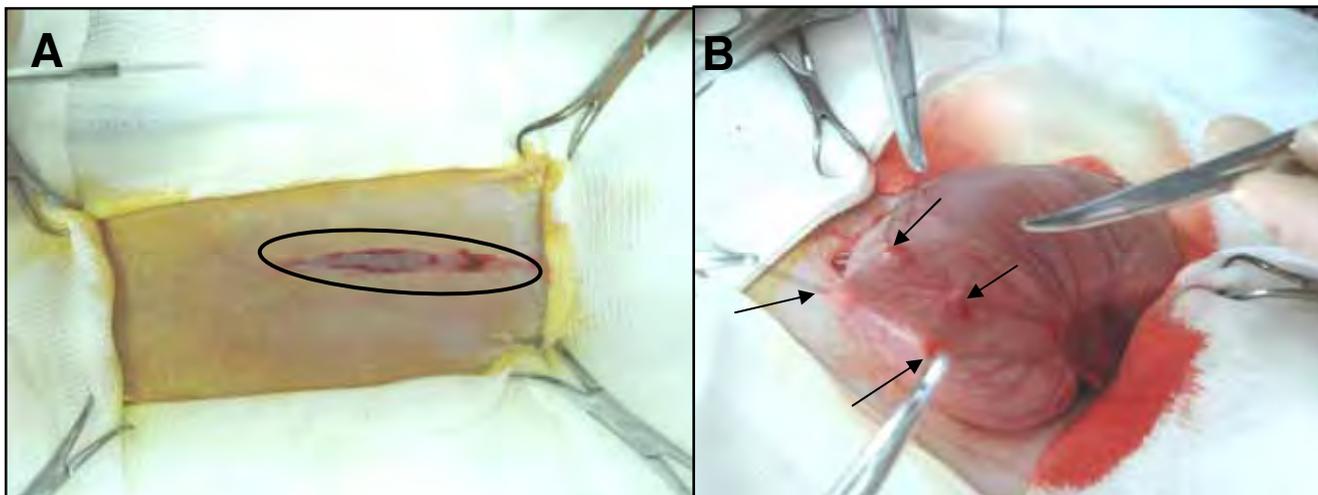


Figura 2: Fotografias de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho não castrado onde em A, observa-se, no período trans-operatório a incisão pré-umbilical sobre a linha média ventral do abdômen (elipse) e em B os quatro pontos de reparo nas extremidades cranial e caudal do plano a ser incisado (setas).

As diferenças no procedimento cirúrgico entre os grupos foram:

- para os grupos GBF e GBC: Após incisão em estocada, foi retirado um fragmento de 1,5cm x 1,5cm com tesoura de Metzembaun. Este fragmento foi substituído pela Biomembrana, de mesma dimensão. A Biomembrana foi retirada de sua embalagem original de maneira asséptica para ser implantada. Foi fixado o fragmento de membrana na parede gástrica do fundo (GBF) e do corpo (GBC) por meio de quatro pontos simples de reparo, um em cada ângulo, com fio absorvível sintético (Vicryl®)⁷ 5-0, seguido de sutura simples e contínua, em único plano, entre os pontos de reparo, onde se empregou o mesmo fio de sutura. A sutura realizada foi seromuscular, o que evitou o contato do fio com a luz do órgão (Figura 3).

⁷ Ethicon. Johnson & Johnson Medical Devices & Diagnostics Group – Brasil



Figura 3. Fotografias de um coelho albino, neozelandese, adulto, macho não castrado onde se observa no período trans-operatório, após a retirada de um fragmento de 1,5cm x 1,5cm, este foi substituído pela Biomembrana (BM), de mesma dimensão e fixado fio absorvível sintético (Vicryl®) 5-0, seguido de sutura simples e contínua, em único plano.

Após essa etapa, quatro pontos simples separados, foram fixados ao redor da interface enxerto-tecido nativo. O fio, neste caso, foi inabsorvível sintético 3-0 (nylon) uma vez que os pontos transpassam somente as camadas serosa e muscular. Esses quatro pontos serviram para referência futura da interface enxerto-tecido (KROPP, 1998; NUININGA et al., 2004);

- para o grupo GCF e GCC: O estômago somente sofreu uma incisão de aproximadamente 1,5cm longitudinalmente, na região do fundo (GCF) e na região do corpo (GCC), no local de menor irrigação visceral. Em seguida, foi realizada uma gastrorrafia com fio absorvível sintético (Vicryl®) 5-0 em dois planos de sutura de padrão inversor cushing/cushing (FOSSUM, 2002).

Após a sutura, a incisão foi omentalizada, o estômago devolvido para sua posição anatômica normal, as compressas removidas e a cavidade abdominal foi lavada copiosamente com solução salina morna.

Nos quatro grupos (GBF, GBC, GCF e GCC), para a realização da laparorrafia, o material cirúrgico e luvas contaminados por conteúdo gástrico foram trocados e procedeu-se a sutura da camada muscular, a redução do subcutâneo e a sutura de pele foram realizadas como de rotina.

4.4.3 PÓS-OPERATÓRIO

Depois de completamente recuperados da anestesia, os animais receberam ração sólida e água “*ad libitum*” após o procedimento cirúrgico.

Intituiu-se antibioticoterapia com sulfa-trimetoprim⁸, na dose de 15mg/kg por via oral a cada 12 horas durante sete dias consecutivos. Excetuando-se a primeira dose, que foi administrada por via intramuscular no trans-operatório.

Terapia antiinflamatória teve início no pós-operatório imediato, administrando-se a droga flunixin-meglumine⁹ (antiinflamatório não hormonal) na dose de 1mg/kg por via subcutânea (SC), a cada 24 horas durante três dias subsequentes. O intuito desta terapia é o alívio da dor, uma vez que esse fármaco possui ação analgésica, além de ação antipirética e antiendotoxêmica.

Para a limpeza da ferida cirúrgica utilizou-se iodo povidine a cada 24 horas durante sete dias.

4.4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Um exame clínico foi realizado diariamente, a cada 12 horas durante os sete primeiros dias e, posteriormente, a cada 48 horas, durante o período que se julgou necessário. Ao exame foram observados recuperação anestésica, aspecto da ferida cirúrgica, estado geral do coelho e aspecto da urina e das fezes quando presentes no recinto.

Para avaliações macro e microscópica do estômago, cada coelho foi sacrificado em tempos distintos. Para este procedimento utilizou-se uma dose elevada de pentobarbital¹⁰ (150 a 200mg/kg) por via IV, procurando evitar qualquer tipo de desconforto ao animal. Essas avaliações ocorreram em três tempos diferentes: aos 15

⁸Bacteracin suspensão. Lab. Teuto Brasileiro S/A. ZP7 – D, módulo 11, quadra 13, DAIA. Anápolis – GO

⁹Banamine. Schering Plough Coopers. Av. Sir Henry Wellcome, 335. Cotia – SP

¹⁰Thionembatal. Abbott Labs. do Brasil Ltda. R. Nova York, 245. São Paulo – SP

dias, 30 dias e 60 dias pós-operatórios. Dois coelhos de cada grupo experimental (GBF, GBC, GCF e GCC) foram sacrificados em cada um desses tempos.

4.4.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

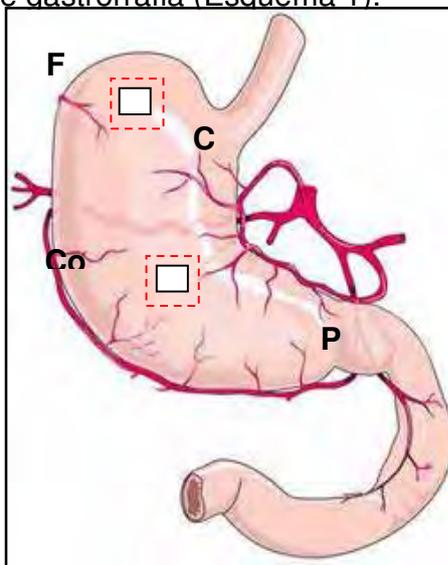
Seguida à eutanásia, a cavidade abdominal de cada coelho foi exposta e o respectivo estômago investigado quanto aderências de órgãos, falha no enxerto, necrose, fístula, inflamação local e presença de líquidos na cavidade.

Na hipótese de coleções líquidas na cavidade as mesmas foram enviadas para análise laboratorial.

Todas as análises laboratoriais necessárias foram feitas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

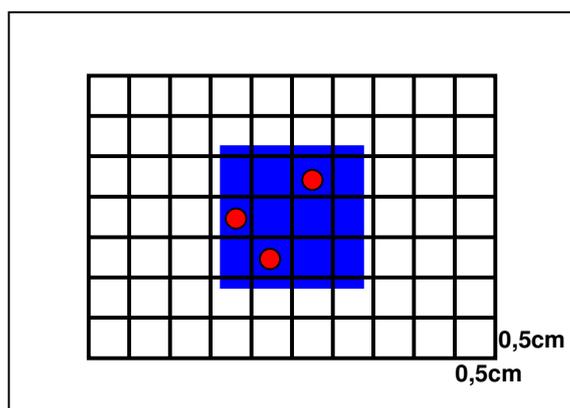
4.4.6 AVALIAÇÕES MICROSCÓPICA E ESTEREOLÓGICA

Feita a avaliação macroscópica, foram retirados, inclusive dos pertencentes do grupo controle, fragmentos de aproximadamente 3,5cm², contendo a interface implante com tecido nativo e região de gastrorrafia (Esquema 1).



ESQUEMA 1. Desenho esquemático do estômago de coelho, onde se observam as regiões do cárdia (C), fundo (F), corpo (Co) e piloro (P), com destaque para as regiões do fundo e corpo, onde se realizaram os implantes (□) e onde está delimitada a área coletada (□).

Para o estudo estereológico, necessitou-se da retirada de amostras do segmento total. Para tanto, sobre cada segmento colocou-se uma película de acetato quadriculada ($0,5\text{cm} \times 0,5\text{cm} = 0,25\text{cm}^2$) e colheram-se três amostras aleatórias com o auxílio de um “punch” de 0,3 cm (Esquema 2).



ESQUEMA 2. Desenho esquemático onde estão representados o segmento colhido inicialmente em azul; a película de acetato quadriculada sobre esse segmento e, em vermelho as amostras colhidas com auxílio de “punch” para serem processadas em resina plástica.

Estas amostras foram colocadas em fixador Karnowisk, seguidas de sua inclusão em Historesin¹¹ (Leica-Germany), onde o material foi lavado em tampão fosfato a 0,1M, pH7,4, durante oito dias consecutivos para retirada do excesso de fixador. Após esta etapa, procedeu-se o processo de desidratação do material com álcool a 70%, seguido de sua conservação em álcool a 80%, sob refrigeração. A infiltração do material ocorreu em solução constituída por historesina e álcool a 80%, por aproximadamente quatro horas. Em seguida, o material foi incluído em histomold para a polimerização inicial em temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos e polimerização final em estufa sob temperatura de 37,5⁰C, por uma semana. A microtomia deste material foi realizada em micrótopo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 1 a 3 μm com auxílio de

¹¹ Leica Microsystems Nussloch GmbH. Heidelberger Str. 17-19. Germany.

navalhas de vidro. Depois de realizado este procedimento, os cortes foram fixados em lâminas e submetidos às colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e de Azul de Toluidina (AT).

O restante do material foi fixado em solução tamponada de formol a 10%, sendo posteriormente incluídos em Histosec[®] (Merck). Para inclusão em Histosec^{®12}, o material foi lavado em álcool a 70%, durante sete dias, para retirar o excesso do fixador. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação, em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), por aproximadamente 90 minutos. Após este procedimento, a embebição do material foi feita em Histosec[®] por 90 minutos, na faixa de 60^oC a 70^oC de temperatura, onde se procedeu a inclusão. A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155), obtendo-se cortes de 5µm com auxílio de navalhas descartáveis, que foram fixados em lâminas e submetidos às colorações por Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

Todas as preparações foram fotodocumentadas em microscópio de luz Leica DM 5000 B para análise morfológica.

Em sequência, o material foi analisado por meio de estudo estereológico, com auxílio do “Software Leica Application Suite”. Assim, em cada corte foram analisados quatro campos aleatórios, perfazendo um total de 16 áreas teste, analisadas em cada fragmento. Foram avaliados os seguintes perfis celulares presentes do processo de reparação do estômago: número total de mononucleares, polimorfonucleares, além de vasos, presentes do processo de reparação tecidual, em cada tempo determinado. Para obtenção da densidade numérica foi empregada a seguinte fórmula matemática:

$N_v = \sum Q^- / \sum V$, onde:

Q^- = o número das partículas contadas em cada disector utilizado;

V = volume de cada disector.

¹² Merck KGaA. 64271 Darmstadt. Germany

Utilizou-se ainda neste tipo de avaliação, o sistema-teste, que consiste de um conjunto de linhas tanto retas, quanto curvas, ou de pontos apresentando os arranjos geométricos triangular, quadrado ou hexagonal. Cada um destes arranjos determina as características básicas do sistema-teste (AHERNE e DUNNILL,1982). Este sistema foi superposto à imagem a ser analisada, de forma aleatória. Neste estudo priorizou-se o sistema-teste modelo M-42 (arranjo triangular), uma vez que apresenta melhor distribuição de pontos, com mais pontos-teste por unidade de área - mais pontos = mais precisão (Figuras 3 A e B).

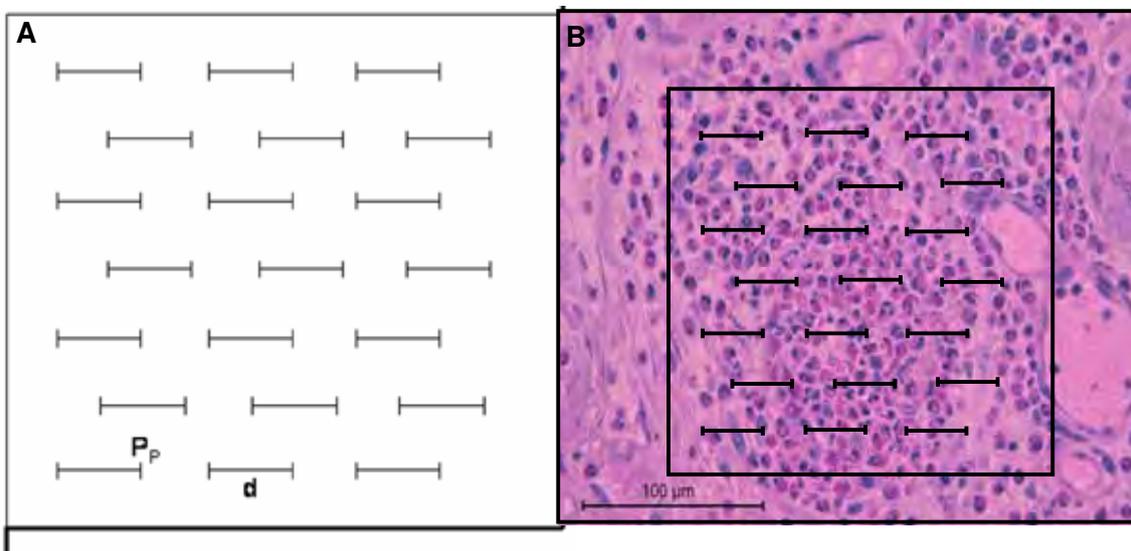


Figura 4 – Em A Sistema-Teste triangular M-42 de “multiuso”. O sistema tem 21 linhas com comprimento conhecido (d) e 2 pontos de teste em cada extremidade (total de 42 pontos-teste) As linhas grossas são proibidas, ou seja, todas as estruturas que tocam as linhas grossas não são consideradas. Em B, o teste M-42, sobreposto à imagem a ser analisada.

A densidade de volume (Vv) foi determinada pela contagem dos pontos, considerando-se os pontos que apenas tocavam os diferentes perfis celulares de acordo com a fórmula abaixo, sendo $P_{(p.c.)}$ o número dos perfis celulares que coincidem com os pontos do teste M-42 e P_t o número total de pontos teste = 42

$$Vv (p.c.) = \frac{P(p.c.)}{P_t}$$

Já o volume médio (Vol) de cada parâmetro celular (p.c.) foi determinado pela relação seguinte (Águila,1998):

$$V(p.c.) = \frac{Vv(p.c.)}{Nv(p.c.)}$$

E finalmente, o número total das partículas (N) foi obtido multiplicando-se a densidade numérica (Nv) dos perfis celulares, que é amostrada entre o número total destes perfis e o volume total dos disectors utilizados, pelo Volume Referência ou Volume Celular do órgão. De acordo com Águila et al (1998) o volume da bexiga V(bex), foi considerado o peso da bexiga; P(bex), uma vez que a gravidade específica da solução salina em que as bexigas forma pesadas é de aproximadamente 1,0048 e o P(bex), foi aferido usando-se o método de Scherle (SCHERLE, 1970; WEIBEL, 1979; AHERNE et al.,1982).

4.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo estereológico das variáveis densidade numérica (Nv), densidade de volume (Vv), volume celular médio (Vcm) e número total de partículas (N) de cada perfil (mononuclear, polimorfonuclear e vasos) foi utilizado o delineamento experimental inteiramente ao acaso, com dois grupos como tratamento principal (biomembrana e controle), duas posições (corpo e fundo), e três períodos (15, 30 e 60) de avaliação como subtratamentos e duas repetições (SAMPAIO, 2002).

A análise de variância foi realizada segundo o esquema fatorial 2 X 2 X 3 e para o desdobramento foi aplicado o teste de Tuckey 5% de probabilidade (SAMPAIO, 2002).

Esta análise estatística foi efetuada pelo programa STAT, da FCAV, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

V. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para a avaliação clínica, foram avaliados a recuperação anestésica, ingestão de alimento e água, defecação, micção, aspecto geral do animal, temperatura e aspecto da ferida cirúrgica.

Mediante o protocolo anestésico empregado, os animais, que foram submetidos ao procedimento cirúrgico, apresentaram recuperação anestésica satisfatória, voltando a se alimentarem de ração própria para a espécie e a ingerirem água “*ad libitum*”. Nenhum deles apresentou anorexia ou qualquer outra alteração advinda da anestesia.

Transcorrido o período de 24 horas do procedimento cirúrgico, não foram observadas alterações fisiológicas referentes à defecação e à micção.

A temperatura corpórea foi aferida a cada 24 horas durante os sete primeiros dias de pós-operatório, mantendo-se, em todos os coelhos, em média, 39 °C.

Quanto ao aspecto da ferida cirúrgica, nenhum animal apresentou ocorrência de deiscência de sutura de pele.

5.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Após a eutanásia dos coelhos pertencentes aos grupos GBF, GBC, GCF e GCC, aos quinze, 30 e 60 dias de pós-operatório, e posterior abertura das respectivas cavidades abdominais, não se observou presença de sinais macroscópicos de rejeição ao implante, falhas no implante, presença de muco e tampouco, sinais de necrose, fístulas, inflamação e líquidos nas cavidades dos animais avaliados. Aos quinze dias de pós-operatório observou-se em 100% dos animais presença de aderências na face serosa e a presença da biomembrana na face luminal. Aos 30 dias de pós-operatório

37,5% dos animais avaliados apresentaram aderências na face serosa e em 62,5% dos animais não ocorreram aderências em nenhuma estrutura. Neste mesmo período, todos os animais ainda apresentavam a biomembrana na face mucosa. Aos 60 dias de pós-operatório, 50% dos animais estudados não apresentaram aderências em nenhuma estrutura e em 50% dos animais, foi observada aderências na face serosa. Neste período, em todos os animais avaliados a biomembrana não foi encontrada.

5.2.1 Grupo Biomembrana Fundo (GBF)

Macroscopicamente, verificou-se nos animais, sacrificados aos **quinze dias** de pós-operatório, a ocorrência de aderências na área do implante com as seguintes estruturas: omento (em 50% dos casos - 1 animal), peritônio parietal da parede ventral do abdômen (em 100% dos casos - 2 animais), alças intestinais (50% dos casos – 1 animal) e fígado (50% dos casos – 1 animal) (Figuras 5A, B).

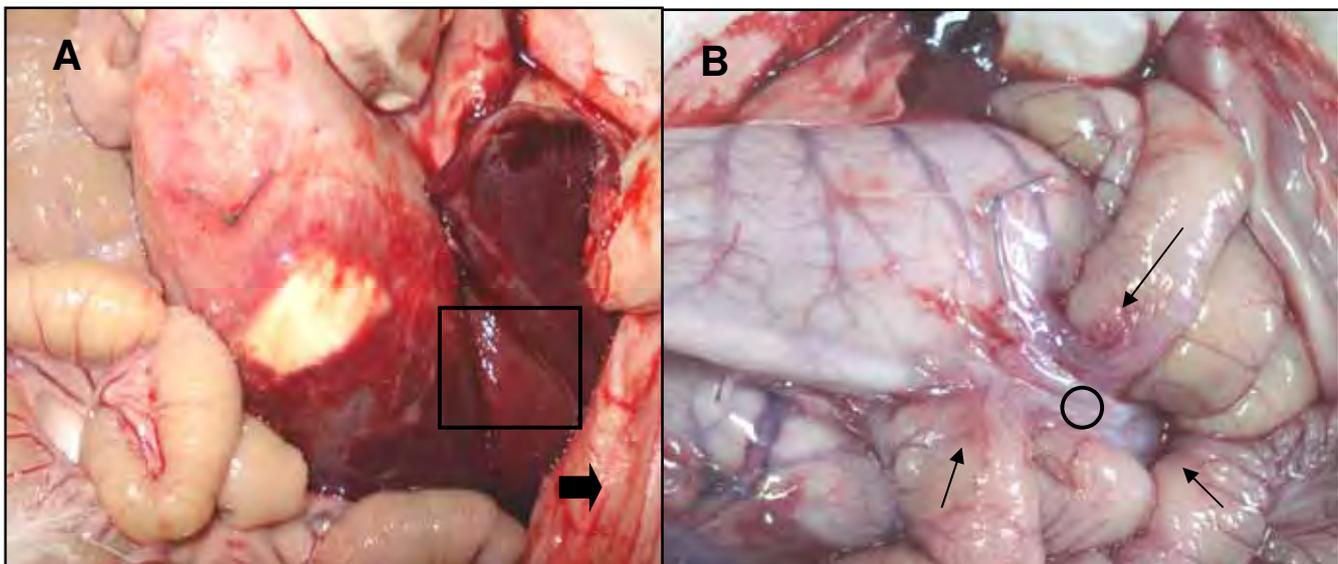


Figura 5: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana fundo. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o fígado (quadrado) e aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta cheia). Em B notam-se aderências da área do implante com o omento (círculo), aderências da área do implante com alças intestinais (seta fina).

Nos animais, sacrificados aos **trinta dias** de pós-operatório, observou-se a ocorrência de aderências com as seguintes estruturas: omento (em 50% dos casos - 1 animal), peritônio parietal da parede ventral do abdômen (em 50% dos casos - 1 animal), fígado (em 50% dos casos - 1 animal), alças intestinais (em 50% dos casos - 1 animal) e baço (em 50% dos casos - 1 animal). Observou-se a não ocorrência de aderências (em 50% dos casos - 1 animal). (Figura 6A, B).

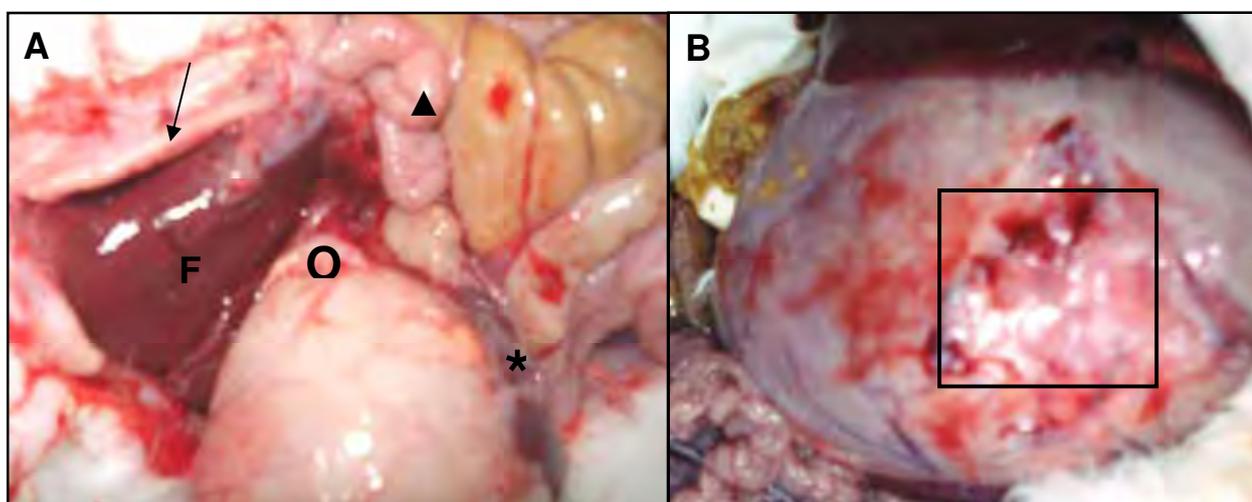


Figura 6: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana fundo. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o fígado (F), aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta), com o baço (*) alças intestinais (▲) e omento (O). Em B nota-se a ausência de aderências da área do implante (quadrado).

Nos animais, sacrificados aos **sessenta dias** de pós-operatório, observou-se a ocorrência de aderências no peritônio parietal da parede ventral do abdômen (em 100% dos casos - 2 animais) (Figura 7).

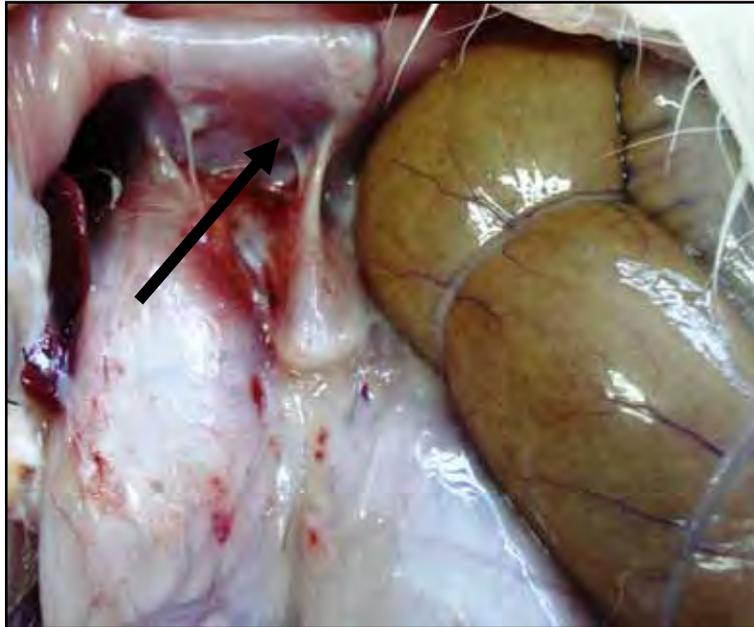


Figura 7: Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana fundo. Observa-se a ocorrência de aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta)

As aderências que ocorreram aos quinze dias pós-operatório pertencentes ao grupo biomembrana fundo puderam ser desfeitas manualmente, porém com resistência e, em alguns animais, somente por divulsão com auxílio de tesoura íris, principalmente as que aderiram em fígado. Já as aderências encontradas aos 30 e 60 dias de pós-operatório puderam ser facilmente desfeitas manualmente.

5.2.2 Grupo Biomembrana Corpo (GBC)

Macroscopicamente, verificou-se nos animais sacrificados aos **quinze dias** de pós-operatório, a ocorrência de aderências da área do implante com as seguintes estruturas: omento (em 50% dos casos - 1 animal), peritônio parietal da parede ventral do abdômen (em 100% dos casos - 2 animais), alças intestinais (50% dos casos – 1 animal), fígado (50% dos casos – 1 animal) e baço (50% dos casos – 1 animal) (Figura 8A, B).

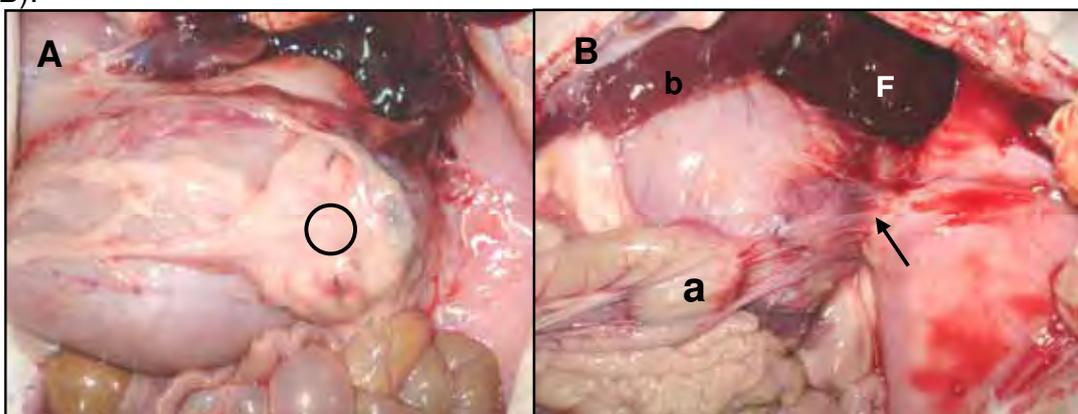


Figura 8: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana corpo. Observa-se em A ocorrência de aderências da área do implante com o omento (círculo). Em B nota-se aderências da área do implante com o peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta), alças intestinais (a), fígado (F) e baço (b).

Nos animais, sacrificados aos **trinta dias** de pós-operatório, observou-se a ocorrência de aderências no omento (100% dos casos – 2 animais) e em alças intestinais (100% dos casos – 2 animais) (Figura 9).

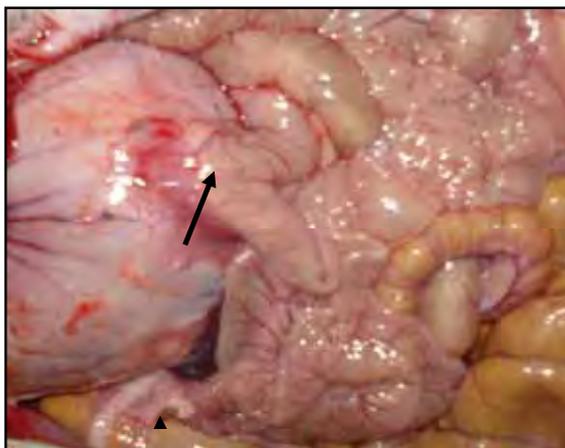


Figura 9: Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana corpo. Observa-se a ocorrência de aderência da área do implante com o omento (▲), o qual foi retirado para a visualização da aderência em alças intestinais (seta).

Nos animais sacrificados aos **sessenta dias** de pós-operatório, observou-se a ocorrência de aderências no omento (100% dos casos – 2 animais). (Figura 10).



Figura 10: Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório pertencente ao grupo biomembrana corpo. Observa-se a ocorrência de aderência da área do implante com o omento (quadrado).

As aderências que ocorreram aos quinze dias pós-operatório no grupo biomembrana corpo puderam ser desfeitas manualmente, porém com resistência e, em alguns animais, somente por divulsão com auxílio de tesoura íris, principalmente as que aderiram em fígado e baço. Já as aderências encontradas aos 30 dias de pós-operatório puderam ser facilmente desfeitas manualmente.

5.2.3 Grupo Controle Fundo (GCF)

Macroscopicamente, verificou-se nos animais sacrificados aos **quinze dias** de pós-operatório, a ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com as seguintes estruturas: omento (em 50% dos casos - 1 animal), peritônio parietal da parede ventral do abdômen (em 50% dos casos - 1 animal) (Figura 11 A, B).

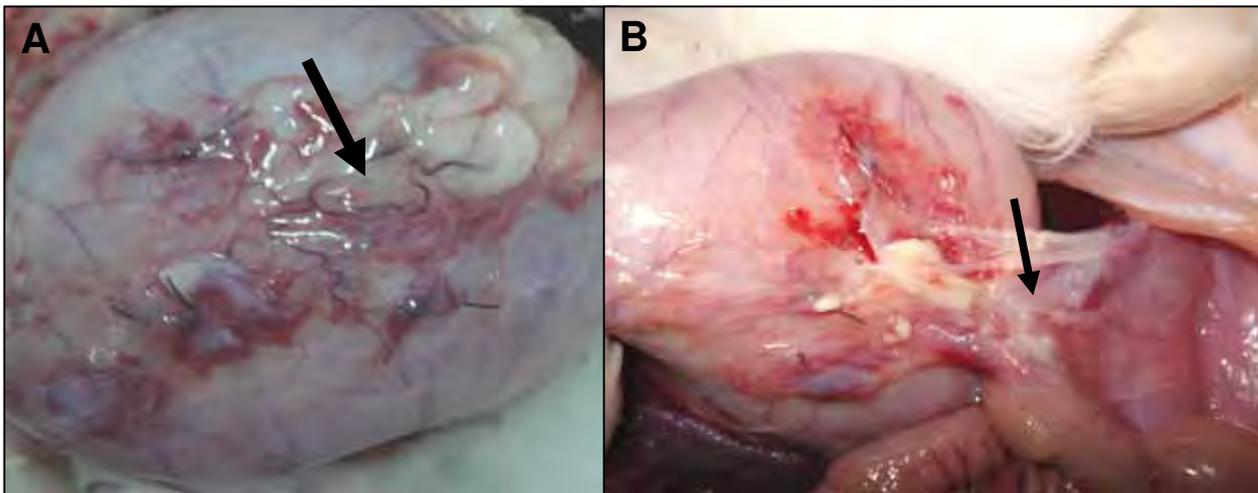


Figura 11: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório pertencente ao grupo controle fundo. Observa-se em A ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com o omento (seta grossa) e em B aderências da área de gastrorrafia com peritônio parietal da parede ventral do abdômen (seta fina).

Tanto aos **trinta** quanto aos **sessenta dias** de pós-operatório, observou-se macroscopicamente, a ausência de aderências (em 100% dos casos - 2 animais). (Figura 12A, B).

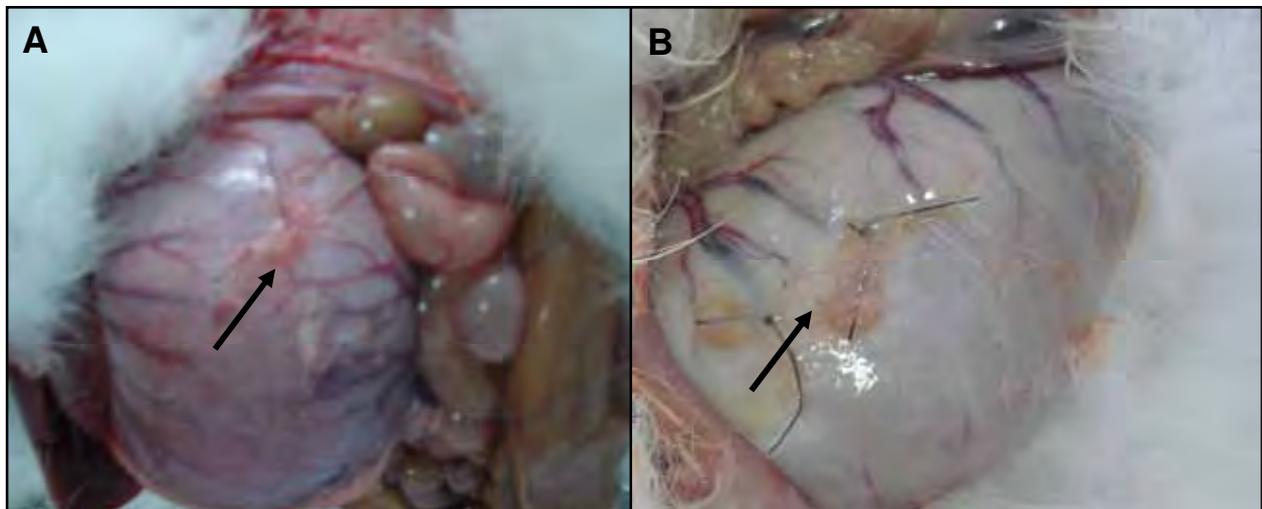


Figura 12: Fotografias de um coelho macho, adulto, pertencente ao grupo controle fundo. Em A aos 30 dias de pós-operatório e em B aos 60 dias de pós-operatório. Observa-se em ambos a ausência de aderências na região de gastrorrafia (seta).

As aderências que ocorreram aos quinze dias pós-operatório pertencentes ao grupo controle fundo puderam ser desfeitas manualmente, porém com resistência e, em alguns animais, somente por divulsão com auxílio de tesoura íris.

5.2.4 Grupo Controle Corpo (GCC)

Macroscopicamente, verificou-se nos animais sacrificados aos **quinze dias** de pós-operatório, a ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com a seguinte estrutura: omento (em 100% dos casos – 2 animais) (Figura 13 A, B).

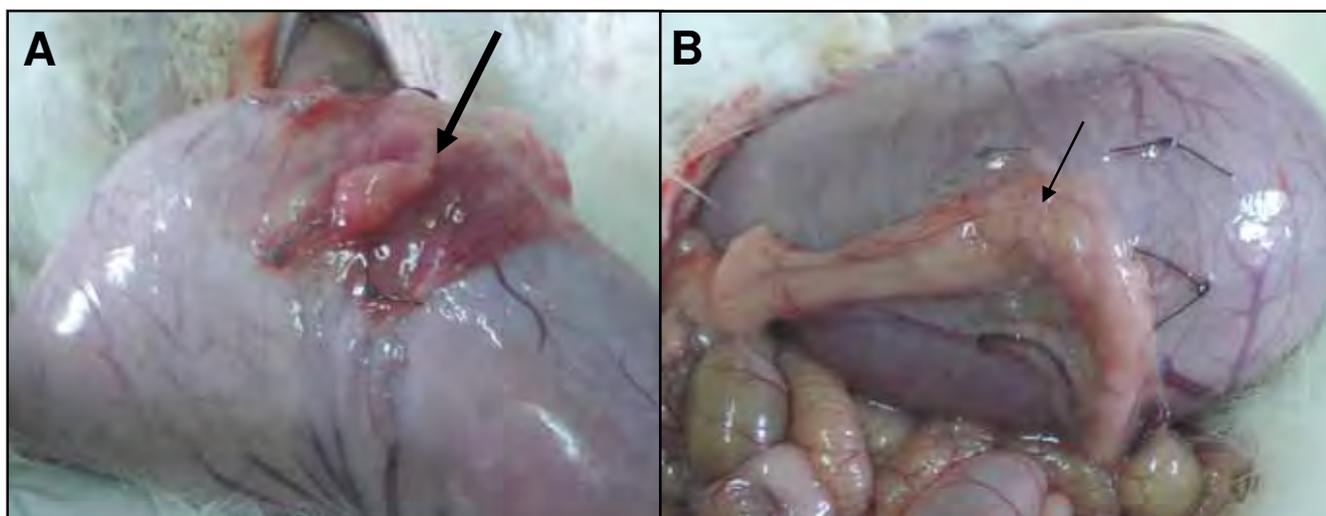


Figura 13: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório pertencente ao grupo controle corpo. Observa-se em A e B a ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com o omento (seta grossa e seta fina).

Nos animais, sacrificados aos **trinta dias** de pós-operatório, macroscopicamente nota-se a ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com as seguintes estruturas: omento (em 50% dos casos - 1 animal) e baço (em 50% dos casos - 1 animal). Neste mesmo período avaliado observou-se a não ocorrência de aderências (50% dos casos – 1 animal). (Figura 14A, B).

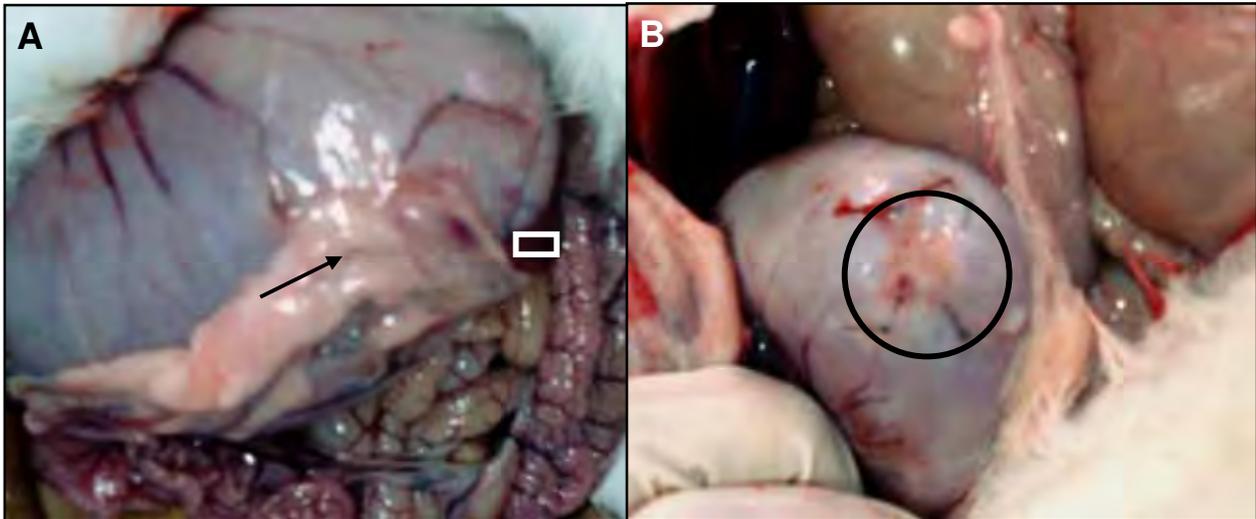


Figura 14: Fotografias de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório pertencente ao grupo controle corpo. Observa-se em A a ocorrência de aderências da área de gastrorrafia com o omento (seta) e com o baço (quadrado). Em B nota-se a ausência de aderências (círculo).

Aos **sessenta dias** de pós-operatório, verificou-se nos animais sacrificados a não ocorrência de aderências (100% dos casos – 2 animais). (Figura 15).



Figura 15: Fotografia de um coelho macho, adulto, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório pertencente ao grupo controle corpo. Observa-se a não ocorrência de aderências na área de gastrorrafia (quadrado).

As aderências que ocorreram aos quinze dias pós-operatório pertencentes ao grupo controle corpo puderam ser desfeitas manualmente, porém com resistência e, em

alguns animais, somente por divulsão com auxílio de tesoura íris. Já as aderências encontradas aos 30 dias de pós-operatório puderam ser facilmente desfeitas manualmente.

5.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

5.3.1 GRUPO CONTROLE APÓS 15 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região de gastrorrafia dos animais pertencentes ao grupo controle e sacrificados aos 15 dias de pós-operatório, observou-se mucosa neoformada, desorganizada e com presença de infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (Figuras 16 A e B).

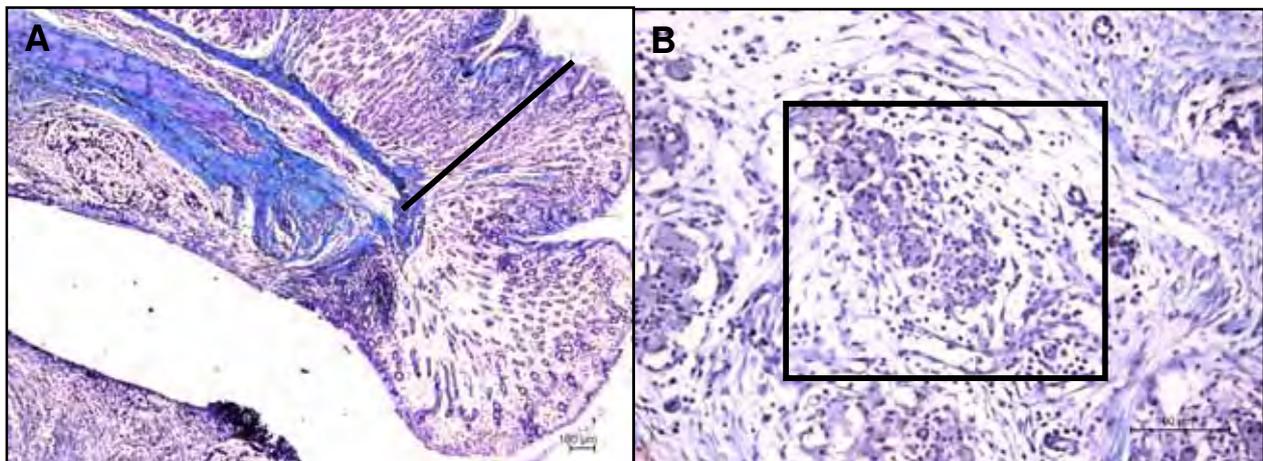


Figura 16. Fotomicrografias da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa neoformada (traço), desorganizada. Em B infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (quadrado) (Paraplast, TM, 4X e 20 X respectivamente).

Na região de gastrorrafia destes animais, observou-se mucosa hiperplásica e neoformada, com moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso em submucosa (Figuras 17 A e B).

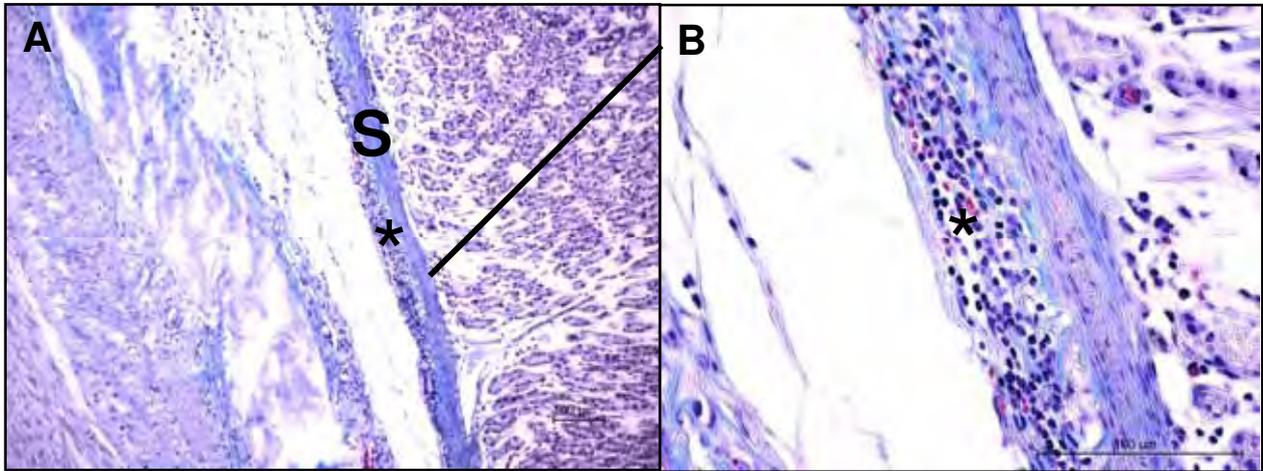


Figura 17. Fotomicrografias da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa hiperplásica e neoformada (traço), com moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso (*) em submucosa (S). Em B nota-se o infiltrado inflamatório mononuclear difuso em maior aumento (*) (Paraplast, TM, 4X e 20 X respectivamente).

Camada muscular apresentando núcleos redondos e aumentados, sugerindo proliferação (Figura 18).

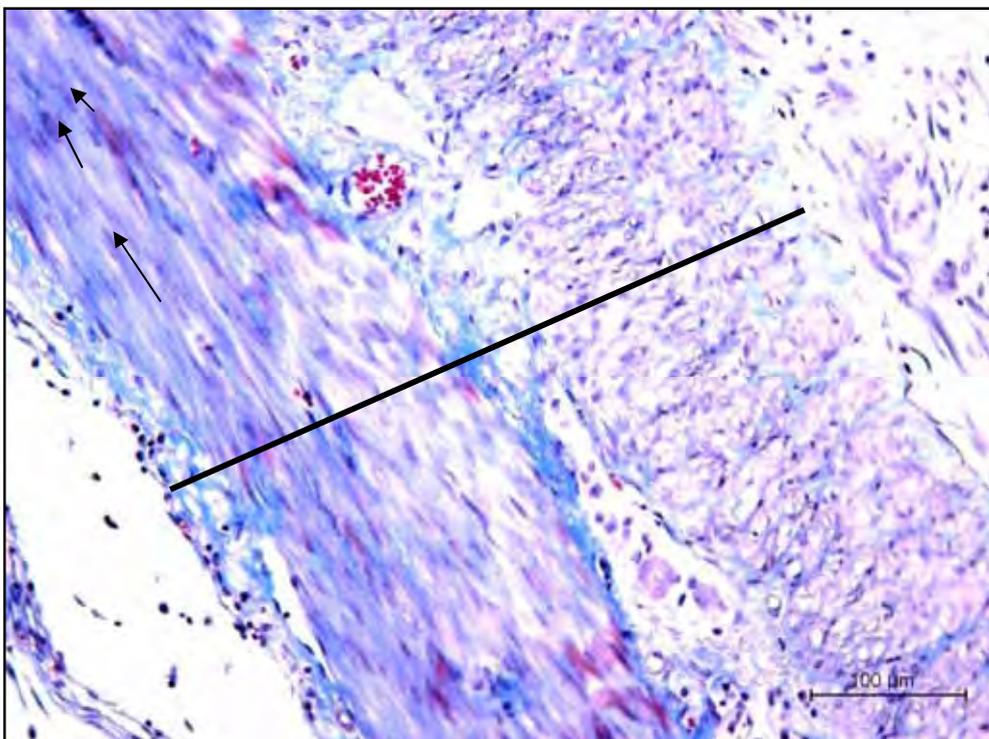


Figura 18. Fotomicrografia da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam camada muscular (traço) apresentando núcleos redondos e aumentados (setas), sugerindo proliferação. (Paraplast, TM, 10X).

Aos quinze dias de pós-operatório do grupo controle, notou-se, na região de gastrorrafia descontinuidade da camada muscular, com bordos unidos por tecido de granulação epitelizado e mucosa neoformada e hiperplásica. Na camada muscular as fibras estão desorganizadas no foco da lesão, acompanhada de fios de sutura e foco de necrose (Figura 19).

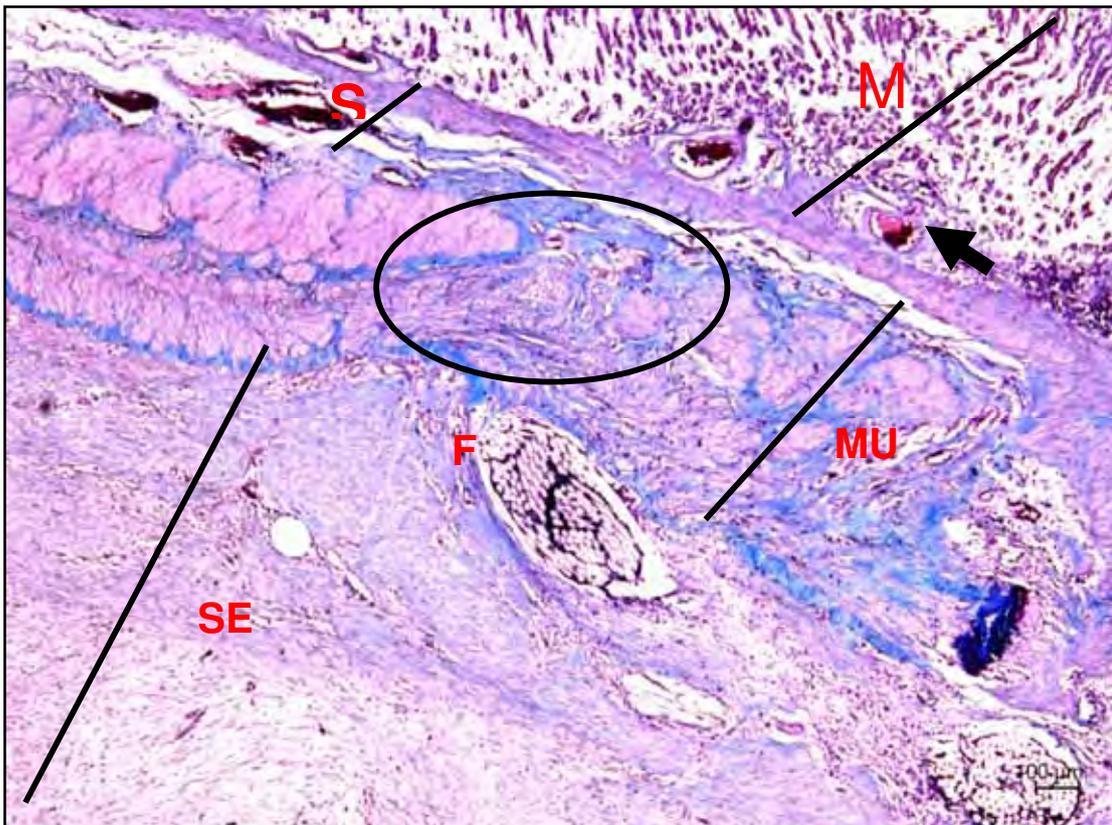


Figura 19. Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam descontinuidade (círculo) da camada muscular (MU), mucosa neoformada e hiperplásica (M). Na camada muscular as fibras estão desorganizadas no foco da lesão, acompanhada de fios de sutura (F) e foco de necrose (seta). Serosa (SE), Submucosa(S). Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, TM, 10X).

Na região da aderência a serosa mostrou-se hiperplásica com presença de tecido adiposo e acentuada formação de tecido de granulação com necrose, fios de sutura e acompanhada de infiltrado inflamatório misto multifocal (Figuras 20 e 21).

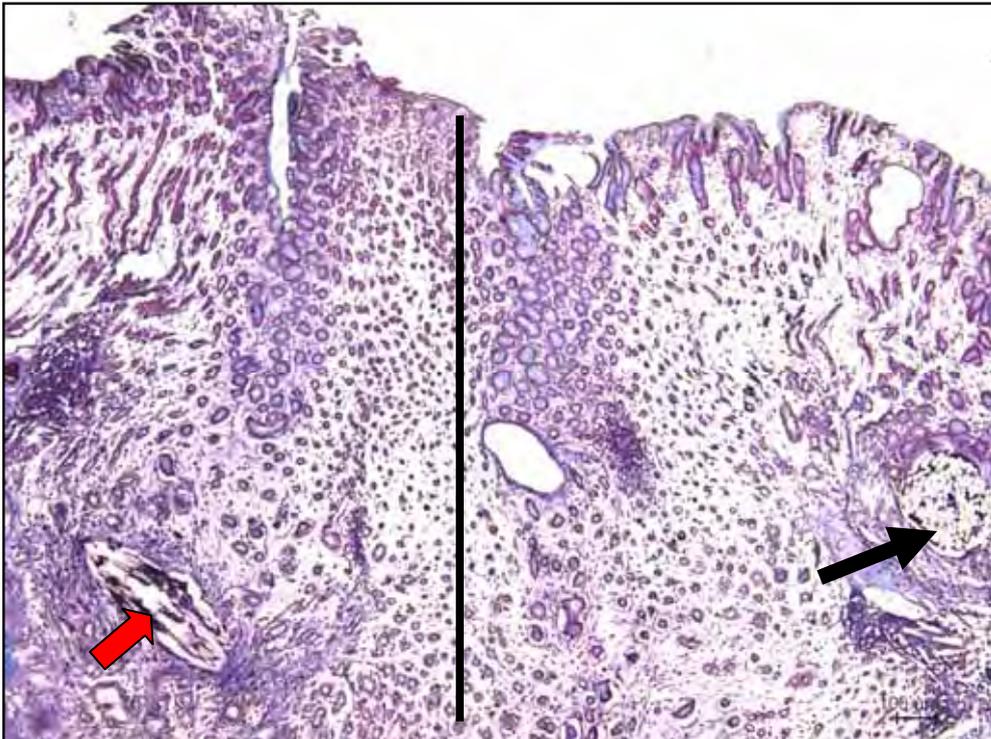


Figura 20. Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam a serosa hiperplásica com acentuada formação de tecido de granulação (traço), necrose (seta vermelha) e fios de sutura (seta preta) (Paraplast, TM, 10X).

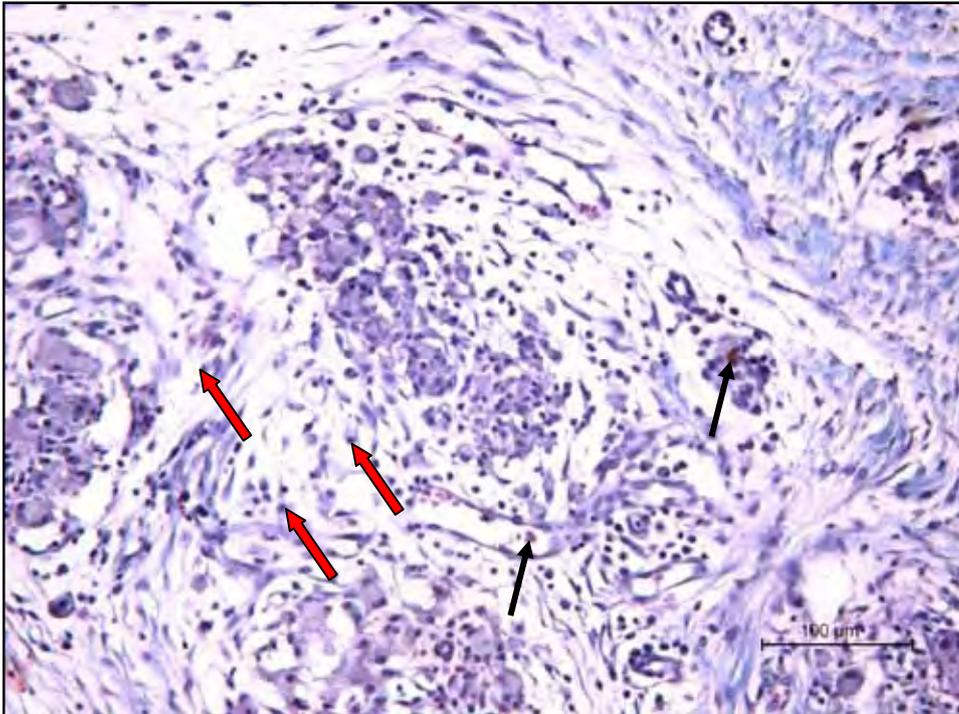


Figura 21. Fotomicrografia da região de gastrorrafia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam presença de infiltrado inflamatório misto multifocal na região da serosa, composta por linfócitos (setas vermelhas) e pseudoeosinófilos (setas pretas) (Paraplast, TM, 20X).

5.3.2 GRUPO BIOMEMBRANA APÓS 15 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região do implante biomembrana/tecido nativo dos animais pertencentes ao grupo biomembrana e sacrificados aos 15 dias de pós-operatório, observou-se descontinuidade das camadas muscular e mucosa, unidas por tecido de granulação na região da serosa, com presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, principalmente em sua região de ancoragem. Verificaram-se também vasos sanguíneos e fibras musculares neoformadas (Figuras 22 e 23).

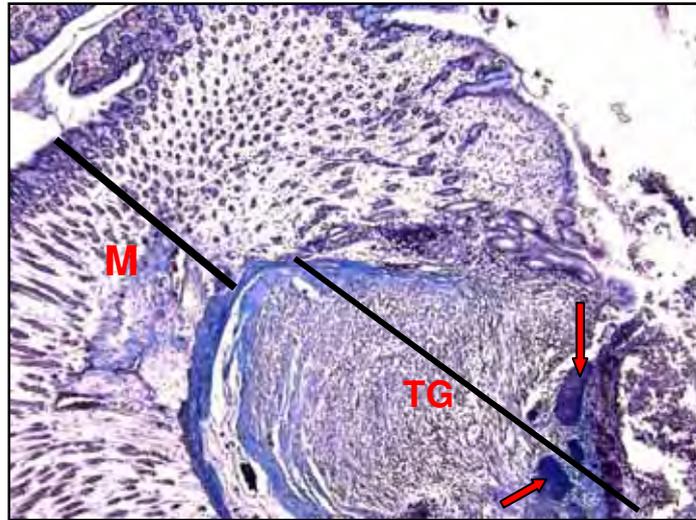


Figura 22. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam descontinuidade das camadas mucosa (M) e muscular representada por fibras musculares (setas vermelhas), unidas por tecido de granulação na região da serosa (TG). Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, TM, 4X).

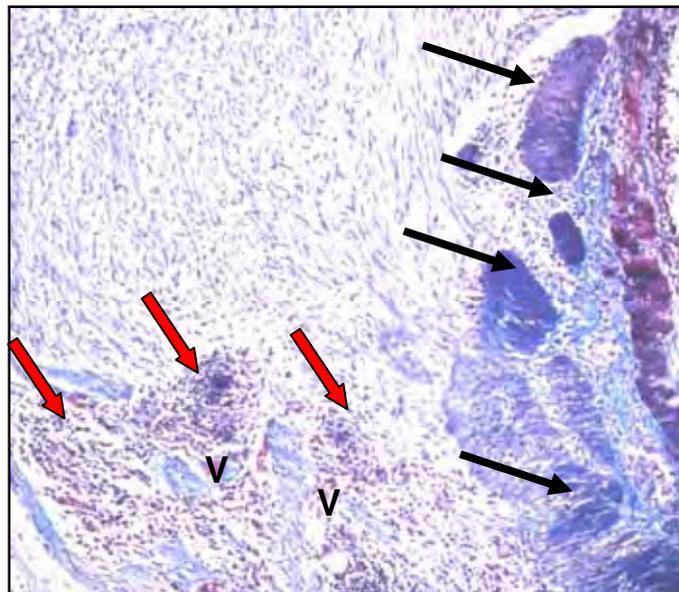


Figura 23. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (setas vermelhas), vasos sanguíneos (V) e fibras musculares neoformadas (setas pretas) (Paraplast, TM, 10X).

Mucosa neoformada com presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso em submucosa (Figura 24).

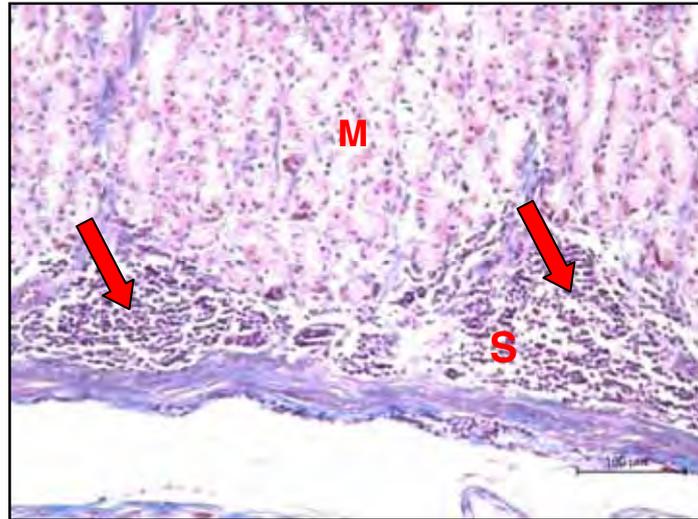


Figura 24. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório, em que se notam mucosa neoformada (M) com presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso (setas vermelhas) em submucosa (S) (Paraplast, HE, 4X).

5.3.3 GRUPO CONTROLE APÓS 30 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região de gastrorrafia dos animais pertencentes ao grupo controle e sacrificados aos 30 dias de pós-operatório, a mucosa mostrou-se neoformada, desorganizada e juntamente com a camada muscular apresentou-se descontínua e unidas por tecido de granulação. Notaram-se também a presença de fios de sutura, células adiposas e proliferação de células musculares por entre este tecido, em região próxima à submucosa (Figura 25).

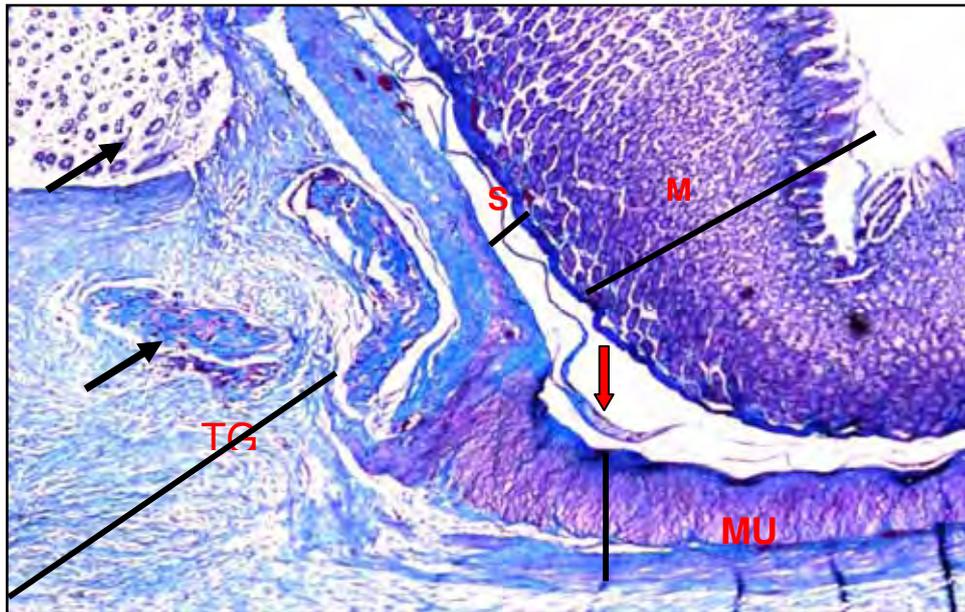


Figura 25. Fotomicrografia da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório, em que nota-se a mucosa (M) neoformada, desorganizada, camada muscular (MU) descontínua e ambas unidas por tecido de granulação (TG). Notou-se também a presença de fios de sutura (seta preta). Presença de fibras musculares (seta vermelha) próxima á submucosa (S). Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, TM, 10X).

Aos 30 dias de pós-operatório dos animais do grupo controle, na região de aderência, a serosa apresentou-se hiperplásica, com formação de tecido de granulação, células adiposas e presença de infiltrado inflamatório misto (Figuras 26 A e B).

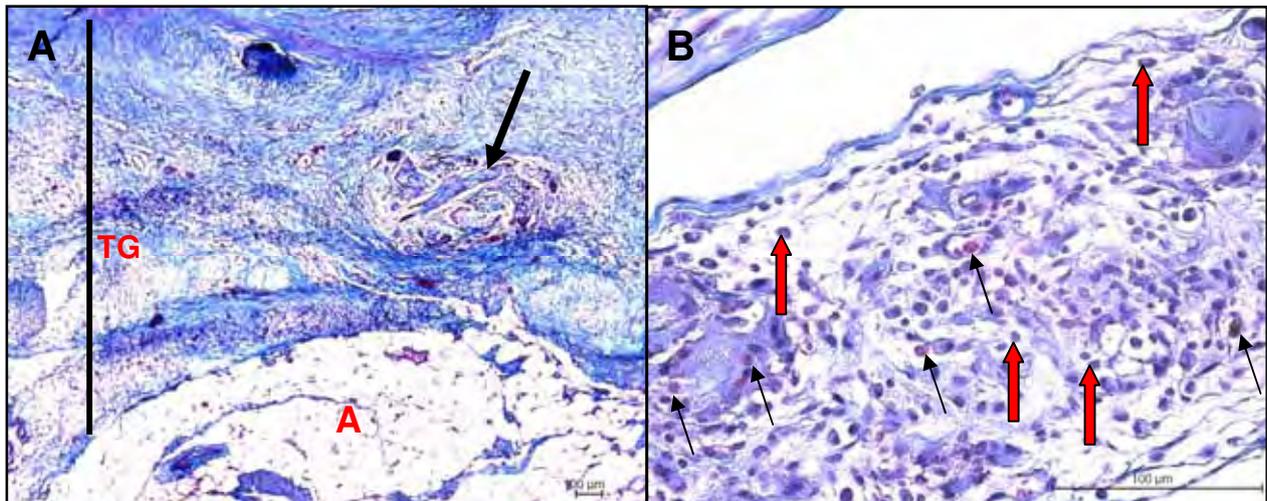


Figura 26. Fotomicrografias da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório onde em A notou-se formação de tecido de granulação (traço e TG) na serosa, células adiposas (A) e fio de sutura (seta preta). Na figura B observou-se presença de infiltrado inflamatório misto representado por linfócitos (setas vermelhas) e pseudoeosinófilos (setas pretas). O traço está delimitando o tecido de granulação (Paraplast, TM, 10X e 20 X respectivamente).

5.3.4 GRUPO BIOMEMBRANA APÓS 30 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região do implante biomembrana/tecido nativo dos animais pertencentes ao grupo biomembrana e sacrificados aos 30 dias de pós-operatório a mucosa apresentou-se neoformada, desorganizada e com presença de infiltrado inflamatório mononuclear multifocal (Figuras 27 A e B).

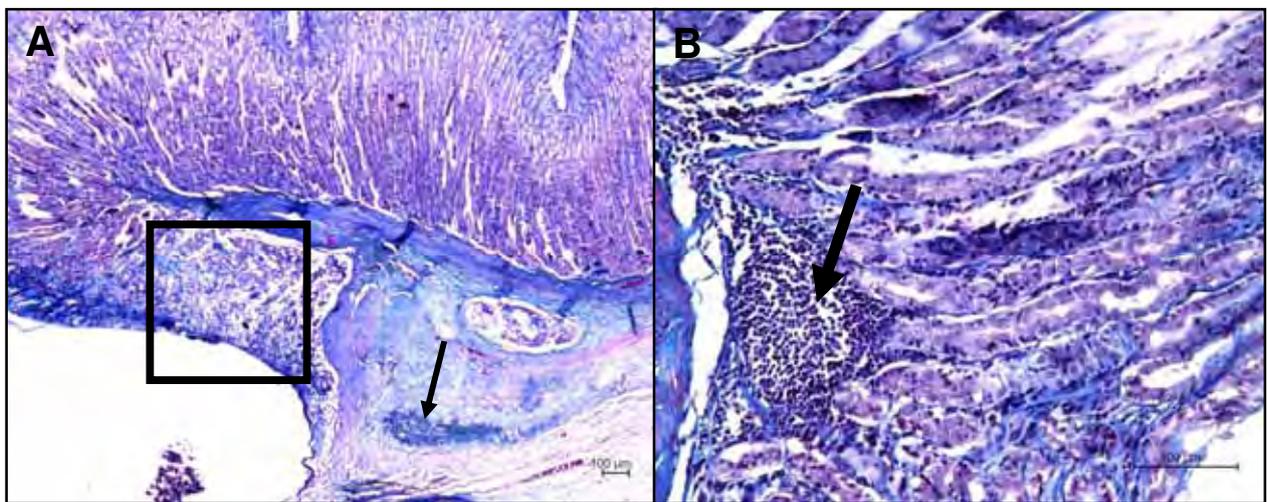


Figura 27. Fotomicrografias da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam em A mucosa neoformada (quadrado) e em A e B presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso (setas) (Paraplast, HE, 4X e 10 X respectivamente).

Aos 30 dias de pós-operatório, na região do implante biomembrana/tecido nativo dos animais pertencentes ao grupo biomembrana, as camadas muscular e mucosa apresentaram-se descontínuas e unidas por tecido de granulação. No centro da lesão, há presença de fios de sutura, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear difuso e necrose. Discretos feixes musculares entremeados a esse tecido são observados (Figuras 28 e 29).

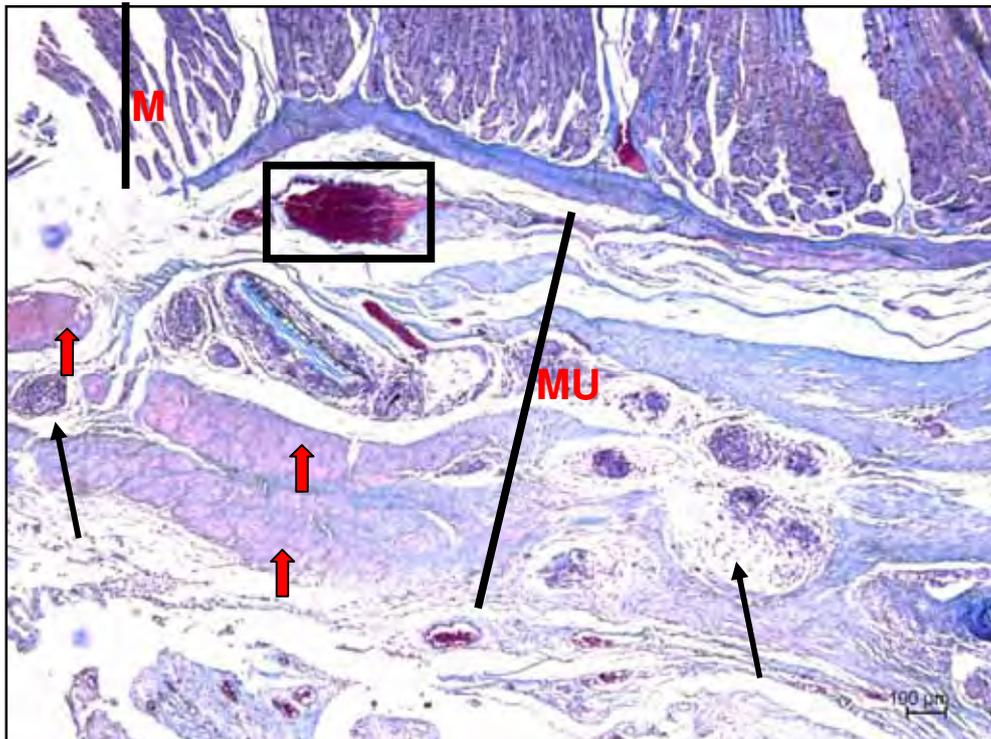


Figura 28. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam camadas muscular (MU) e mucosa (M) neoformadas e descontínuas. A presença de fios de sutura (setas pretas), necrose (quadrado) e feixes musculares entremeados a esse tecido (setas vermelhas). Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, HE, 4X).

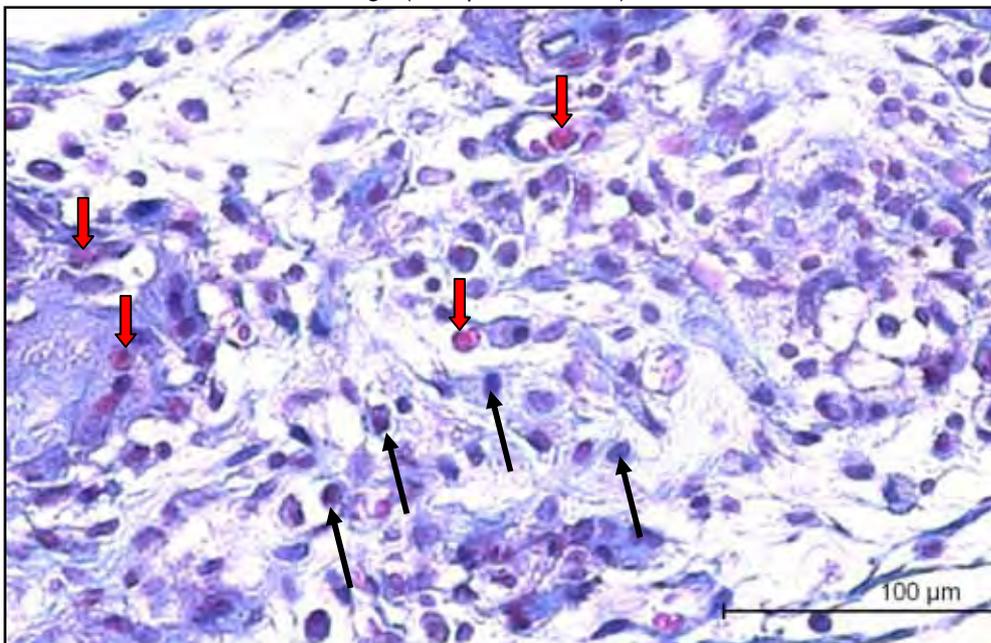


Figura 29. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório, em que se notam infiltrado inflamatório polimorfonuclear representado por pseudoeosinófilos (setas vermelhas) e mononuclear representado por linfócitos (setas pretas) (Paraplast, TM, 40X).

Nos animais pertencentes ao grupo biomembrana a serosa mostrou-se hiperplásica com formação de tecido de granulação com acentuado infiltrado inflamatório difuso, alternando áreas com predomínio de células polimorfonucleares e áreas focais de células inflamatórias mononucleares (Figuras 30 A e B).

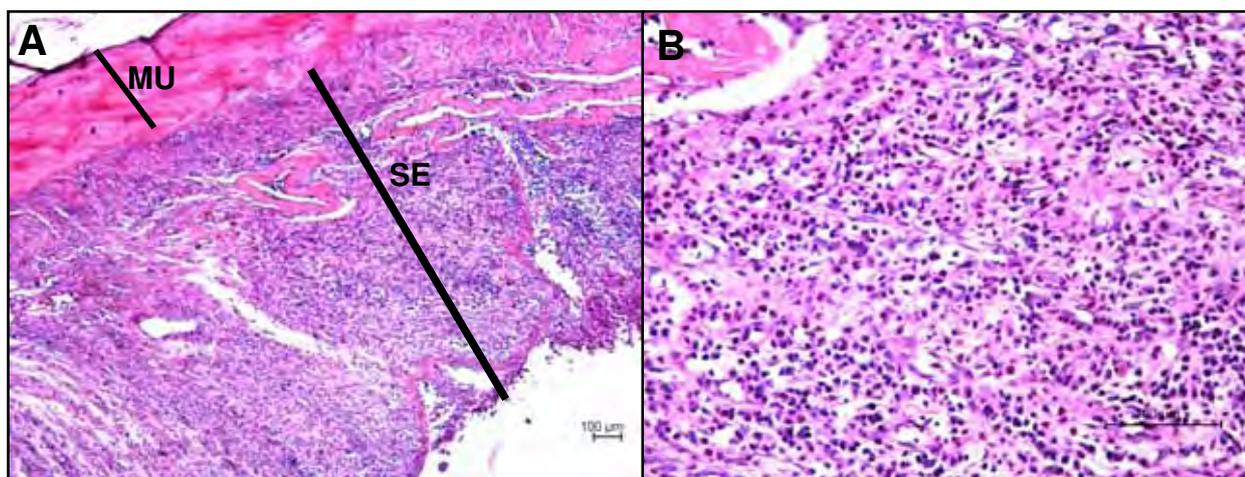


Figura 30. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório, em A observou-se serosa (SE) hiperplásica com formação de tecido de granulação com acentuado infiltrado inflamatório difuso. Em B notou-se infiltrado inflamatório difuso. Camada muscular (MU). Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, HE, 4X e 20X respectivamente).

5.3.5 GRUPO CONTROLE APÓS 60 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região de gastrorrafia dos animais pertencentes ao grupo controle e sacrificados aos 60 dias de pós-operatório a mucosa mostrou-se totalmente formada e hipoglandular. Observou-se tecido fibroso com presença de fios de sutura entre mucosa e serosa. A camada muscular neoformada apresentou-se completamente formada e desorganizada com proliferação de miócitos, acompanhado de infiltrado inflamatório mononuclear focal (Figuras 31, 32 A e B).

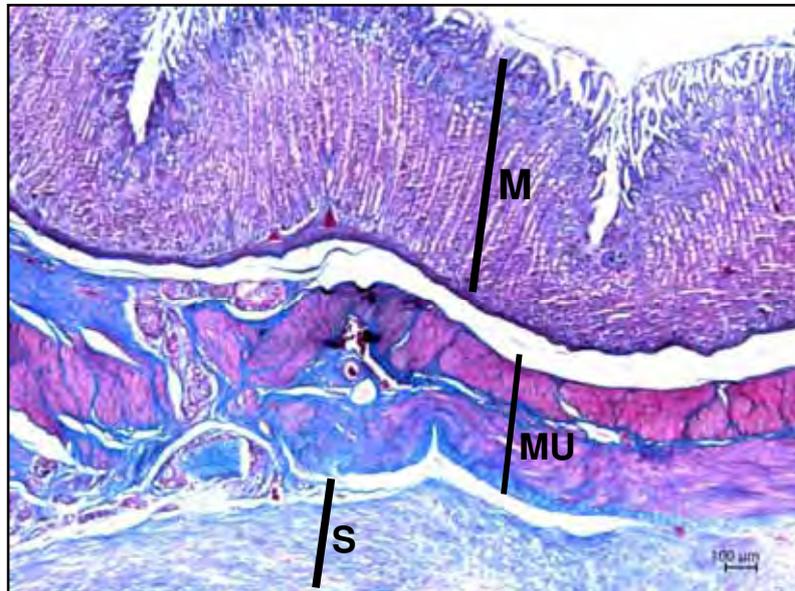


Figura 31. Fotomicrografia da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório onde a mucosa (M) mostrou-se formada e hipoglandular. Observou-se tecido fibroso na região da serosa (S). A camada muscular (MU) mostrou-se neoformada e desorganizada. Os traços estão delimitando cada camada do estômago (Paraplast, TM, 4X).

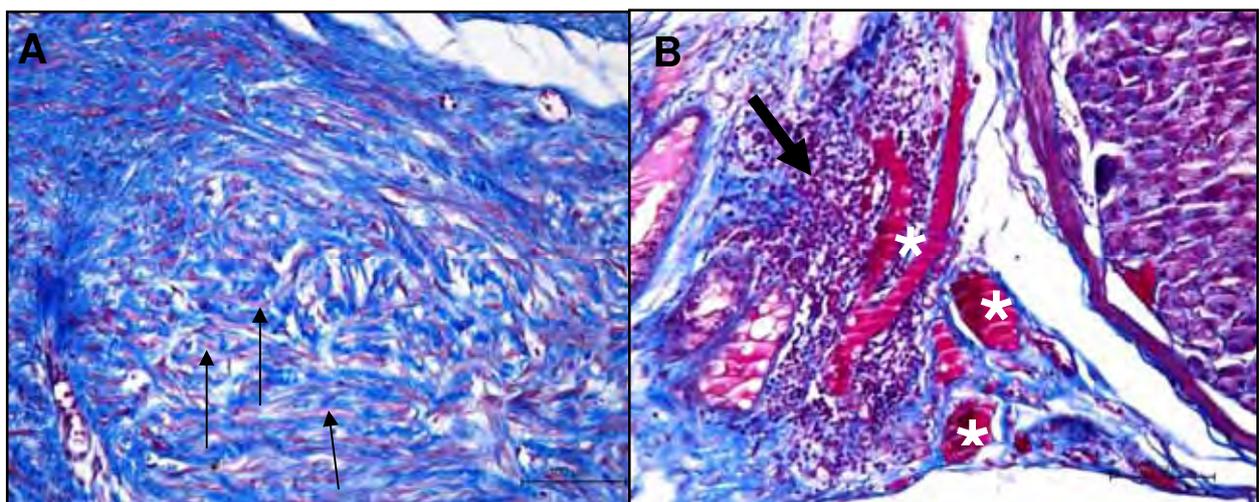


Figura 32. Fotomicrografias da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório onde se observou em A proliferação de miócitos (setas) e em B infiltrado inflamatório mononuclear focal (seta) entremeados às fibras musculares (*) (Paraplast, TM, 20X e 10X respectivamente).

Aos 60 dias de pós-operatório dos animais do grupo controle na região de aderência, a serosa mostrou-se hiperplásica com formação de tecido de granulação, presença de fio de sutura e acompanhadas de infiltrado inflamatório mononuclear (Figuras 33 e 34).

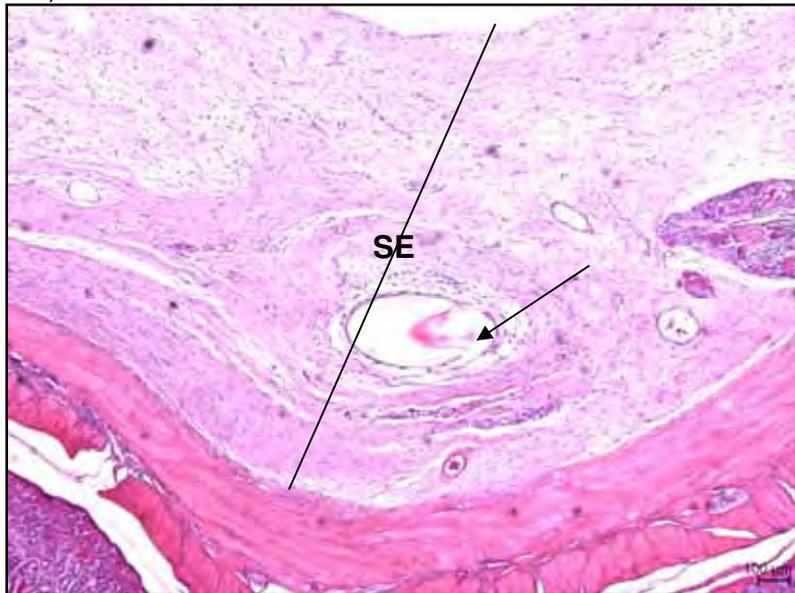


Figura 33. Fotomicrografia da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório onde se observou serosa hiperplásica (SE) com tecido de granulação, e presença de fio de sutura (seta). O traço delimita a camada do estômago (Paraplast, HE, 4X).

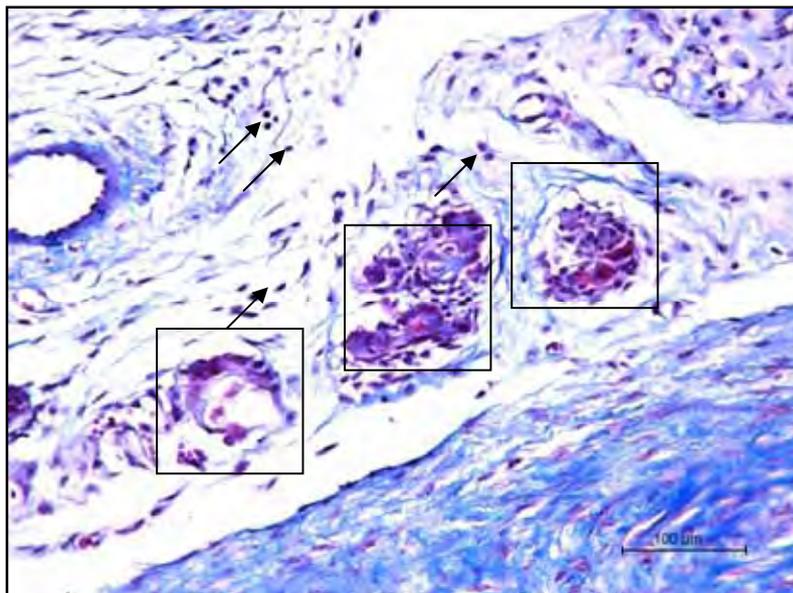


Figura 34. Fotomicrografia da região de gastrorráfia de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório onde se observou infiltrado inflamatório mononuclear representado por linfócitos (setas) e células gigantes (quadrado) (Paraplast, TM, 20X).

5.3.6 GRUPO BIOMEMBRANA APÓS 60 DIAS DE PÓS-OPERATÓRIO

Na região do implante biomembrana/tecido nativo dos animais pertencentes ao grupo biomembrana e sacrificados aos 60 dias de pós-operatório, as camadas mucosa, muscular externa e interna apresentaram-se completamente formadas. Infiltrado inflamatório mononuclear difuso em submucosa (Figuras 35 e 36).

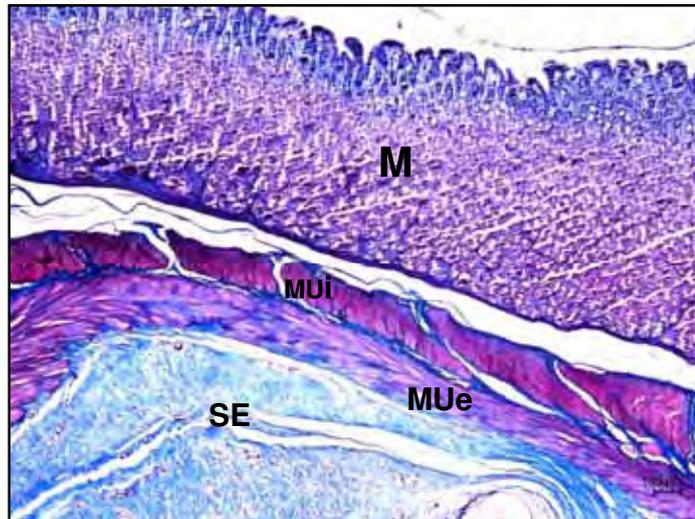


Figura 35. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório, onde se observou que as camadas; mucosa (M), muscular interna (MUi) e externa (MUE) apresentaram-se completamente formadas. Camada serosa (SE) (Paraplast, TM, 10X).

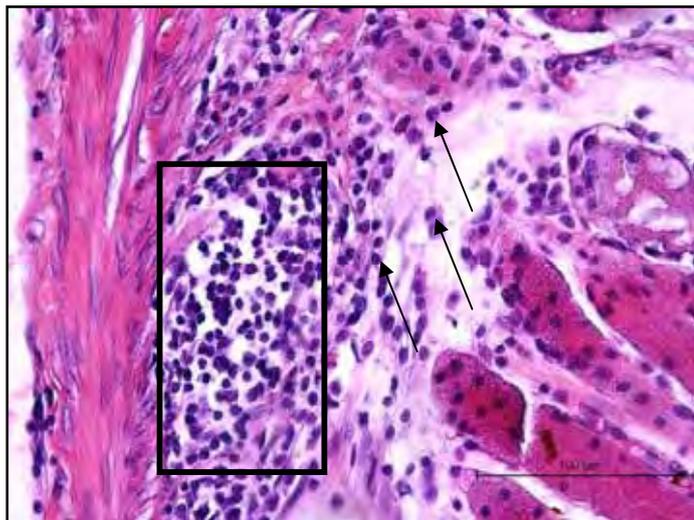


Figura 36. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório, onde se observou infiltrado inflamatório mononuclear difuso em submucosa (retângulo), representado por linfócitos (setas) (Paraplast, HE, 10X).

Serosa hiperplásica com formação de tecido de granulação, presença de fio de sutura e acompanhadas de infiltrado inflamatório mononuclear (Figuras 37 A e B).

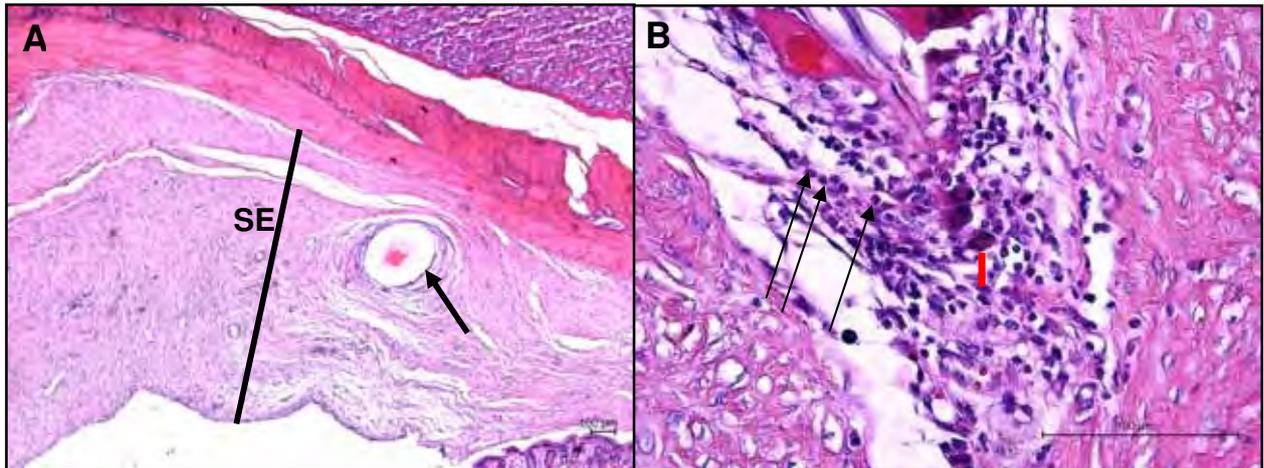


Figura 37. Fotomicrografia da região de implante biomembrana/tecido nativo de um coelho, macho, adulto, da raça Nova Zelândia Branco, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório, onde se observou em A serosa (SE) hiperplásica, presença de fio de sutura (seta) e em B presença de infiltrado inflamatório mononuclear (I), representado por linfócitos (setas). O traço delimita a camada do estômago (Paraplast, HE, 10X).

5.4. AVALIAÇÃO ESTEREOLÓGICA E ESTATÍSTICA

Os valores obtidos mediante cálculo $N_v = \sum Q^{-} / \sum V$, referentes à densidade numérica (N_v) dos diferentes tipos celulares e vasos sanguíneos, presentes nos dias quinze, 30 e 60 de pós-operatório estão registrados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1: Registros referentes à densidade numérica (N_v) do grupo Controle Corpo (CC) e grupo Controle Fundo (CF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	N_v 1/mm ³					
	MN/CC	MN/CF	PMN/CC	PMN/CF	VS/CC	VS/CF
15	44,563	70,559	122,549	137,403	25,995	33,422
30	2473,262	1749,109	813,280	293,375	129,976	126,263
60	1158,645	887,552	100,267	167,112	44,563	33,422

TABELA 2: Registros referentes à densidade numérica (N_v) do grupo Biomembrana Corpo (BC) e grupo Biomembrana Fundo (BF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	N_v 1/mm ³					
	MN/BC	MN/BF	PMN/BC	PMN/BF	VS/BC	VS/BF
15	152,258	100,267	285,948	185,680	44,563	22,282
30	1244,058	2075,906	85,413	367,647	241,384	267,380
60	2558,675	1919,935	77,986	40,850	215,389	51,990

Os valores obtidos mediante cálculo: $V_v \text{ (p.c.)} = \frac{P \text{ (p.c.)}}{P_t}$, referentes à densidade

de volume (V_v) dos diferentes tipos celulares e vasos sanguíneos, presentes nos dias quinze, 30 e 60 de pós-operatório estão registrados nas tabelas 3 e 4.

TABELA 3: Registros referentes à densidade de volume (V_v) grupo Controle Corpo (CC) e do grupo Controle Fundo (CF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/CC	MN/CF	PMN/CC	PMN/CF	VS/CC	VS/CF
15	0,076	0,120	0,208	0,233	0,044	0,057
30	0,850	0,460	0,283	0,101	0,101	0,063
60	0,302	0,277	0,019	0,063	0,025	0,050

TABELA 4: Registros referentes à densidade de volume (V_v) do grupo Biomembrana Corpo (BC) e grupo Biomembrana Fundo (BF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/BC	MN/BF	PMN/BC	PMN/BF	VS/BC	VS/BF
15	0,258	0,170	0,485	0,315	0,076	0,038
30	0,290	0,554	0,057	0,139	0,145	0,069
60	0,340	0,321	0,013	0,170	0,088	0,063

Os valores obtidos mediante cálculo: $V \text{ (p.c.)} = \frac{V_v \text{ (p.c.)}}{N_v \text{ (p.c.)}}$, referentes ao volume

celular médio (Vol.) dos diferentes tipos celulares e vasos sanguíneos, presentes nos dias quinze, 30 e 60 de pós-operatório estão registrados nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5: Registros referentes ao volume médio celular (V.m.c) do grupo Controle Corpo (CC) e grupo Controle Fundo (CF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/CC	MN/CF	PMN/CC	PMN/CF	VS/CC	VS/CF
15	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
30	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
60	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,002

TABELA 6: Registros referentes ao volume médio celular (V.m.c) do Grupo Biomembrana Corpo (BC) e Grupo Biomembrana Fundo (BF): mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/BC	MN/BF	PMN/BC	PMN/BF	VS/BC	VS/BF
15	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
30	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000
60	0,000	0,000	0,000	0,004	0,000	0,001

Os valores obtidos mediante o cálculo $N = Nv \times Vol$, referentes ao número total de partículas (N) dos diferentes tipos celulares e vasos sanguíneos presentes nos dias quinze, 30 e 60 de pós-operatório estão registrados nas tabelas 7 e 8.

TABELA 7: Registros referentes ao número total das partículas (N) do grupo Controle Corpo (CC) e grupo Controle Fundo (CF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/CC	MN/CF	PMN/CC	PMN/CF	VS/CC	VS/CF
15	238,414	377,488	655,637	735,108	139,075	178,810
30	12712,567	8990,419	4180,258	1507,947	668,078	648,990
60	6836,007	5236,557	591,578	985,963	262,923	197,193

TABELA 8: Registros referentes ao número total das partículas (N) do grupo Biomembrana Corpo (BC) e grupo Biomembrana Fundo (BF) dos: mononucleares (MN), polimorfonucleares (PMN) e vasos sanguíneos (VS), observados nos dias: 15, 30 e 60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2009.

Dias	Nv 1/mm ³					
	MN/BC	MN/BF	PMN/BC	PMN/BF	VS/BC	VS/BF
15	814,580	536,430	1529,820	993,390	238,414	119,207
30	6394,459	10670,157	439,023	1889,706	1240,716	1374,332
60	15096,182	11327,614	460,116	241,013	1270,716	306,744

Tabela 9. Análise de variância das variáveis: densidade numérica (Nv) dos mononucleares, densidade de volume (Vv), volume médio celular (V.m.c) e número total das partículas (N), dos perfis: vaso sanguíneos, mononucleares e polimorfonucleares avaliados em 2 grupos (biomembrana e controle) , na região do fundo e corpo e nos tempos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Os dados foram analisados na escala logarítmica de log (obs +1).

* Valor de p do teste F													
Fonte de Variância	G.L	Nv/Mn	Nv/Pmn	Nv/Vs	Vv/Mn	Vv/Pmn	Vv/Vs	Vcm/Mn	Vcm/Pmn	Vcm/Vs	N/Mn	N/Pmn	N/Vs
Grupo	1	0.3619	0.5312	0.0961	0.9391	0.5428	0.0180	.	.	.	0.2226	0.5302	0.0965
Posição	1	0.8609	0.9976	0.2218	0.8257	0.9117	0.0185	.	.	.	0.8386	0.9973	0.2209
Tempo	2	0.0177	0.3817	0.0353	0.2029	0.1720	0.0171	.	.	.	0.0152	0.4393	0.0371
Grupo x Posição	1	0.7097	0.8371	0.2430	0.5877	0.6808	0.0179	.	.	.	0.982	0.8391	0.2415
Grupo x Tempo	2	0.4463	0.5570	0.3366	0.5416	0.4122	0.1637	.	.	.	0.3413	0.5568	0.3368
Posição x Tempo	2	0.9953	0.9609	0.3551	0.9983	0.5968	0.0373	.	.	.	0.8357	0.9605	0.3559
CV		7,33%	18,95%	7,87%	50,23%	66,11%	8,19%	.	.	.	5,34%	14,32%	5,71%
R ²		98,29%	73,43%	97,46%	83,37%	87,95%	99,41%	.	.	.	98,55%	7,08%	97,37%

Tabela 10. Desdobramento da interação grupo x posição para a variável densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos (Vs). Dados transformados segundo a escala logarítmica log (obs+1).

	CORPO	FUNDO
BIOMEMBRANA	0,107 a A	0,057 b A
CONTROLE	0,057 a B	0,057 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando estatisticamente os valores médios de densidade numérica (Nv) da interação grupo x posição, verificou-se que a variável vasos foi significativamente maior na posição corpo dentro do grupo biomembrana e significativamente maior no grupo biomembrana dentro da posição corpo.

Tabela 11. Desdobramento da interação posição x tempo para a variável densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos (Vs). Dados transformados segundo a escala logarítmica log (obs+1).

	15	30	60
CORPO	0,060 a A	0,1250 b A	0,060 a A
FUNDO	0,050 a A	0,065 a B	0,055 a A

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Avaliando estatisticamente os valores médios de densidade numérica (Nv) da interação posição x tempo, verificou-se que a variável vasos foi significativamente maior no tempo 30 dias, dentro da posição corpo e significativamente maior na posição corpo dentro do tempo 30 dias.

VI. DISCUSSÃO

Durante a avaliação clínica diária, não se constataram alterações dignas de nota quanto ao estado geral dos animais, tampouco quanto ao aspecto da urina e das fezes. Estes achados assemelham-se, em parte, às constatações de SADER et al. (2000), após implante de biomembrana de látex natural em pericárdio de cães.

No presente estudo, em decorrência do emprego da biomembrana, assim como no experimento de la FUENTE et al. (2003), não ocorreu nenhum caso de óbito.

ZIMMERMANN & RAISER (2006) afirmaram que membranas de látex ocasionavam resposta imunológica local e rejeição, quando empregadas em coelhos, uma vez que, sob avaliações histopatológicas, identificaram marcante presença de eosinófilos ao redor dos implantes, contra-indicando, assim, o uso deste material, nesta espécie animal. No entanto, nesta pesquisa, conquanto tenha se observado intenso infiltrado inflamatório de células, que a priori pareciam eosinófilos, constatou-se, por meio de mensurações, que estes tipos celulares tratavam-se de pseudo-eosinófilos (BANKS, 1992; LESTER, 2005), não caracterizando a ocorrência de reação imunogênica ao material implantado.

Observações semelhantes quanto a não ocorrência de reação imunogênica ao material implantado também foram exaradas por POTÉRIO-FILHO et al. (1999) ao empregarem o biocompósito de látex no tratamento clínico de pacientes portadores de úlceras de membros posteriores.

Em todos os coelhos, a temperatura retal, no período pós-operatório, manteve-se no padrão fisiológico para a espécie, ou seja, entre 38,6°C a 40°C (ANDERSSON & JÓNASSON, 1996).

Embora a ocorrência de deiscências de sutura, foi constatada em ratos nos quais o dreno de penrose foi utilizado nas anastomoses esôfago-gástricas (CUI et al., 2000) e em ratos, na recuperação de defeitos abdominais iatrogênicos através do uso de biomembrana (PAULO et al., 2005), em nenhum dos coelhos deste experimento tal fato foi observado.

Também não se notaram sinais macroscópicos de rejeição ou falha no implante e, além disso, não foram verificadas presença de muco, sinais de necrose, fístula, inflamação e líquidos nas cavidades (de la FUENTE et al., 2003; OH et al., 2002; KUNG, 2002; SOARES et al., 1996; SMYRNIS, 1982). Todavia, houve relato da ocorrência de fístula mediante emprego da biomembrana de látex natural na herniorrafia perineal em um cão (PAULO et al., 2005).

Para todas as amostras, tanto por ocasião do implante, quanto de colheita, verificou-se que a forma e a topografia do estômago apresentavam-se de acordo com as descrições dos tratadistas em anatomia, para este órgão, em unicavitários (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1972; BARONE 1976; NICKEL et al., 1979; SISSON, 1986; REECE, 1996; DYCE, 1997; KÖNIG et al., 2002).

Nos animais pertencentes ao grupo GBC e GBF, notaram-se a ocorrência de aderências da área do implante com o omento (todos os tempos), peritônio parietal da parede ventral do abdômen (todos os tempos), alças intestinais (15 e 30 dias de pós-operatório), fígado (15 e 30 dias de pós-operatório) e baço (15 e 30 dias de pós-operatório), achados estes que se assemelham, em parte, às descrições de HORI et al. (2001), onde encontraram aderência, entre o estômago e o omento, em cães, nos quais realizaram implante de esponja de colágeno neste órgão.

Em apenas um animal do grupo GBF, aos 30 dias de pós-operatório, não foram encontradas aderências do estômago com nenhuma estrutura, observação esta que corrobora aos achados de SMYMIS (1982) ao utilizar “dracon patch” em estômago de coelhos; também está de acordo com as observações relativas à utilização da biomembrana de látex natural em substituição a fragmento de pericárdio em cães (SADER et al., 2000); com as descrições de MENTE E CENEVIVA (2001), quando da aplicação de látex no subcutâneo de ratos normais e diabéticos, e ainda, aos relatos sobre o emprego da biomembrana como implante conjuntival (PINHO et al., 2004), pois em todos estes casos não foram observadas aderências da região do implante com estruturas adjacentes.

No grupo GC verificou-se aderência do estômago com as seguintes estruturas: peritônio parietal da parede ventral do abdômen (15 dias de pós-operatório), omento (15 e 30 dias de pós-operatório) e baço (30 dias de pós-operatório). Aos 60 dias de pós-operatório não se observou aderências em todos os animais avaliados, tal ocorrência, provavelmente, deve-se ao fato de que nestes animais, aos se realizar apenas incisão e sutura da parede do estomago, a manipulação desse órgão foi menor.

As aderências pós-cirúrgicas que ocorrem na cavidade peritoneal são decorrentes de baixa atividade fibrinolítica no local da lesão cirúrgica, favorecendo o acúmulo de matriz de fibrina e, conseqüentemente, uma fibroproliferação, que se caracteriza por adesão (LIAKAKOS et al., 2001).

Particularmente no grupo GB, aos 60 dias de observação, a biomembrana não foi encontrada, nem na parede e sequer no lúmen do estômago; embora também não se tenha verificada a presença dessa estrutura nas fezes dos coelhos, acredita-se que estes tal ocorrência assemelhe-se às de MRUÉ (1996), que detectou o biocompósito nas fezes dos cães, após dez dias da esofagoplastia e, às observações de PAULO et al. (2005) que verificaram a eliminação do biopolímero, em média, aos 13,8 dias após sua implantação na parede abdominal ventral de ratos.

Na análise histopatológica, da interface dos implantes com o tecido nativo dos coelhos eutanasiados aos quinze dias de pós-operatório, observou-se descontinuidade da camada muscular e mucosa, achados que se assemelham às descrições de SOARES et al. (1996) quando realizaram anastomoses esôfago-gástricas em cães; às de SADER et al. (2000) ao utilizarem o biopolímero em pericárdio de cães; com as de HORI et al. (2001) após implantarem esponja de colágeno em estômago de coelhos; às de MENTE E CENEVIVA (2001) no implante de látex em subcutâneo de ratos normais e diabéticos, com as de OH et al. (2002) na utilização de PDX em estômago de cães; também com as descrições de FRADE et al. (2002) ao na utilizarem a biomembrana em úlceras crônicas de pernas e aos achado de la FUENTE et al. (2003), ao utilizarem submucosa de intestino delgado de suínos em estômago de ratos.

De outra forma, estes achados diferem dos registros de SMYRNIS (1982) que constatou completa regeneração da mucosa e serosa após 15 dias de pós-operatório em estômago de coelhos com o uso de “dracon patch”, MRUÉ (1996) que verificou a formação de todas as camadas esofágicas, em cães, após dez dias de implante da biomembrana como substituta parcial deste órgão e de PINHO et al. (2004) que notaram epitelização conjuntival, após cinco dias de implantação deste biocompósito na conjuntiva de coelhos.

Aos quinze e 30 dias de pós-operatório, foi verificado nos animais deste trabalho a presença exuberante de tecido de granulação na região da interface implante e tecido nativo, estas observações assemelham-se, em parte, às descritas por SOARES et al. (1996), SADER et al. (2000), HORI et al. (2001), FRADE et al. (2002), de la FUENTE et al. (2003), PAULO et al. (2005) e RABELO et al. (2005).

Aos quinze dias de pós-operatório, observou-se, a presença de infiltrado inflamatório constituído por células polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN), resultados estes que estão de acordo com as descrições de SADER et al. (2000), que implantaram o biopolímero de látex na substituição parcial de segmento de pericárdio em cães; assemelham às constatações de RABELO et al. (2005) ao utilizarem biopolímero de látex, em hérnias umbilicais de bovinos leiteros, e coincidem, em parte, às descrições de SOARES et al. (1996), ao realizarem em cães anastomoses esôfago-gástricas utilizando anel biofragmentável, além de sutura por invaginação, pois estes autores observaram a predominância de polimorfonucleares. Estas constatações sugerem a evolução do processo de reparação tecidual, caracterizado, neste período, pelas fases de debridamento e proliferação (RINGLER, 2000).

Nas amostras referentes aos implantes de biomembrana, dos coelhos eutanasiados aos 30 dias de pós-operatório, observadas à microscopia de luz, verificou-se, descontinuidade das camadas mucosa e muscular, observações estas que corroboram com as de OH et al. (2002), FRADE et al. (2002) e de la FUENTE et al. (2003) e divergem dos achados de SMYRNIS (1982) que constatou completa regeneração da mucosa e serosa, após 15 dias de pós-operatório em estômago de

coelhos com o uso de “dracon patch”, e dos relatos de SOARES et al. (1996) ao observarem completa reepitelização em anastomoses esôfago-gástricas de cães, aos 30 dias de pós-operatório; também discordam dos achados de MRUÉ (1996) que verificou a formação de todas as camadas esofágicas, em cães, após dez dias de implante da biomembrana como substituta parcial deste órgão; diferem ainda dos relatos de HORI et al. (2001) ao notarem regeneração da parede do estômago aos 28 dias de pós-operatório, quando da utilização de esponja de colágeno em cães, de MENTE E CENEVIVA (2001) que em implante de látex no subcutâneo de ratos normais e diabéticos, observaram epitelização aos 21 dias de pós-operatório e de PINHO et al. (2004) ao notarem epitelização conjuntival após cinco dias de implantação deste biocompósito na conjuntiva de coelhos.

Ainda aos 30 dias de pós-operatório observou-se infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, tal qual verificaram HORI et al. (2001), ao utilizarem esponja de colágeno em estômago de cães e da mesma forma que relataram MENTE E CENEVIVA (2001), ao implantarem látex em subcutâneo de ratos e de RABELO et al. (2005), ao utilizarem látex em hérnias umbilicais em bovinos leiteiros. Entretanto, tais verificações diferem das constatações de SOARES et al. (1996) que não verificaram infiltrado inflamatório aos 30 dias de pós-operatório ao realizarem anastomoses esôfago-gástricas em cães.

Aos 60 dias de pós-operatório, verificou-se nos animais ora estudados que a parede do estômago, no local do implante, estava contínua, com todas as camadas reconstituídas, composta, a partir do lúmen, pelas seguintes camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, de acordo com as descrições sobre a estruturação tecidual gástrica normal, pelos tratados clássicos de anatomia e histologia (SISSON, 1986; BANKS, 1992; REECE, 1996; DYCE, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), embora nas amostras em questão, observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear (MN), ao se comparar com as observações dos períodos anteriores, achados estes que assemelham-se às descrições de RABELO et al. (2005).

Vale ressaltar que em todos os tempos avaliados de pós-operatório, constatou-se presença de neovascularização, fato que também foi observado em outras aplicações, sejam elas, clínicas ou cirúrgicas, da biomembrana de látex natural (MRUÉ, 1996; POTÉRIO-FILHO et al., 1999; SADER et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003; PINHO et al., 2004; RABELO et al., 2005; PAULO et al., 2005; SOUZA et al., 2007). Estas observações sugerem a evolução do processo de reparação tecidual, caracterizado, neste período, pelo início da fase de remodelação, que pode perdurar de meses até um ano (RINGLER, 2000).

As avaliações estereológicas e estatísticas foram fundamentais nas análises comparativas entre os resultados observados em cada grupo estudado, possibilitando quantificar as alterações verificadas (NIELSEN et al., 1986; PEREIRA & MANDARIM-DE-LACERDA, 2001), propiciando dessa forma constatar que a densidade de volume de vasos foi significativa, fato que explica a ação cicatrizante da biomembrana, já que a potente ação angiogênica é fundamental no processo de reparação tecidual (BATISTA et al., 1996; MRUE, 1996; THOMAZINI et al., 1997; LACHAT et al., 1997; POTÉRIO-FILHO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 1999. MRUÉ, 2000; MENTE & CENEVIVA, 2001; FRADE et al., 2003; MRUÉ et al., 2004; PAULO et al., 2005 e SOUSA et al., 2007).

VII. CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos, acredita-se poder concluir que a biomembrana de látex natural forneceram arcabouço para orientação e desenvolvimento de todas as camadas do estômago, por meio de processos de reparação, restabelecendo, aos 60 de pós-operatório, os tecidos que compõem o órgão, evitando também o escape de conteúdo estomacal para a cavidade. Associado a isso, os implantes foram biocompatíveis, uma vez que não induziram à reação imunológica de rejeição.

VIII. REFERÊNCIAS*

ÀGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; APFEL, M.I. R. Estereologia do Miocárdio de Ratos Jovens e Idosos. **Arq Bras Cardiol**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 2, p. 105-109, 1998.

AHERNE, W.A.; DUNNIL, M.S. **Morphometry**. London: Ed. Edward Arnold, 1982, p.205.

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

AVVAD-PORTARIL, E.; GOMES, N.D.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Simple hyperplasia *versus* proliferative endometrium: stereological study *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 73-79, 2003.

BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. Editora Manole, 1992, p.439 - 50, p.454 -6.

BARONE, R. **Anatomie comparée dès mamifères domestiques**. Paris: Vigot, 1992, p. 523.

BATISTA, L.C.; DALECK, C.R.; SHIMANO, A.C.; ALESSI, A.C.; ABRAHÃO, M.S. Estudo comparativo da resistência à tração do peritônio (bovino, eqüino, suíno e canino) a fresco e conservado em glicerina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 33, p. 305-312, 1996. Suplemento.

BEHMER, A.O.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS-NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 1976, p. 239.

COTRAN R.S.; KUMAR V.; COLLINS T. **Patologia estrutural e funcional**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 79 – 100.

CUI, Y.; URSCHEL, J.D. Latex rubber (penrose drain) is detrimental to esophagogastric anastomotic healing in rats. **J Cardiovasc Surg**, Torino, v. 41, n. 3, p.479-81, 2000.

de la FUENTE, S.G.; GOTTFRIED, M.R.; LAWSON, D.C.; HARRIS, M.B.; MANTYH, C.R.; PAPPAS, T.N. Evaluation of porcine-derived small intestine submucosa as a

* ABNT-NR 6023

biodegradable graft for gastrointestinal healing. **J Gastrointest Surg**, v. 7, n.1, p. 96-101, 2003.

DE NOVO, R.C. Doenças do estômago. In: TAMS, R.T. **Gastroenterologia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 5, p. 155-190.

DELMAN, H.D; BROWN, E.M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982, p. 181-85; 192-200.

DYCE K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.82 – 6.

FOSSUM, T. W. Cirurgia do Estômago. In:_____. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002, cap16, p. 289-322.

FRADE, M. ; CURSI, I.B.; ANDRADE, F.F.; NETTO, J.C.; FOSS, N.T. Induction of the leg wound healing by natural latex biomembrane (NLB). In: WORLD CONGRESS OF DERMATOLOGY, 20, 2002, Paris. **Proceedings...** Paris: Masson, 2002. Disponível em: <www.e2med.com/ad>. Acesso em: 26 abr. 2005.

FRADE, M.A.C.; CUNHA, F.Q.; COUTINHO-NETTO, J.; FOSS, N.T. Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico da cicatrização na presença de biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. In: REUNION ANUAL DE DERMATOLOGUS LATINOAMERICANOS DEL CONO SUR, 23, 2004, Lima. **Anais...** 2004.

FRADE, M.A.C.; CURSI, I.B.; ANDRADE, F.F.; NETTO, J.C.; FOSS, N.T. Stimulation of diabetic wound healing by natural latex biomembrane dressing. In: WORLD CONGRESS OF DERMATOLOGY, 20, 2002, Paris. **Proceedings...** Paris: Masson, 2002. Disponível em: <www.e2med.com/ad>. Acesso em: 26 abr. 2005.

FUGIMOTO F.; JERVÁSIO A.C.; MISAWA A.K. Uso da biomembrana de látex em cavidade exenterada: relato de caso **Arq Bras Oftalmol**, v. 70, p. 854-857, 2007.

GONÇALVES, G. PARIZOTTO, N. A. Fisiologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia. **Rev. Bras.Fisiot.**, Campinas, v. 3, n.1, p.5-13,jun. 1998.

GUNDERSEN, H.J.G JENSEN, F.B KIEU,K. NIELSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. **Journal of Microscopy**. Mar;193(Pt 3):199-211 1999.

GUNDERSEN, H.J.G The nucleator. **Journal of Microscopy**, 151:3-21, 1988.
HOWARD, C.V.; REED, M.G. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. Oxford: **Bios Scientific Publishers**, 2004.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2004, cap. 7, v.2, p. 41-48.

KROPP, B. P. Small-intestinal submucosa for bladder augmentation: a review of preclinical studies. **World Journal of Urology**, Postfach, v. 16, p. 262-267, 1998.

KUNG, S.P. Surgical repair of giant gastroduodenal perforation with teflon-felt? **Med Hypotheses**, Scotland, v. 59, n.4, p. 473-4, 2002.

LIAKAKOS, T.; THOMAKOS, N.; FINE, P.M.; DERVENIS, C.; YOUNG, R.L. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology, and clinical significance. Recent Advances in Prevention and Management. **Digestive Surgery**, Basel, v.18, p.260-273, 2001.

LOPES, P.F. Alterações estruturais na mucosa do cólon derivado - Estudo estereológico experimental em ratos. **Rev. bras Coloproct**, v. 22, n. 3, p. 164-169, 2002.

LOPES-PAULO, F. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. **Ver. Bras. Coloproct**, v. 22, n. 2, p. 73-76, 2002.

MATTHIESEN, D. T. Estômago. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005, cap. 14, p. 204-207.

MAYHEW T.M.; GUNDERSEN, H.J.G. 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the dissector for stereological counting of particles in 3D space. **Journal of Anatomy**, v. 188, p. 1-15, 1996.

MENTE E.D.; CENEVIVA R. – Transplante de ilhotas pancreáticas em dispositivo de imunisolamento celular. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, suppl.1, 2001.

MRUÉ, F. **Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal - estudo experimental em cães**. 2000. 112f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. **Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex – estudo experimental em cães**. 1996. 109f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1996.

MRUÉ, F.; COUTINH-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J. J.; THOMAZINI, J. A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 277-283, 2004.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. and SACK, W.O. **The viscera of the domestic mammals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1079, p. 176 – 8.

NIELSEN, K.; COLSTRUP, H.; NILSSON, T.; GUNDERSEN, H.J.G. Stereological estimates of nuclear volume correlated with histopathological grading and prognosis of bladder tumor. **Virchows archiv - B - Cell pathology including molecular pathology**, v. 52, p. 41–54, 1986.

NIELSEN, K.K. Changes in morphology, function and blood flow in mini-pig urinary bladder after chronic outflow obstruction and recovery from obstruction. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology – Supplement**, Copenhagen, v. 195, p. 1–39, 1997.

NUJNINGA, J. E.; MOERKERK, H.; HANSEN, A.; HULSBERGEN, C. A.; OOSTERWIJK-WAKKA, J.; OOSTERWIJK, E.; GIER, R. P. E.; SCHALKEN, K. A.; KUPPEVELT, T. H.; FEITZ, W. F. J. A rabbit model to tissue engineer the bladder. **Biomaterials**, Guildford, v. 25, p. 1657-1661, 2004.

OH, D.S.; MANNING, M.M.; EMMANUEL, J.; BROYLES, S.E.; STONE, H.H. Repair of full-thickness defects in alimentary tract wall with patches of expanded polytetrafluoroethylene. **Ann Surg**, v. 235, n.5, p. 708-11, 2002.

OLIVA, V. N. L. S. Anestesia inalatória. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 16, p. 174-183.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, J. La régénération du tympan avec l'utilisation de matériel biosynthétique nouveau. In: CONGRÈS FRANÇAIS D'OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE ET DE CHIRURGIE DE LA FACE ET DU COU, 106., 1999, Paris. **Anais....** p. 273, 1999.

OLIVEIRA, J. A. A.; HYPOLITO, M. A.; COUTINHO-NETTO, J.; MRUÉ, F. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 5, p. 649-655, 2003.

PAKKENBERG, B., GUNDERSEN, H.J.G. New stereological method for obtaining unbiased and efficient estimates of total nerve cell number in human brain areas. Exemplified by the mediodorsal thalamic nucleus in schizophrenics **APMIS**. Aug; 97, n.8, p. 677-81, 1989.

PAKKENBERG, B., GUNDERSEN, H.J.G. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the dissector and fractionator. **Journal of Microscopy**, n.150, p. 1-20, 1988.

PAULO, N.M.; LIMA, F.G.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.T.; FLEURY, L.F.F.; SANT' ANA, F.J.F.; BORGES, A.C.; TELLES, T.C. 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**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 305-310, 2005.

PAULO, N.M.; SILVA, M.A.M.; CONCEIÇÃO, M. Biomembrana de látex natural (*Hevea brasiliensis*) com polilisina a 0,1% para herniorrafia perineal em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 79-82, 2005.

PEREIRA, L.M.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.. Glomerular profile numerical density per area and mean glomerular volume in rats submitted to nitric oxide synthase blockade. **Histol Histopathol**, v. 16, p. 15-20, 2001 *apud* THIEL, M. **Análise quantitativa da fibrose e semiquantitativa da reação inflamatória de quatro diferentes slings sintéticos**. 2006. Dissertação (Doutorado em Cirurgia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PINHO, E. C. C. M.; SOUZA, S. J. F.; SCHAUD, F.; LACHAT, J. J.; NETTO, J. C. Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v. 67, n. 1, p. 27-32, 2004.

POTÉRIO-FILHO, J.; SILVEIRA, S. A. F.; POTÉRIO, G. M. B.; MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J. O uso do látex natural com polilisina 0,1% na cicatrização de úlceras isquêmicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANGIOLOGIA E CIRURGIA VASCULAR, 33., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular, 1999, p.156.

POVER, C.M.; COGGESHALL, R.E. Verification of the dissector method for counting neurons, with comments on the empirical method. **Anatomical Record**, n. 231, p. 573-578, 1991.

RABELO, R.E.; SANT' ANA, F.J.F.; PAULO, N.M.; ROMANI, A.F.; SILVA, L.A.F.; VIU, M.A.O.; ALVES, C.B.; LIMA, C. R.O.; SILVA, O.C. Emprego do compósito látex, poliamida e polilisina a 0,1% na correção cirúrgica de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos leiteiros. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 2, p. 169-175, 2005.

RINGLER, D.J. Inflamação e reparo. In: JONES, T.C. et al. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. cap.5, p.119-165.

ROBBINS, S. L., et al. – **Patologia estrutural e funcional** 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora ELSEVIER, 2005, p.1422.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI NETO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES JR, P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 15, n. 4, 338-344, 2000.

SASAHARA, T.H.C. et al. Partial urethral obstruction of rabbit urinary bladder: stereological evidence that the increase in muscle content is mostly driven by changes in number, rather than size, of smooth muscle cells. **Journal of Anatomy**, v. 210, n. 4, p. 449–459, 2007.

SCHWARZE, E. and SCHRÖDER, L. **Compendio de anatomía veterinaria**. Zaragoza: Acribia, 1972, p.2.

SISSON, S. Aparelho Digestivo. In: GETTY, R.; **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro, Interamericana. n. 1, p.105 – 6, 1986.

SMYRNIS, S.A. Dacron patch for closure of experimental stomach defects. **Br J Sur**, v. 69, n.2, p. 82-3, 1982.

SOARES, J.H.; NIGRO, A.J.T.; LIMA, C.A.P.; STÁVALE, J.N.; JULIANO, Y.; NOVO, N.F. Anastomoses esôfago-gástricas com anel biofragmentável e por invaginação: estudo experimental em cães. **Acta Cir. Bras**, v. 11, n.4, p. 191-9, 1996.

SOUSA L.C.A.; PIZA M.R.T.; NETTO J.C.; RUIZ B.; SCHMIDT V.B. – Biomembrana de látex: novo método para o revestimento da cavidade aberta nas timpanomastoidectomia. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, São Paulo, v.73, n. 3, 2007.

STERIO, D.C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. **Journal of Microscopy**, n. 134, p. 127-136, 1984.

STONE, E. A. Bexiga. In: BOJRAB, M. J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 1996, cap. 26, p. 355-356.

THOMAZINI, J.A.; MRUÉ, F.; LCHAT, J. J.; ZBOROWSKI, A. C.; DURAN, J. H. R.; CENEVIVA, R.; COUTINHO-NETTO, J. Morphological and biochemical characterization of a prosthesis manufactured from natural latex of *Hevea brasiliensis* for medical utilization. In: MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR ELECTRON MICROSCOPY, 16., 1997, Caxambú. **Proceedings...** Caxambú: Brazilian Society for Electron Microscopy, 1997, p. 798-799.

WEIBEL, E.R. Stereology methods. Pratical methods for biological morphometry. London: Academic Press, 1979, v.1, p.415.

ZIMMERMANN M.; RAISER A.G.; BARBOSA A.L.T.; NOVOSAD D.; STEFFEN P.B.; STEFFEN R.P.B.; LUKARSEWSK R.; SOARES M.; LINDINGER R.; JÚNIOR F.P. – Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Cienc. Rural** v.37, n. 6, 2007.