

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

**MORFOLOGIA E ESTEREOLOGIA DO PERITÔNIO DE
PACA CONSERVADO EM SOLUÇÃO SUPERSATURADA DE
AÇÚCAR A 300% OU GLICERINA A 98% IMPLANTADOS NA
PAREDE ABDOMINAL DE RATOS**

Leonardo Martins Leal

Médico Veterinário

2013

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

**MORFOLOGIA E ESTEREOLOGIA DO PERITÔNIO DE
PACA CONSERVADO EM SOLUÇÃO SUPERSATURADA DE
AÇÚCAR A 300% OU GLICERINA A 98% IMPLANTADOS NA
PAREDE ABDOMINAL DE RATOS**

Leonardo Martins Leal

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 a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária.**

2013

Leal, Leonardo Martins
L435m Morfologia e estereologia do peritônio de paca
conservado em solução supersaturada de açúcar a 300%
ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de
ratos / Leonardo Martins Leal. -- Jaboticabal, 2013
x, 52 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2013

Orientadora: Marcia Rita Fernandes Machado
Banca examinadora: Bruno Watanabe Minto, Sheila
Canevese Rahal
Bibliografia

1. Cicatrização 2. Cirurgia. 3. Enxerto. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:617:599.324.5

Dados Curriculares do Autor

LEONARDO MARTINS LEAL– nasceu na cidade de Monte Azul Paulista – SP, em 19 de maio de 1986. Em março de 2004, iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Campus Jaboticabal–SP, que foi concluído em dezembro de 2008. Foi bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, no período de abril de 2007 a março de 2008. Em fevereiro de 2009, ingressou no programa de aprimoramento em Medicina Veterinária e Saúde Pública na área de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal com bolsa da Fundap e teve sua conclusão em janeiro de 2011. Em março de 2011 ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

*“Pobre daquele que pensa que ser feliz
nesse mundo é ter riqueza”*

João Carreiro - Casinha Verde

*Aos meus pais e ídolos, Tião e Angela, que me proporcionaram sempre
com muita Fé e Amor a educação necessária
para alcançar meus objetivos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente agradeço a Deus, a Jesus Cristo e a Nossa Senhora Aparecida por todas as graças concedidas e orientação nos momentos mais difíceis da minha vida. Sem fé não sou nada!

À minha orientadora e grande amiga Professora Márcia pelo carinho, ensinamentos e até pelos “puxões de orelha”, à toda sua família, Professor Joaquim, Artur e Renatão pela paciência ao me receberem inúmeras vezes em vossa casa e em especial ao seu Luiz Fernandez pelo exemplo de educação e cultura.

Ao meu irmão Rodolfo e toda sua família, Marcela, Sofia e Theodoro pelos momentos de alegria e descontração em todos os finais de semana que passamos juntos.

À minha namorada e porto seguro Isabela que mesmo distante me dá grande apoio em todas as minhas decisões.

À todos os meus amigo-irmãos, Turko, Franzino, Mutum, Pardal, Mássimo, Larga e Vlader, pela alegria incondicional nos anos de nossa convivência na sempre eterna República Pá-nela.

Aos meus amigos de departamento Leandro, Sérgio, Colombina e Andréa Bosso pela ajuda em todos os momentos deste estudo.

À colega Alessandra Scavone pela ajuda em todas as fases do experimento.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Antônio Augusto Coppi da FMVZ-USP e seus orientados Aliny e Fernando Ladd pelos grandes ensinamentos em estereologia.

Ao professor Gener do departamento de ciências exatas da FCAV-Unesp pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao pesquisador Claudinei e sua orientada Patrícia pelos ensinamentos histológicos.

Ao professor Alexandre Mazzanti da Universidade Federal de Santa Maria pela ajuda com a metodologia para a conservação das membranas em solução de açúcar.

Aos funcionários Toninho e Beterraba do setor de silvestres da FCAV-Unesp pela ajuda com o manejo das pacas.

Aos funcionários e amigos Ceará, Dona Marilda, Vagner, Euclidão e Clara do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV-Unesp.

À todos os professores e funcionários da FCAV-Unesp que participaram diretamente ou indiretamente de minha formação acadêmica.

Ao programa de pós-graduação em cirurgia veterinária e a seção técnica de pós-graduação da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

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

SUMÁRIO

	Página
Lista de abreviaturas.....	vi
Lista de tabelas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Uso de membranas biológicas em cirurgias da parede abdominal.....	2
2.2 Meios de conservação de membranas biológicas	4
2.3 Peritônio	6
2.4 Cicatrização Tecidual.....	7
2.5 Estereologia.....	9
3. OBJETIVO.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Grupos experimentais.....	11
4.2 Aquisição da membrana de peritônio da paca.....	12
4.3 Procedimento Cirúrgico	
4.3.1 Pré-operatório.....	13
4.3.2 Trans-operatório	14
4.3.3 Pós-operatório.....	15
4.4 Avaliações macroscópicas.....	16
4.5 Avaliações microscópicas.....	16
4.6 Análise Estatística.....	19
5. RESULTADOS	
5.1 Avaliação Trans-cirúrgica.....	19
5.2 Avaliação Clínica.....	20
5.3 Avaliação Macroscópica	
5.3.1 Grupo Controle (GI).....	22
5.3.2 Grupo Peritônio da Paca conservado em açúcar a 300% (GII).....	23
5.3.3 Grupo Peritônio da Paca conservado em glicerina 98% (GIII).....	25
5.4 Avaliação Histológica	
5.4.1 Grupo Controle.....	28

5.4.2 Grupo Peritônio da Paca conservado em açúcar 300% (GII).....	29
5.4.3 Grupo Peritônio da Paca conservado em glicerina 98% (GIII).....	37
5.5 Estereologia.....	45
5.6 Análise estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	46
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÃO.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	53



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 012730/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação morfológica e estereológica comparativa do peritônio de paca (*Cuniculus paca*, L. 1766) conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% e conservado e em glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos Wistar**", sob a responsabilidade da Profª Drª Márcia Rita Fernandes Machado está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2011.

Jaboticabal, 11 de julho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

MORFOLOGIA E ESTEREOLOGIA DO PERITÔNIO DE PACA CONSERVADO EM SOLUÇÃO SUPERSATURADA DE AÇÚCAR A 300% OU GLICERINA A 98% IMPLANTADOS NA PAREDE ABDOMINAL DE RATOS

RESUMO - Na busca de material biológico alternativo para a realização de implantes, objetivou-se com o presente estudo avaliar comparativamente a implantação do peritônio de paca, uma nova opção de biomaterial, conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% e conservado em glicerina a 98% na parede abdominal de ratos wistar. Foram utilizados 60 ratos, machos, da linhagem Wistar pesando entre 150 e 200 gramas organizados nos seguintes grupos experimentais: grupo controle (GI), grupo peritônio conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% (GII) e grupo peritônio conservado em glicerina a 98% (GIII), cada um com 20 animais. Os grupos GII e GIII receberam o enxerto de peritônio da paca conservado em solução de açúcar 300% e glicerina 98% respectivamente, e o grupo GI não recebeu a membrana. Cinco ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia em quatro momentos distintos: sete, 15, 30 e 60 dias de pós-operatórios para avaliações clínicas, macroscópicas, histológicas e estereológicas da interface implante-tecido nativo. Apesar de reações adversas observadas em 57,5% dos animais do grupo GII e GIII, em 95% dos animais destes grupos houve boa cicatrização da membrana. Na análise histológica, verificou-se a presença de grande infiltrado inflamatório nos períodos iniciais (sete e 15 dias) e grande presença de tecido conjuntivo nos momentos finais (30 e 60 dias). Mediante análise estereológica verificou-se que o número de células mononucleares diminuiu no decorrer dos momentos de avaliação. Concluiu-se que o peritônio da paca como membrana biológica conservado nos meios estudados pode ser utilizado com segurança na parede abdominal de ratos; ainda, que sua conservação em solução supersaturada de açúcar a 300% permitiu melhor maleabilidade no ato cirúrgico e também que a conservação em glicerina a 98% possibilitou, microscopicamente, menor resposta inflamatória.

Palavras-chave: cicatrização, cirurgia, enxerto, membrana biológica, *Cuniculus paca*, selvagem

**MORPHOLOGY AND STEREOLOGY OF PACA PERITONEUM PRESERVED IN
SUPERSATURATED SUGAR SOLUTION 300% OR GLYCERINE 98%
IMPLANTED IN ABDOMINAL WALL OF RATS.**

ABSTRACT - In the search for alternative biological material to perform implants, this study aimed to compare the implantation of paca peritoneum, a new option biomaterial, preserved in supersaturated sugar solution 300% and preserved in glycerin 98% in the abdominal wall of Wistar rats. A total of 60 male rats of Wistar strain weighing between 150 and 200 grams housed into three different experimental groups: control group (GI), peritoneum preserved in supersaturated sugar solution 300% group (GII) and peritoneum preserved in glycerin 98% group (GIII), with 20 animals each one. The GII and GIII received the paca peritoneum graft preserved in sugar solution 300% and glycerin 98%, respectively and the group GI did not receive any membrane. Five rats from each group were euthanized at four different times: seven, 15, 30 and 60 days post-surgery to macroscopic, microscopic and stereological evaluations in graft-native tissue interface. Despite the adverse reactions observed in 57,5% of GII and GIII, there was good healing of the membrane in 95% of the animals of these groups. On histological examination, there was a large presence of inflammatory infiltrates in the initial periods (seven and 15 days) and large presence of connective tissue in the final stages (30 and 60). By stereology, it was found that the number of mononuclear cells decreased throughout the evaluation times. It was concluded that the paca peritoneum as biological membrane preserved as presented in this study can be used safely in the abdominal wall of rats, the preservation in supersaturated sugar solution 300% allowed better flexibility during surgery and conservation in glycerin 98% allowed, microscopically, less inflammatory response.

Keywords - healing, surgery, graft, biological membrane, *Cuniculus paca*, wild

LISTA DE ABREVIATURAS

(em ordem que surgem no texto)

cm – centímetros.

Kg – quilogramas.

GI – grupo controle.

GII – grupo peritônio conservado em solução supersaturada de açúcar de cana-de-açúcar a 300%.

GIII – grupo peritônio conservado em glicerina a 98%.

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

M7 - momento da eutanásia para avaliações após sete dias de pós-operatório.

M15 – momento da eutanásia para avaliações após 15 dias de pós-operatório.

M30 – momento da eutanásia para avaliações após 30 dias de pós-operatório.

M60 – momento da eutanásia para avaliações após 60 dias de pós-operatório.

NaCl – Cloreto de Sódio.

ml – mililitros.

g – gramas.

mg – miligramas.

µm – micrometros.

HE - hematoxilina eosina.

M – molar.

°C – graus Celsius.

N – número total de célula inflamatória mononuclear ou polimorfonuclear.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GI, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.....	45
Tabela 2. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GII, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.....	45
Tabela 3. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GIII, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.....	46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem fotográfica de uma paca adulta em decúbito dorsal na qual se observa o peritônio parietal (P), sendo descolado da parede abdominal.....	12
Figura 2. Imagens fotográficas de um rato macho da linhagem Wistar, pertencente ao grupo controle; em A e B se observa a incisão abdominal mediana (seta). Em C nota-se a retirada do segmento elíptico formado pelas diversas camadas de músculos e aponeuroses abdominais (*). Em D verifica-se a mensuração (cm) do segmento, em E verifica-se a sutura contínua dessa incisão com náilon 4-0 (retângulo) e em F a sutura de pele (retângulo).....	14
Figura 3. Imagens fotográficas de um rato Wistar macho do GII. Em A nota-se a demarcação do segmento músculo-aponeurótico abdominal com molde medindo 2cm x 2cm (M) e em B a demarcação do segmento na membrana de peritônio da paca (*). Em C nota-se a membrana suturada com fio de náilon 4-0 (P); em D, sutura da pele (seta).....	15
Figura 4. Imagens fotográficas de um rato Wistar do GI, macho. Em A, molde com 9cm ² sobre a região abdominal contendo a interface implante com tecido nativo (*) e em B fragmento sustentado por quatro alfinetes presos em uma folha de isopor de 1.5 cm (seta).....	16
Figura 5. Imagens fotográficas de um rato Wistar pertencente ao GII. Em A, nota-se aos nove dias de pós-operatório, abaulamento abdominal(seta) e em B, fistulação na pele aos 12 dias de pós-operatório (seta).....	20
Figura 6. Imagens fotográficas de um rato Wistar pertencente ao GIII. Em A aos 12 dias de pós-operatório ocorreu fistulação de pele (seta) e em B no mesmo animal nota-se a formação de tecido de granulação (seta) sete dias após a fistulação.....	21
Figura 7. Imagens fotográficas de um rato Wistarr pertencente ao GIII. Em A aos 12 dias de pós-operatório, nota-se presença de abaulamento e área de necrose na pele (seta). Em B demonstra-se a formação de fístula (seta) com posterior expulsão da membrana (P) implantada...	21
Figura 8. Imagem fotográfica de um rato Wistar pertencente ao GIII que apresentou evisceração aos 12 dias de pós-operatório (seta).....	22

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 9. Imagem fotográfica do abdome de um rato Wistar, macho, GI, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde se nota a presença de aderência do omento no fio de sutura (seta).....	22
Figura 10. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, pertencente ao GII eutanasiado aos sete dias de pós-operatório onde se nota em A aderência na área do implante com o omento (seta) e em B membrana cicatrizada à musculatura (seta).....	23
Figura 11. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, pertencentes ao GII eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório onde se nota em A aumento de volume abdominal (seta preta) e em B boa cicatrização membrana-musculatura (seta amarela)...	24
Figura 12. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, pertencentes ao GII eutanasiados aos 30 dias de pós-operatório onde se nota em A presença de abscesso na área do implante (seta) e em B a boa cicatrização da interface membrana/musculatura (seta).....	24
Figura 13. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, pertencente ao GII eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde nota-se em A, a presença de pouca aderência do implante com o omento (seta) e em B, a dificuldade em delimitar as margens da membrana com a musculatura (seta).....	25
Figura 14. Imagens fotográfica do abdome de rato Wistar, macho, pertencente ao GIII eutanasiado aos sete dias de pós-operatório onde nota-se em A aderência na área do implante com o omento (seta) e em B a presença de seroma (retângulo).....	26
Figura 15. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, GIII, eutanasiados aos 15 dias de pós-operatório onde nota-se em A aderência na área do omento com a membrana (seta) e em B a presença de abscesso (quadrado) na área do implante e boa cicatrização membrana-musculatura (seta).....	26
Figura 16. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório onde nota-se em A, a presença de aderência do omento no implante (seta) e em B, a ocorrência de abscesso encapsulado (seta amarela) e boa cicatrização membrana-musculatura (seta preta).....	27

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 17. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde nota-se em A, aderência do omento com o implante (setas) e em B, boa cicatrização membrana-musculatura (setas).....	27
Figura 18. Fotomicrografias de fragmento abdominal do Grupo controle (GI) de rato Wistar, macho. Em A aos 7 dias de pós-operatório e em B aos 60 dias de pós-operatório, nota-se a presença de tecido fibroso (►) separando as camadas musculares (M). Presença do fio de sutura (seta) (Paraplast, HE, 5X).....	28
Figura 19. Fotomicrografia de fragmento abdominal do Grupo controle (GI) de rato Wistar, macho aos 60 dias de pós-operatório, nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e linfócitos (seta branca), vasos (V) e feixes musculares (M). (Paraplast, HE, 40x).....	29
Figura 20. Fotomicrografias da região de implante peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, sacrificado aos 7 dias de pós-operatório. Em A, nota-se área de fibrose (traço), próxima ao fio de sutura (F), separada do tecido muscular (M) e imagem negativa de tecido adiposo (*). Em B nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e linfócitos (seta branca). (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).	30
Figura 21. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Em A nota-se área de fixação do implante, o qual verifica-se imagem negativa de tecido adiposo (*) e a camada muscular (M) unida por um tecido fibroso (traço), próximo ao fio de sutura (F) e em B, em maior aumento, nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto, polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca), (Paraplast, HE, 5X e 40X respectivamente).....	32

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 22	. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório. Em A, nota-se a presença de moderado tecido fibroso (elipse) justaposto à camada muscular (M), próximo ao fio de sutura (F). Em B verifica-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear (seta), entremeado ao tecido muscular (M) (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).	34
Figura 23.	Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório. Em A nota-se, no local onde o implante foi afixado, a presença de tecido fibroso (elipse) entremeado ao tecido muscular (M). Em B, infiltrado inflamatório mononuclear (seta) junto ao tecido fibroso (área rosea) e muscular (M), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).....	36
Figura 24.	Fotomicrografias da região de implante peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, sacrificado aos 7 dias de pós-operatório onde em A nota-se imagem negativa de tecido adiposo (*), descontinuidade das camadas musculares (M), unidas por um discreto tecido fibroso () próximo ao espaço ocupado pelo fio de sutura (F). Em B, presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca). (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).....	38
Figura 25.	Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, sacrificado aos 15 dias de pós-operatório. Em A nota-se tecido adiposo (*), descontinuidade das camadas musculares (M), unidas por um discreto tecido fibroso (traço), próximos ao fio de sutura (F) e ao implante (P) e em B notam-se a presença de infiltrado inflamatório misto, representado por polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca). (seta), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).....	40

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 26	Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, sacrificado aos 30 dias de pós-operatório. Em A nota-se a presença de moderado tecido fibroso (traço) justaposto à camada muscular (M), acompanhado da presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado focal (elipse). Em B, presença de infiltrado inflamatório mononuclear (seta) (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).....	42
Figura 27.	Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, sacrificado aos 60 dias de pós-operatório. Em A nota-se no local onde o implante foi afixado a presença de moderado tecido fibroso (traço) entremeado a camada muscular (M). Em B verifica-se a presença de feixes musculares (M) e linfócitos (seta) juntos ao tecido fibroso (área rósea), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).....	44
Figura 28.	Gráfico da interação grupo x tempo para a contagem de mononucleares. Os grupos seguidos pelas mesmas letras nos diferentes momentos não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.....	47
Figura 29.	Gráfico da média do número de mononucleares nos grupos sem considerar o momento de avaliação. Os grupos seguidos pelas mesmas letras nos diferentes momentos não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.....	47

1. INTRODUÇÃO

A reparação cirúrgica ou reforço dos tecidos que compõe a parede da cavidade abdominal é uma das necessidades mais frequentes da cirurgia humana e veterinária (VULCANI et al., 2008).

Muitas vezes não é possível realizar a correção de defeitos na parede abdominal com padrões de suturas convencionais, em virtude, tanto da escassez de tecidos, quanto da alta tensão na linha de sutura, o que propicia a ocorrência de elevados índices de hérnias incisionais. Em tais casos, torna-se necessário o uso de próteses (FOSSUM, 2008). Nos animais domésticos, o maior desafio é o desenvolvimento de biomateriais que suportem forças exercidas pelas vísceras, em decorrência da posição quadrupedal destes animais, e pela movimentação das estruturas após o procedimento cirúrgico (VULCANI et al., 2008).

Neste contexto, deve-se considerar o emprego de membranas biológicas, que consistem em implantes de natureza orgânica, livres, inertes e que são aplicadas em locais variados, sendo constituídas, quase exclusivamente, por colágeno, tecido este que lhes confere baixa antigenicidade. Associados a essas características, apresentam ainda baixo custo, facilidade de obtenção e estocagem, esterilização viável e praticidade ao manuseio (ALVARENGA, 1992).

O principal objetivo do uso dessas membranas orgânicas, originárias de diferentes espécies animais, ou sintéticas, é fornecer arcabouço para orientação e desenvolvimento de novos tecidos mediante processos de reparação que restabeleçam a estrutura e a função do órgão atingido (PIGOSSI, 1964; BATISTA et al., 1996; BRUN et al., 2002; BRUN et al., 2004).

Dentre as membranas biológicas, o peritônio, aparentemente não apresenta potencial de transmissão de doenças ao receptor, é facilmente obtido e tem a vantagem de não necessitar de armazenamento especial, sendo conservado em temperatura ambiente por longo período de tempo (ALVARENGA, 1992).

Na procura, tanto de material biológico alternativo para a realização de implantes, quanto de novas opções de modelos de experimentação animal, surge a paca (*Cuniculus paca*, Linnaeus 1766), uma espécie pertencente à ordem dos roedores, típica de regiões tropicais (REDFORD; ROBINSON, 1991), presente em

grande parte do território brasileiro e américa latina (EISENBERG; REDFORD, 1999; LANGE; SCHMIDT, 2007; QUEIROLO et al., 2008). Esta espécie alimenta-se de frutas, mas pode consumir outros vegetais e até insetos em períodos de escassez alimentar (DUBOST; HENRY, 2006). Em cativeiro, pode atingir 80 cm de comprimento, 12 kg de massa corpórea (PACHALY et al., 2001) e 16 anos de tempo médio de sobrevivência (EISENBERG; REDFORD, 1999; LANGE; SCHMIDT, 2007; QUEIROLO et al., 2008). Sua importância, além da comercial como fonte protéica, pode também tomar âmbito da ciência, pois a paca apresenta características como: tamanho adequado, ampla distribuição geográfica, adaptação a ambientes variados, nutrição variada, entre outras, que atendem as condições atribuídas à modelo animal experimental (SANTOS, 2006).

Assim, dado o crescente uso de materiais biológicos em cirurgias reconstrutivas e a constante busca por métodos de conservação para os diversos tecidos (MOTA et al., 2002), objetivou-se comparar o peritônio da paca, conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% e conservado em glicerina a 98%, quando implantadas na parede abdominal de ratos, no que se refere à biocompatibilidade, capacidade de cicatrização e possíveis complicações, mediante realização de análises macroscópicas, histológicas e do estudo estereológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Uso de membranas biológicas em cirurgias da parede abdominal

Para Souza Filho (1992), se o material a ser utilizado é de origem biológica denomina-se enxerto e este pode ser classificado em: autoenxerto, quando é retirado e transferido para o mesmo indivíduo; aloenxerto, quando o tecido é transferido de um indivíduo para o outro, ambos pertencentes à mesma espécie; e xenoenxerto, no qual transplanta-se tecido de uma espécie para a outra.

A busca por implantes que possuam ao mesmo tempo baixa antigenicidade e alta resistência é constante. Membranas biológicas de caninos, ovinos, bovinos, equinos e suínos, preservadas em diferentes meios, têm sido estudadas há

aproximadamente cinco décadas (PIGOSSI, 1964; INATOMI et al., 1980; DALECK et al., 1987; DALECK et al., 1988; DALECK et al., 1989; VÁMHIDY et al., 1990; ALVARENGA, 1992; DALECK et al., 1992; REYES, 1993; SARTORI FILHO et al., 1997; BATISTA et al., 1996; COSTA NETO et al., 1999; BRUN et al., 2002; MOTA et al., 2002; NOLASCO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; SILVA et al., 2009; ZERWES et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012; SAPORITO et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; CAMARGO et al., 2012).

Em ratos, estudou-se o uso do pericárdio canino como opção para o reparo do músculo reto abdominal e constatou-se que a membrana atua como arcabouço para o crescimento do tecido vivo (BRUN et al. 2002).

Quitzan et al. (2003) estudaram comparativamente o uso do pericárdio bovino e da malha de poliéster também na parede abdominal de ratos, e concluíram que a malha de poliéster oferece maior resistência estrutural e resposta fibroblástica mais intensa, contudo, promove maior quantidade de aderências às vísceras abdominais.

Brun et al. (2004) utilizaram o centro frênico canino na reparação de defeitos musculares também em ratos Wistar e verificaram, ao exame macroscópico, substituição dos implantes por tecido vivo sem a sua eliminação. Ao exame microscópico, observaram que as substituições ocorreram com a deposição de tecido conjuntivo fibroso e ao final do período de observação (60 dias), as membranas não estavam presentes.

Freitas et al. (2005) estudaram o uso do peritônio bovino omentalizado no músculo reto abdominal de cães e verificaram em todos os animais evolução clínica satisfatória, com cicatrização e resistência teciduais adequadas à manutenção da conformação abdominal. Macroscopicamente observaram que o omento, além de propiciar maior aporte sanguíneo e consequente aceleração do processo de reparação, induziu aderência favorável, minimizando a formação de aderências entre as vísceras abdominais e o enxerto.

Silva et al. (2009) utilizaram cartilagem auricular bovina na parede abdominal de coelhos da raça Nova Zelândia e, embora tenham observado reações adversas como aderências intestinais e formação de abscesso em parte dos animais, classificaram a membrana como satisfatória, pois apresentou evidências de boa integração tecidual e cicatrização, não havendo eliminação do material implantado.

2.2 Meios de conservação de membranas biológicas

Os meios de preservação utilizados para manter as membranas biológicas devem possuir alto poder estabilizador, impedindo a total decomposição dos tecidos e o crescimento de microorganismos além de preservar ao máximo a integridade celular, aumentar a resistência à tração dos tecidos e atuar por um período de tempo prolongado (ALVARENGA, 1992; MOTA et al., 2002).

A glicerina a 98% vem sendo usada desde a década de 90 e, ainda, é o conservante mais utilizado (DALECK et al, 1988; BARIANI JUNIOR, 2007; OLIVEIRA et al., 2009, BARBOSA et al., 2012). Daleck et al (1988) empregaram esse meio para conservar peritônio canino e bovino e verificaram que a glicerina é um agente fixador e desidratante, dotada de propriedades anti-sépticas, com amplo espectro de ação, exceto sobre formas bacterianas esporuladas. A textura do material fica preservada, bem como seu grau de elasticidade e resistência (DALECK et al., 1988; ALVARENGA, 1992).

Na ultima década, diversas membranas biológicas conservadas em glicerina 98% tem sido avaliadas morfológicamente, microbiologicamente, em ensaios biomecânicos ou em cirurgias reparadoras (MOTA et al., 2003; BRUN et al., 2004; BASTOS et al., 2005; BARBOSA et al., 2012).

Mota et al. (2003) avaliaram morfológicamente e microbiologicamente a camada muscular de intestino delgado de cães conservadas por 45 dias nos seguintes diferentes meios: glicerina a 98%, tintura alcóolica de tiomersal 1:1000, solução fisiológica 0,9% congelada a -16°C com antibiótico, solução fisiológica 0,9% congelada a -16°C, polivinilpirrolidona a 50%, solução supersaturada de açúcar na concentração de 300%, e solução supersaturada de açúcar na concentração de 300% com antibiótico. Os autores relatam que não houve crescimento de microorganismo em nenhum dos meios estudados. Todavia, a glicerina a 98% e a solução supersaturada de açúcar na concentração de 300%, com e sem antibiótico, foram os melhores preservadores por manterem a integridade celular.

Brun et al. (2004), ao compararem a solução supersaturada de sal e glicerina 98% na conservação de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos

abdominais de ratos wistar, não presenciaram diferenças entre as reações teciduais no local de implantação entre os dois tratamentos. Com esses resultados, demonstraram que os meios de conservação estudados apresentaram respostas semelhantes na conservação de centro frênico canino, sendo ambos adequados para tal fim.

Bastos et al. (2005) compararam com ensaios de tração o uso do peritônio bovino conservado em glicerina e a tela de polipropileno na parede abdominal de ratos, e concluíram que a membrana biológica conservada apresentou resistência tênsil semelhante a da tela sintética.

Barbosa et al. (2012) analisaram a estrutura morfológica e ultraestrutural do peritônio parietal, pericárdio parietal, túnica vaginal e fáscia lata a fresco e em glicerina a 98% por 15, 30, 60 e 90 dias de ovinos da raça Santa Inês; e concluíram que as membranas apresentaram um único tipo de tecido, o tecido conjuntivo denso não modelado. Assim, afirmam que a glicerina a 98% utilizada como meio de conservação foi eficaz na manutenção da integridade tecidual das membranas.

A solução supersaturada de açúcar a 300% foi utilizada como meio alternativo para conservação de membranas (MAZZANTI et al., 2001; GONÇALVES et al., 2003; MAZZANTI et al., 2003; NOLASCO et al., 2003; RAPPETI, 2006). Essa considerada bactericida em concentrações superiores a 250% (NETO et al., 1997), sendo aplicada em estado puro na cicatrização de feridas contaminadas (WEISS et al., 1984; MARTINEZ et al., 1986; RAISER; BALDKE, 1987; PRATA et al., 1988; SILVA et al., 1996).

Mota et al. (2003) verificaram a ausência de crescimento de microorganismos em soluções glicosadas a 300%, com ou sem antibiótico. Na análise histológica da camada muscular do intestino delgado submersa nessa solução, foi possível observar um leve aumento do espaço intersticial, havendo uma pequena degradação de algumas células. No entanto, notou-se a integridade mantida de grande parte da área analisada, sem alterações aparentes da morfologia celular.

Gonçalves et al. (2003) compararam o uso de córneas de cães previamente conservadas em solução supersaturada de açúcar 300% e glicerina 98% em ceratoplastias lamelares homólogas e não presenciaram diferenças marcantes entre o aspecto macroscópico das córneas. Segundo Rappeti (2006), é viável a utilização

da solução supersaturada de açúcar 300% na conservação de implante ósseo homólogo de costela, como opção para a reconstituição da parede costal de gatos.

Bariani Junior et al. (2007) analisaram morfologicamente membranas biológicas em diferentes meios de conservação e constataram que a solução supersaturada de açúcar a 300% se assemelha à glicerina a 98%, quanto à manutenção estrutural das membranas.

2.3 Peritônio

O peritônio é uma serosa que reveste a cavidade abdominal dos animais; é constituída por uma única camada de células mesoteliais achatadas sustentadas por tecido fibroelástico que se une de acordo com a posição das estruturas subjacentes (DYCE; SACK; WENSING, 2004)

O peritônio bovino tem sido utilizado em estudos experimentais apresentando resultados satisfatórios. Assim, utilizou-se essa membrana conservada em glicerina 98% em cães nos seguintes estudos: na substituição de retalho diafragmático (DALECK et al. 1988), na reparação de hérnia perineal (DALECK et al., 1992), na tenoplastia do tendão calcâneo comum (COSTA NETO et al., 1999), na artroplastia acetábulo-femoral (RODASKI et al., 2002). Ainda em cães, o peritônio bovino foi conservado em glutaraldeído 2,5% na substituição de parte da artéria femoral (SARAC et al., 2011). Também se aplicou esse implante em coelhos, no tratamento de fistulas uretrocutâneas (AYYILDIZ et al. 2006), na cistoplastia experimental (OLIVEIRA et al., 2008) e no tratamento de feridas por queimadura (BUSNARDO et al., 2009).

Em ratos, testou-se a viabilidade do peritônio bovino, como alternativa para tela cirúrgica implantada na parede abdominal, visto que ele pode ser colhido e submetido à mesma técnica de preparo consagrada para o pericárdio bovino, além de fornecer uma área maior de tecido aproveitável e adaptável às diversas situações da prática cirúrgica (BASTOS et al., 2005).

Barbosa et al. (2012) analisaram morfologicamente o peritônio de ovinos da raça Santa Inês conservados por 15, 30, 60 e 90 dias em glicerina 98% e a fresco, e

concluíram que ambas as amostras, a fresco ou conservadas, apresentaram um único tipo de tecido, o tecido conjuntivo denso não modelado.

O peritônio da paca foi avaliado por Camargo (2009), por meio de estudos relativos à sua morfologia microscópica e ultraestrutural, acrescidos dos testes de resistência à tração quando conservadas em glicerina a 98%. O autor observou que a membrana avaliada constituía-se de mesotélio apoiado em tecido conjuntivo, que variava de frouxo a denso, e este se apresentava modelado e não modelado; este arranjo entremeava células adiposas agrupadas em maior ou menor concentração. Verificou ainda que o comportamento mecânico do peritônio desse roedor, quanto a resistência à tração, assemelha-se ao peritônio bovino conservado também em glicerina 98%.

2.4 Cicatrização Tecidual

O processo de cicatrização tecidual, essencial para a sobrevivência dos seres vivos, de um modo geral, é um fenômeno que pode ser apresentado, subdividido, 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 (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; 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 da pele, ocorrem as seguintes etapas: no período inicial de 24 horas, surgem neutrófilos nas margens da incisão, que se deslocam para o coágulo de fibrina; e, entre 24 a 48 horas, projeções de células epiteliais das bordas migram e crescem ao longo das margens cortadas, depositando componentes da membrana basal 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 e o tecido de granulação invade progressivamente o espaço da incisão. Nesse momento, aparecem fibras de colágeno nas margens da incisão que, inicialmente, possuem orientação vertical, e não estabelecem pontes sobre essa incisão. Até o quinto dia, o espaço incisional é preenchido por tecido de granulação e a neovascularização torna-se máxima. As fileiras de colágeno ficam mais abundantes e começam a formar pontes na incisão. (TURNER; McILWRAITH, 1985; COTRAN et al., 2000).

Referindo-se ainda a cicatrização da pele, 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. A força elástica da ferida aumenta posteriormente, mas podem ser necessários meses para que a recuperação tecidual consiga sua força máxima.

Na cicatrização por primeira intenção, a reação celular e tecidual varia conforme o fio cirúrgico utilizado para reparar a ferida. Neste estudo, empregou-se o náilon que além de sua ampla aplicação, causa mínima reação tecidual sendo relativamente inerte quando implantado nos tecidos (TURNER; McILWRAITH, 1985; RAHAL et al., 1997; BOOTHE, 2007).

2.5 Estereologia

Utiliza-se a estereologia na determinação de parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes bidimensionais, aplicando-se a geometria e a estatística. A maior parte dos dados para os estudos estereológicos são obtidos diretamente da microscopia óptica e eletrônica (PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2001).

Os dois conceitos básicos da estereologia são: determinações “sem desvio” (sem viés) e pouca variabilidade. Para a realização do estudo estereológico é necessário a utilização de amostras sistematicamente e uniformemente aleatórias onde todos os campos de amostragem tem a mesma probabilidade de serem selecionados, desde o momento da coleta até o processamento final dos dados (LACERDA, 2006).

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

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.

Lopes-Paulo (2002) empregou a estereologia para quantificar elementos estruturais de forma precisa das paredes do cólon e reto, uma vez que a avaliação anatomopatológica destas estrutura utilizam comumente critérios subjetivos como por exemplo a classificação de determinadas alterações em "leves, moderadas ou intensas". Concluiu em seu estudo que a estereologia é um método de quantificação confiável, traduzindo numericamente os resultados de trabalhos experimentais, devendo o seu emprego ser considerado quando da realização de estudos que necessitem a comparação de alterações estruturais, quer seja em animais ou em humanos.

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 estudados as glândulas (epitélio e luz) e o estroma, determinando-se as densidades de volume, de superfície e de comprimento. Os resultados obtidos corroboraram com estudos prévios que demonstraram a importância de parâmetros quantitativos no diagnóstico das doenças do endométrio, oferecendo novos parâmetros estereológicos para esta análise (AVVAD-PORTARIL et al., 2003).

Thiel (2006) analisou quantitativamente com método estereológico a densidade de fibras colágenas formadas após implante na parede abdominal de ratos de quatro tipos de materiais: silicone, submucosa intestinal suína, polipropileno e poligalactina. Aos 7 dias de pós-operatório, todos os materiais induziram resposta inflamatória moderada. Aos 30 e 90 dias menor reação do poligalactina, seguida de resposta moderada do polipropileno e silicone e severa resposta inflamatória da submucosa intestinal suína.

Turiel (2011) avaliou a resposta inflamatória no sistema nervoso central pelo método estereológico “fractionator”, em camundongos neonatos com encefalite induzida pelo vírus da dengue, e concluiu que a resposta imune inata está associada a um maior aumento do número de microglias, do que de astrócitos reativos, sendo essa mudança dependente da camada e região investigada.

A estereologia também foi utilizada por Shirazi, Noorafshan e Serhan (2012) no estudo comparativo do processo cicatricial por meio da resposta inflamatória de diferentes fios de sutura no reparo da hipospadia em ratos. Os autores concluíram que o poliglecaprone 25 apresentou menor infiltração de linfócitos, maior número de vasos e um maior lúmen uretral.

3.OBJETIVO

Objetivou-se comparar o peritônio da paca, conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% e conservado em glicerina a 98%, quando implantadas na parede abdominal de ratos, no que se refere à biocompatibilidade, capacidade de cicatrização e possíveis complicações, por meio de análises:

- clínicas,
- macroscópicas,
- histológicas,
- estereológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Foram utilizados 60 ratos, machos, da linhagem Wistar pesando entre 150 e 200 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de 30cm x 20cm x 18cm localizadas no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Unesp, Câmpus de Jaboticabal, e receberam ração e água à vontade.

Os animais foram divididos de acordo com os tratamentos em três grupos experimentais: GI – grupo controle (n=20), GII - grupo peritônio conservado em solução supersaturada de açúcar de cana-de-açúcar a 300% (n=20) e GIII – grupo peritônio conservado em glicerina a 98%; destes, dividiu-se cada grupo (n=20) em quatro subgrupos (n=5) referentes ao momento da eutanásia para avaliações macroscópicas e microscópica: M7 – aos 7 dias, M15 – aos 15 dias, M30 – aos 30 dias, M60 – aos 60 dias de pós-operatório.

4.2 Aquisição da membrana de peritônio da paca

O peritônio parietal foi retirado de pacas utilizadas em outros experimentos em andamento concomitantemente a este. Dessa forma, não foi necessária a realização da eutanásia de animais apenas para a obtenção do material para esta pesquisa.

Os animais foram provenientes do plantel de pacas do setor de Animais Silvestres da FCAV, Unesp, que é registrado no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, como criatório de espécimes da fauna brasileira para fins científicos (cadastro de registro - 482508) – ANEXO 1.

Assim, logo após a eutanásia, o animal que já se encontrava no Laboratório de Anatomia da FCAV, Unesp, foi posicionado em decúbito dorsal sobre a mesa de dissecação e mediante incisão pré-retroumbilical na linha mediana a cavidade abdominal foi acessada.

Após a exposição da face interna da parede abdominal, que é revestida por peritônio parietal em toda sua extensão, iniciou-se a colheita desta membrana, descolando-a cuidadosamente de ambas as paredes abdominais (Figura 1).



Figura 1. Imagem fotográfica de uma paca adulta em decúbito dorsal na qual se observa o peritônio parietal (P), sendo descolado da parede abdominal.

Em seguida à colheita, os fragmentos de peritônio foram lavados em solução fisiológica NaCl 0,9% para retirada de sujidades, sangue e tecidos que ficaram aderidos. Posteriormente, os seguimentos peritoniais, direito e esquerdo, foram divididos em duas porções e cada uma delas foi acondicionada em frasco de vidro distinto, um contendo a solução supersaturada de açúcar a 300% e o outro contendo solução de glicerina a 98%. Os segmentos de membrana permaneceram totalmente imersos para conservação e armazenamento, sob temperatura ambiente, por período não inferior a 30 dias.

Segundo a metodologia empregada por Daleck et al. (1988), os fragmentos de peritônio foram removidos dos frascos 15 minutos antes de sua implantação, lavados abundantemente com solução fisiológica de NaCl 0,9% e imersos numa cuba estéril contendo a solução salina à temperatura ambiente para reidratação.

Para a preparação da solução supersaturada de açúcar a 300%, segundo metodologia empregada por Mazzanti et al. (2001), utilizou-se 300 gramas de açúcar cristalizado em 100 mililitros de água destilada, obtendo-se no final uma solução na proporção 3:1. Após 48 horas de imersão, a membrana foi colocada em nova solução de açúcar a 300% pois sua desidratação promove a diluição da solução inicial.

4.3 Procedimento Cirúrgico

4.3.1 Pré-operatório

Os animais foram submetidos a jejum pré-anestésico, alimentar de 12 horas e água “ad libitum”. Para o procedimento cirúrgico os ratos foram anestesiados com 1ml de quetamina 5% com 1ml de xilazina 2%, na dose de 0,2ml/100g de peso corporal pela via intramuscular.

Após 15 minutos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, onde realizou-se ampla tricotomia da região abdominal ventral, seguida da anti-sepsia de rotina com clorexidine 2% e álcool 70%.

4.3.2 Trans-operatório

Para o grupo controle (n=20) realizou-se incisão abdominal mediana e retirou-se um segmento elíptico da musculatura abdominal com suas aponeuroses, medindo 2 cm de comprimento por 1 cm de largura; em seguida realizou-se a rafia muscular com sutura contínua com fio de náilon 4-0. Utilizou-se sutura simples contínua na camada muscular. A redução do tecido subcutâneo foi realizada em ziguezague e a sutura de pele em “U” (Wolff). As etapas descritas estão ilustradas na Figura 2.

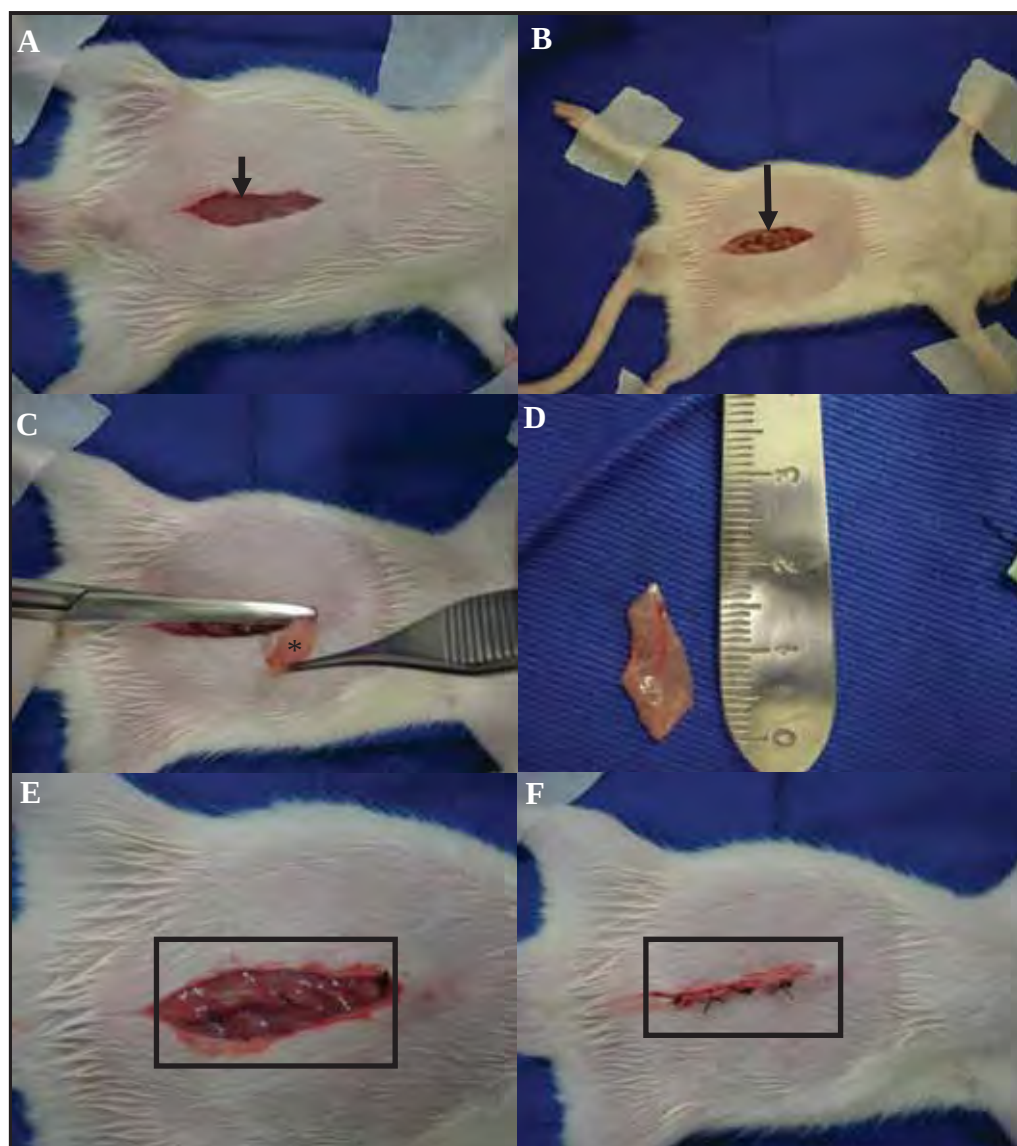


Figura 2. Imagens fotográficas de um rato macho da linhagem Wistar, pertencente ao grupo controle; em A e B se observa a incisão abdominal mediana (seta). Em C nota-se a retirada do segmento elíptico formado pelas diversas camadas de músculos e aponeuroses abdominais (*). Em D verifica-se a mensuração (cm) do segmento, em E verifica-se a sutura contínua dessa incisão com náilon 4-0 (retângulo) e em F a sutura de pele (retângulo).

Nos grupos GII e GIII, para a retirada do segmento formado pelas camadas musculares e aponeuroses abdominais, demarcou-se a região com um molde medindo 2cm x 2cm. Após a retirada desse segmento, promoveu-se sua substituição com um fragmento, do mesmo tamanho, de membrana de peritônio da paca, suturada com fio de náilon 4-0. Utilizou-se sutura simples contínua na camada muscular. A redução do tecido subcutâneo e a sutura de pele foram realizadas como de rotina. As etapas descritas estão ilustradas na Figura 3.

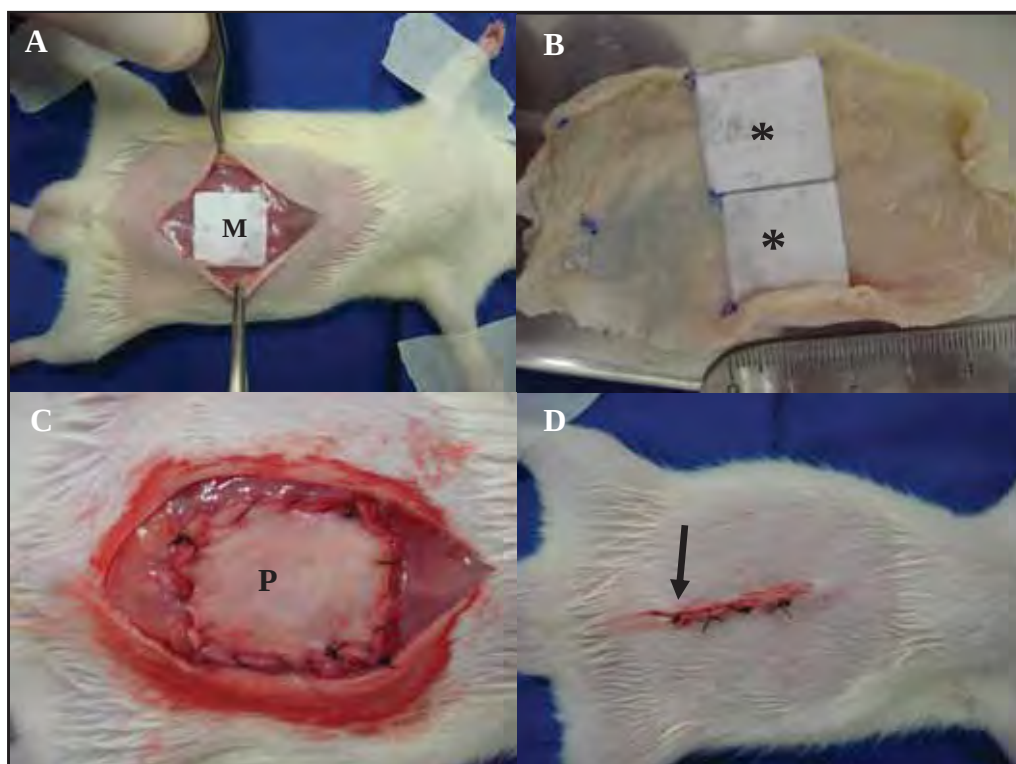


Figura 3. Imagens fotográficas de um rato Wistar macho do GII. Em A nota-se a demarcação do segmento músculo-aponeurótico abdominal com molde medindo 2cm x 2cm (M) e em B a demarcação do segmento na membrana de peritônio da paca (*). Em C nota-se a membrana suturada com fio de náilon 4-0 (P); em D, sutura da pele (seta).

4.3.3 Pós-operatório

Durante todo o período que antecedeu a colheita do material a ser analisado, observaram-se as seguintes características: aspecto da ferida cirúrgica, estado geral dos animais, ingestão de alimento e água e aspecto das fezes e urina.

Para avaliações macroscópicas e microscópicas, os ratos foram eutanasiados nos diferentes momentos (M7, M15, M30 e M60) mediante a administração de 100 mg/kg de quetamina associada com 20 mg/kg de xilazina por via IM, seguida por toracotomia e perfusão intracardíaca, primeiramente com uma solução heparinizada a 2% em tampão fosfato 0.1 M ph 7.4 e posteriormente fixada com Karnovsky modificado (glutaraldeído 3% e paraformol 1% em Tampão fosfato 0.1 M ph 7.4). A perfusão foi realizada em bomba Masterflex® com velocidade de 8 ml/ minuto.

4.4 Avaliações macroscópicas

A cavidade abdominal foi aberta e investigada quanto a ocorrência de aderências de órgãos, falha no implante, necrose, fístula, formação de abscesso e inflamação local.

4.5 Avaliações microscópicas

Foram removidos fragmentos com 9 cm² da interface implante/tecido nativo de todos os animais. Estes fragmentos foram acondicionadas em solução Karnovsky modificado tendo sido sustentadas por alfinetes em um pedaço de isopor e armazenadas em geladeira para posterior análise (Figuras 4).

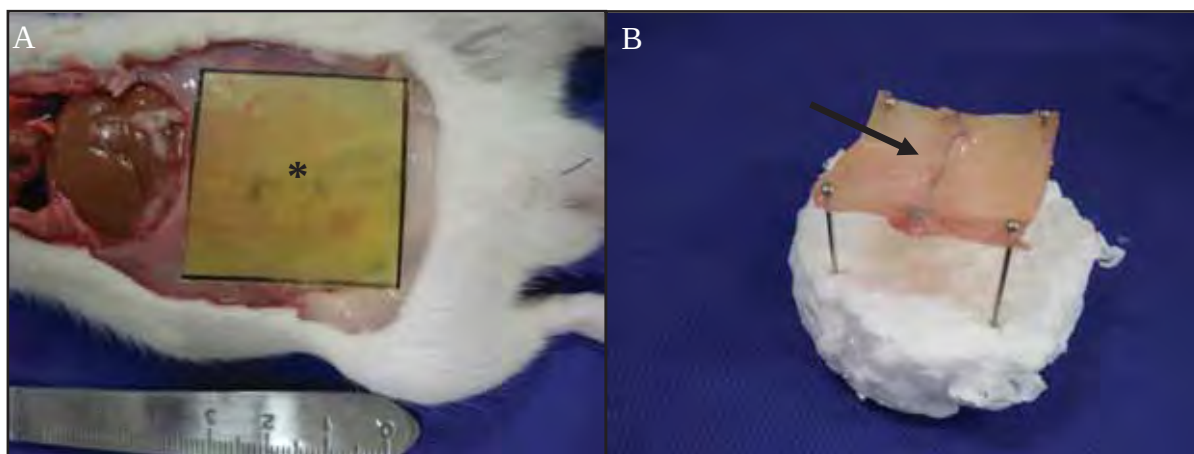


Figura 4. Imagens fotográficas de um rato Wistar do GI, macho. Em A, molde com 9cm² sobre a região abdominal contendo a interface implante com tecido nativo (*) e em B fragmento sustentado por quatro alfinetes presos em uma folha de isopor de 1.5 cm (seta).

Para a análise histopatológica, metade do material já fixado em Karnovsky foi incluído em Histosec[®] (Merck), sendo a inclusão e coloração realizada segundo Behmer, Tolosa e Freitas-Neto (1976). Para esta inclusão, 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, em que se procedeu a inclusão. A microtomia do material foi realizada em micrótomo automático (Leica-Germany, RM 2155¹), obtendo-se cortes de 5µm com auxílio de navalhas descartáveis, que foram fixados em lâminas e submetidos às colorações por Hematoxilina e Eosina (HE). Todas as preparações foram fotodocumentadas em microscópio de luz Leica DM 5000 B para análise morfológica.

A outra metade do material fixada em solução de Karnovsky modificado foi utilizada para o estudo estereológico. Cada amostra, correspondente a interface implante / tecido nativo, de cada animal, foi seccionada em 10 partes, resultando em pequenas frações de 0,3 cm de espessura cada; destas 10 selecionou-se aleatoriamente por tabela randomizada três fragmentos que foram lavados em solução tampão fosfato (0,1M, pH 7,4) durante oito dias consecutivos para retirada do excesso de fixador, posteriormente, realizou-se o processo de desidratação do material com álcool a 70%, seguido de sua conservação em álcool a 80%, sob refrigeração.

A etapa seguinte constituiu-se na infiltração do material em solução de Histoiresin¹ (Leica-Germany) e álcool a 80%, por aproximadamente quatro horas. Em seguida, cada pequena fração do material foi incluído em histomolde para a polimerização inicial em temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos e polimerização final em estufa sob temperatura de 37,5^oC, por uma semana. A microtomia deste material foi realizada em micrótomo automático (Leica, RM 2155) com auxílio de navalhas de vidro, obtendo-se seis cortes (três pares) de 2 µm por bloco com intervalos de 12 µm, estipulados previamente mediante experimento

¹ Leica Microsystems Nussloch GmbH. Heidelberger Str. 17-19. Germany.

piloto, o qual mensurou-se o tamanho da célula a ser avaliada. Depois de realizado este procedimento, os cortes foram fixados em lâminas e submetidos às colorações de HE segundo Behmer, Tolosa e Freitas-Neto (1976).

Ato contínuo, o material foi quantificado por meio de estudo estereológico do tipo disector físico e design “fractionator”, com auxílio do “Software Leica Application Suite”. Assim, dos seis cortes obtidos por bloco, apenas dois cortes (um par), aleatoriamente selecionados, foram utilizados como referência e “look up” para a avaliação comparativa. Destes cortes selecionados, padronizou-se, em aumento de 10x, a área de interesse contendo a região de interface implante / tecido nativo em cada corte e dividiu-a em 16 campos microscópicos de 40 x. Cinco campos sistematicamente aleatórios foram selecionados dentre estes 16 campos possíveis, sendo correspondentes em cada par, permitindo a contagem celular no mesmo campo visual. Todas as preparações foram fotodocumentadas em microscópio de luz Leica DM 5000 B¹ e inseridas no Microsoft Power Point para facilitar a comparação entre as lâminas referência e “look up”. Uma frame com 18cm x 11,5cm impressa em transparência, tamanho A4, foi colocada sobre a tela do computador para a contagem celular no modelo “Two way”, que consiste da leitura da lamina de referência para a lamina “look up” e vice versa. Foram avaliados o número total de mononucleares e de polimorfonucleares presentes do processo de reparação da parede abdominal.

Obteve-se o resultado total das células mononucleares e polimorfonucleares com base no sistema “fractionator”, o qual representa o número total das células inflamatórias contadas pelo inverso das frações amostradas (GUNDERSEN, 1998; TURIEL, 2011), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$N = \frac{\sum Q^-}{2} \cdot bsf^{-1} \cdot ssf^{-1} \cdot asf^{-1}$$

Onde:

N = número total de células;

Q⁻ = Número de células por área de interesse;

¹ Leica Microsystems Nussloch GmbH. Heidelberger Str. 17-19. Germany.

bsf: fração do bloco, no estudo = $3/10$ (de 10 pequenos fragmentos de cada amostra selecionou-se três);

ssf: fração de secção, no estudo = $4/30.000$ (de 30.000 μm que é a espessura total dos pequenos fragmentos apenas 4 μm foram utilizados);

asf: fração de área, no estudo = $5/16$ (de 16 campos, selecionou-se 5).

4.6 Análise Estatística

Para o estudo estereológico das variáveis, o número total de partículas (N) de cada perfil (mononuclear e polimorfonuclear) foi analisado com o uso do delineamento experimental inteiramente ao acaso com os tratamentos no esquema fatorial (GI, GII, GIII e M7, M15, M30, M60) com cinco repetições para cada cruzamento dos níveis dos fatores.

A análise de variância foi realizada segundo o teste de Tuckey 5% de probabilidade, pelo software MINITAB, da FCAV, Câmpus de Jaboticabal, UNESP.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação Trans-cirúrgica

Durante a colheita do peritônio da paca observou-se que este possuía, macroscopicamente, uma maior ou menor quantidade de tecido adiposo de acordo com sua localização. Na região mais ventral, próximo a linha Alba, o peritônio era mais delgado e livre de tecido adiposo, na região mais dorsal, próximo a coluna vertebral, era espesso com grande quantidade de tecido gorduroso. No ato cirúrgico, utilizou-se aleatoriamente nos animais um peritônio delgado ou espesso.

Observou-se ainda que o peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% apresentou melhor maleabilidade após a reidratação quando comparado com a conservação em glicerina a 98%, que manteve o peritônio mais duro.

5.1 Avaliação Clínica

Quanto ao aspecto da ferida cirúrgica, o grupo controle (GI) não apresentou alterações dignas de nota. Do GII, 10 animais apresentaram aumento de volume abdominal (Figura 5A); um destes apresentou aos cinco dias e nove animais aos nove dias de pós-operatório. Destes 10 animais, cinco apresentaram pequenas fístulas cutâneas com exposição da membrana, iniciada aos seis dias (um animal), 12 dias (dois animais) e 17 dias (dois animais) de pós-operatório (Figura 5B).

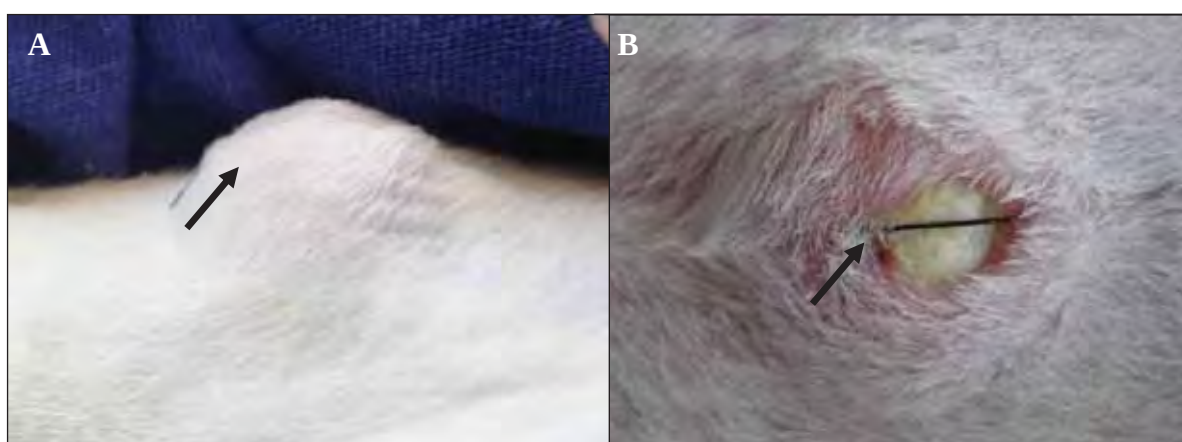


Figura 5. Imagens fotográficas de um rato Wistar pertencente ao GII. Em A, nota-se aos nove dias de pós-operatório, abaulamento abdominal(seta) e em B, fistulação na pele aos 12 dias de pós-operatório (seta).

Do grupo conservado em glicerina (GIII), 13 animais apresentaram aumento de volume abdominal aos nove dias de pós-operatório que fistulou aos 12 dias de pós-operatório, seguido por formação de tecido de granulação após sete dias (Figura 6), um animal apresentou área de necrose na pele com posterior expulsão da membrana (Figura 7) e um animal apresentou evisceração o qual teve que ser sacrificado (Figura 8).

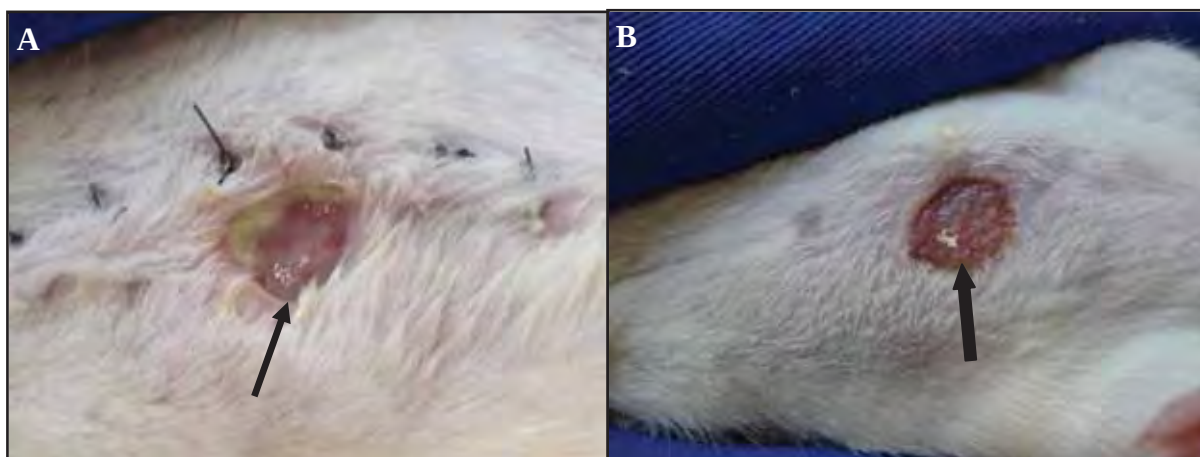


Figura 6. Imagens fotográficas de um rato Wistar pertencente ao GIII. Em A aos 12 dias de pós-operatório ocorreu fistulação de pele (seta) e em B no mesmo animal nota-se a formação de tecido de granulação (seta) sete dias após a fistulação.

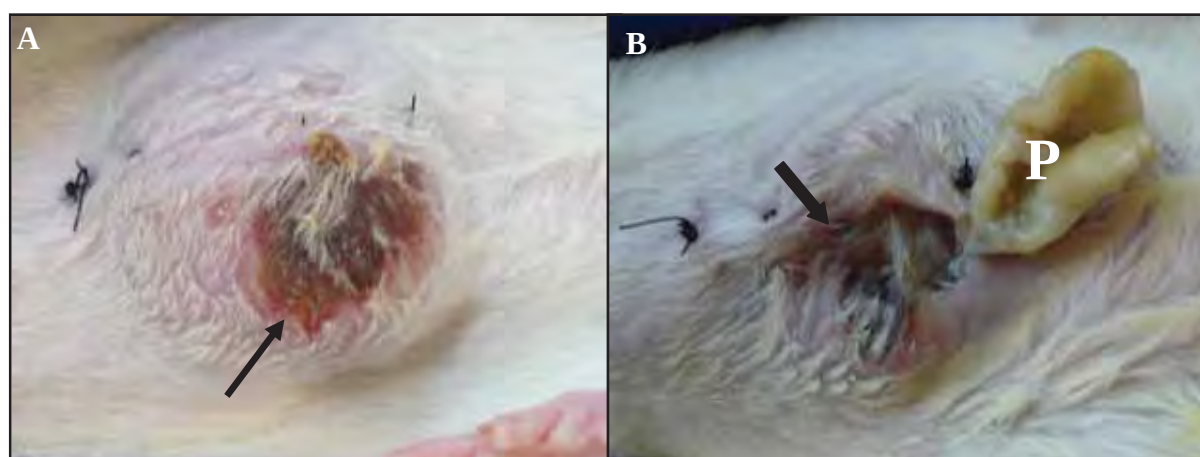


Figura 7. Imagens fotográficas de um rato Wistar pertencente ao GIII. Em A aos 12 dias de pós-operatório, nota-se presença de abaulamento e área de necrose na pele (seta). Em B demonstra-se a formação de fístula (seta) com posterior expulsão da membrana (P) implantada.



Figura 8. Imagem fotográfica de um rato Wistar pertencente ao GIII que apresentou evisceração aos 12 dias de pós-operatório (seta).

5.2. Avaliação Macroscópica

5.2.1 Grupo Controle (GI)

Observou-se aderências do omento ao fio de sutura em todos os animais eutanasiados nos diferentes momentos (M7, M15, M30 e M60) (Figura 9).



Figura 9. Imagem fotográfica do abdome de um rato Wistar, macho, GI, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde se nota a presença de aderência do omento no fio de sutura (seta).

5.2.2 Grupo Peritônio da Paca conservado em açúcar a 300% (GII)

Foram observados nos animais do GII eutanasiados no M7 que 100% apresentaram aderência na área do implante com o omento (Figura 10A), 20% dos animais avaliados apresentavam fístula na pele e 100% apresentaram boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal (Figura 10B).

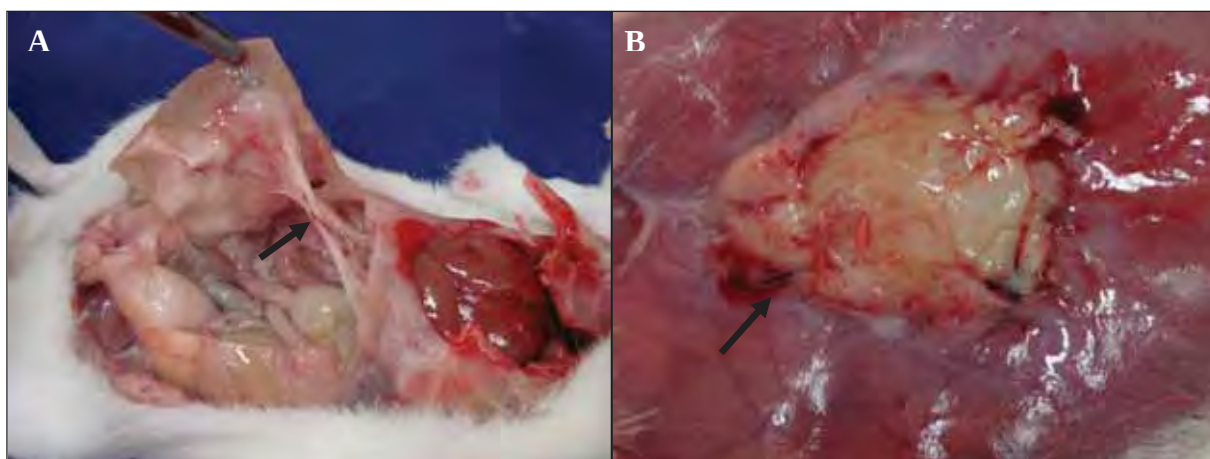


Figura 10. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, pertencente ao GII eutanasiado aos sete dias de pós-operatório, onde se nota em A aderência na área do implante com o omento (seta) e em B membrana cicatrizada à musculatura (seta).

No M15, 100% dos animais apresentaram aderência na área do implante com o omento (Figura 11A), 20% mostrou aumento de volume e 100% apresentaram boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal (Figura 11B).

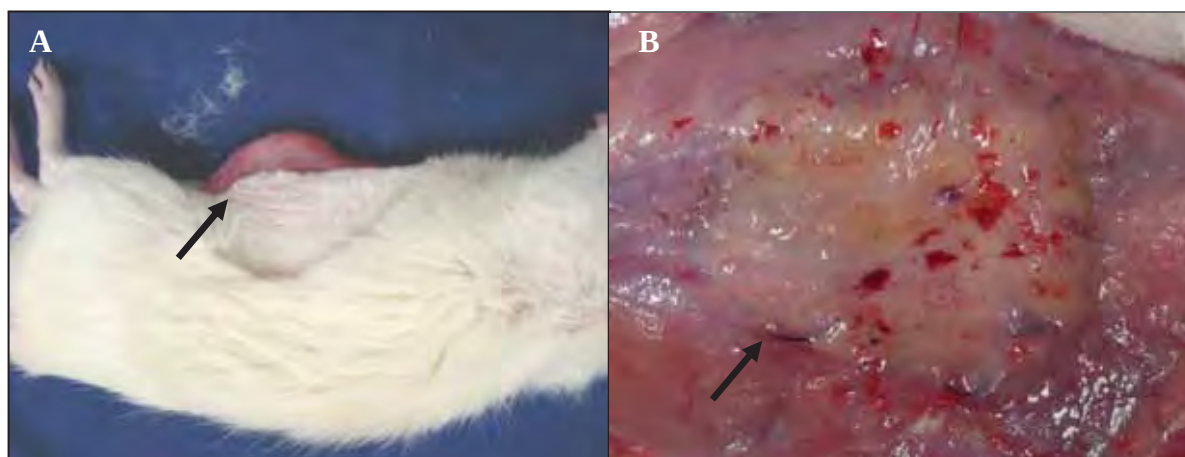


Figura 11. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, pertencentes ao GII eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório onde se nota em A, aumento de volume abdominal (seta) e em B, boa cicatrização membrana-musculatura (seta).

No M30, 100% dos ratos eutanasiados apresentaram aderência da área do implante com o omento, 20% possuíam abscesso encapsulado (Figura 12A), 20% apresentavam seroma. Todos os animais tinham boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal aos 30 dias (Figura 12B).

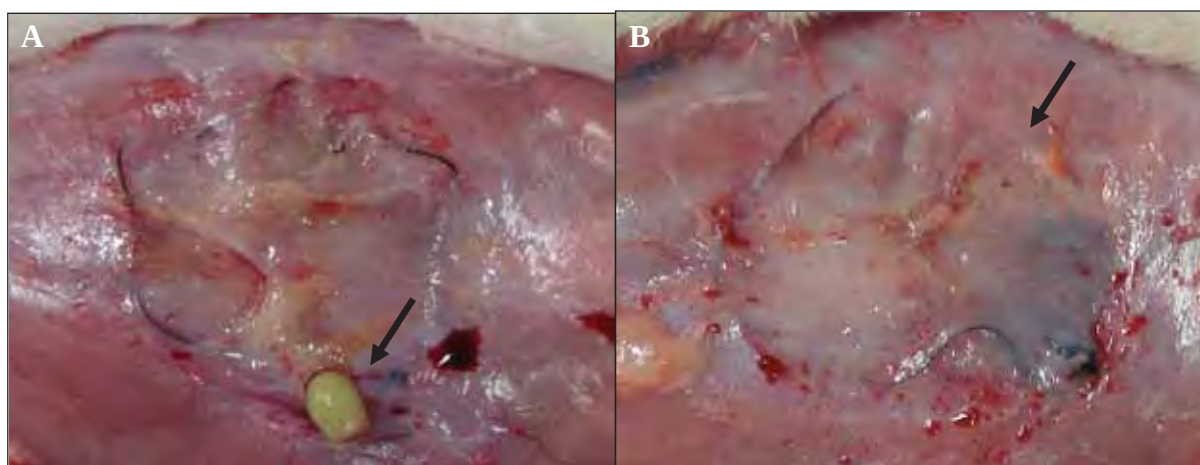


Figura 12. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, pertencentes ao GII eutanasiados aos 30 dias de pós-operatório, onde se nota em A, presença de abscesso na área do implante (seta) e em B, a boa cicatrização da interface membrana/musculatura (seta).

No M60, 100% dos ratos apresentaram pouca aderência do implante com o omento (Figura 13A), 100% apresentaram mudança na forma da membrana, sendo

difícil até delimitar suas margens com a musculatura (Figura 13B) e 100% visibilizava-se boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal.

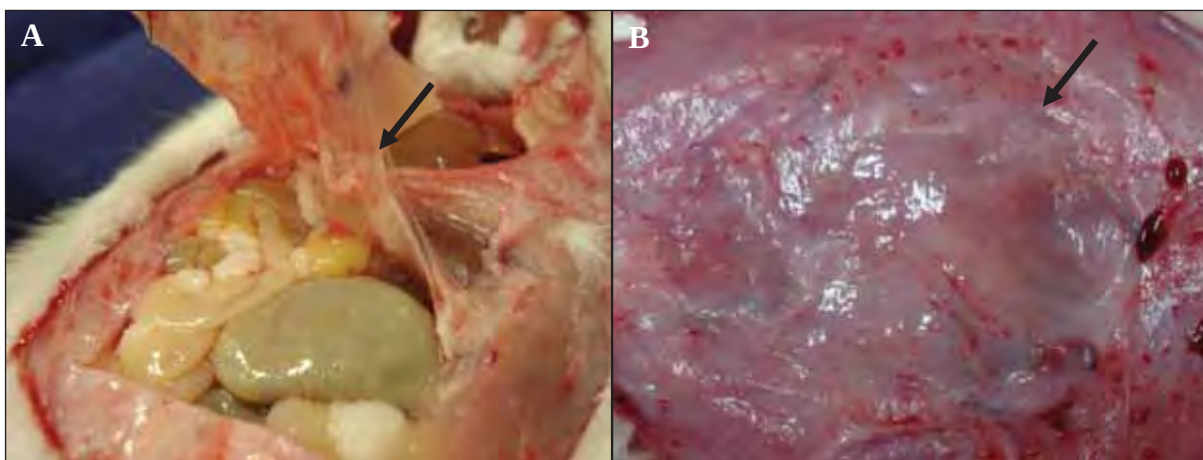


Figura 13. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, pertencente ao GII eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde, nota-se em A, a presença de pouca aderência do implante com o omento (seta) e em B, a dificuldade em delimitar as margens da membrana com a musculatura (seta).

5.2.3 Grupo Peritônio da Paca conservado em glicerina 98% (GIII)

Verificou-se nos animais eutanasiados do GIII no M7 que 100% deles apresentaram aderência na área do implante com o omento (Figura 14A), 100% apresentavam abaulamento na pele e seroma (Figura 14B). Dos animais avaliados aos sete dias de pós-operatório, 100% apresentaram boa cicatrização entre a membrana e musculatura do animal.

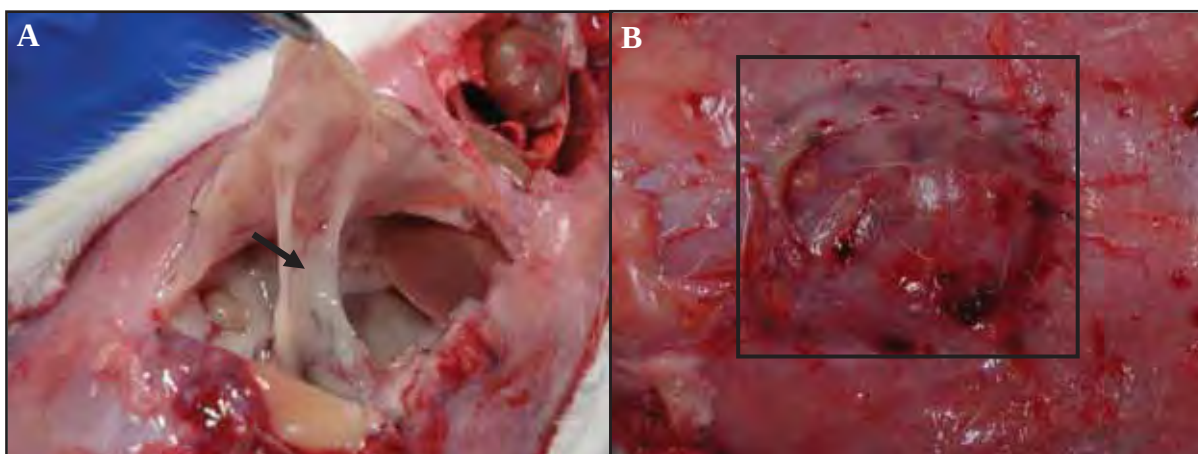


Figura 14. Imagens fotográfica do abdome de rato Wistar, macho, pertencente ao GIII eutanasiado aos sete dias de pós-operatório onde, nota-se em A aderência na área do implante com o omento (seta) e em B a presença de seroma (retângulo).

No M15, observou-se aderência na área do implante com o omento em 100% dos animais (Figura 15A), 40% apresentaram abscesso com área de flutuação e conteúdo purulento viscoso (Figura 15B) e em 100% visibilizou-se boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal (Figura 15B).

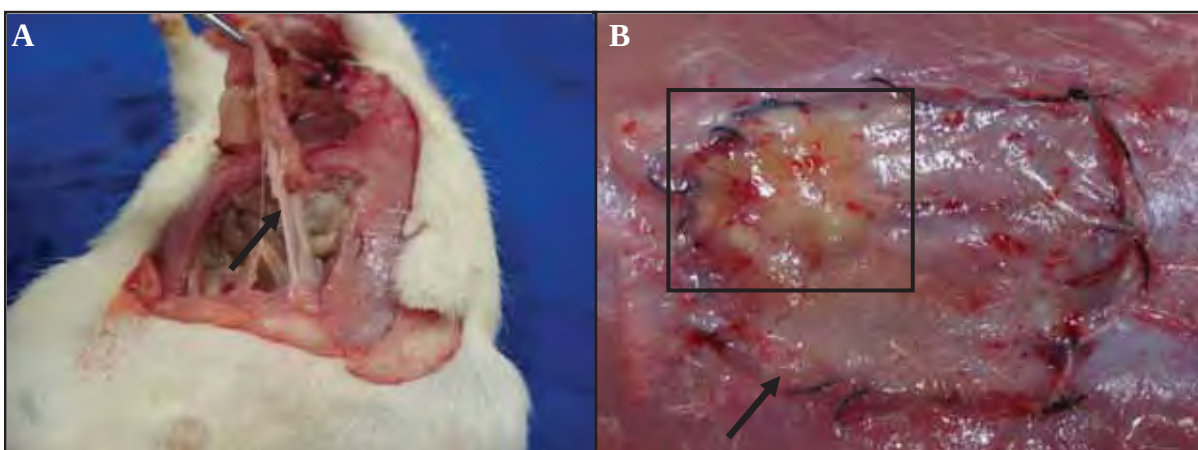


Figura 15. Imagens fotográficas do abdome de ratos Wistar, machos, GIII, eutanasiados aos 15 dias de pós-operatório onde, nota-se em A, aderência na área do omento com a membrana (seta) e em B, a presença de abscesso (quadrado) na área do implante e boa cicatrização membrana-musculatura (seta).

No M30, 100% dos ratos apresentaram aderência da área do implante com o omento (Figura 16A), 20% dos animais sacrificados apresentaram abscesso encapsulado (Figura 16B) e 100% apresentaram boa cicatrização entre membrana-musculatura do animal (Figura 16B).

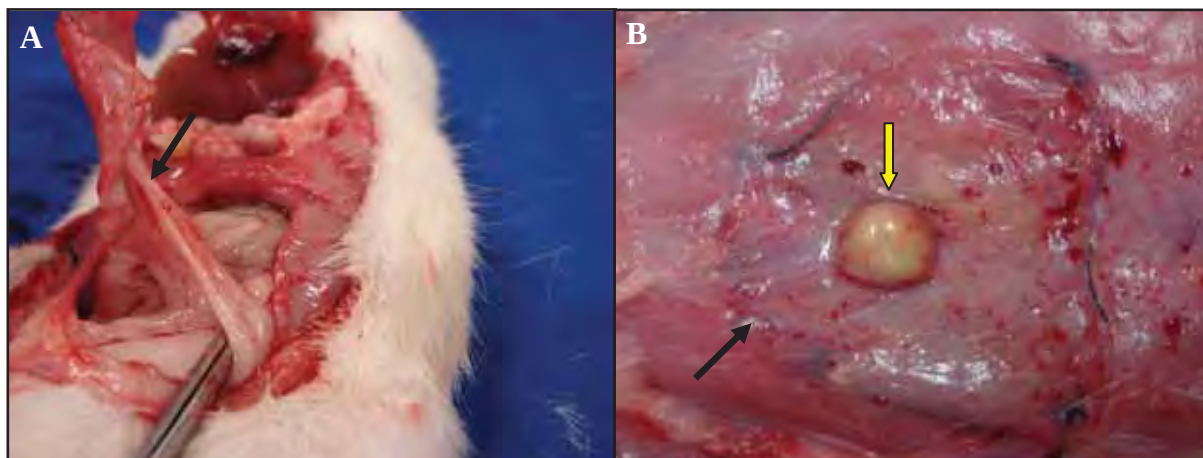


Figura 16. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório onde nota-se em A, a presença de aderência do omento no implante (seta) e em B, a ocorrência de abscesso encapsulado (seta amarela) e boa cicatrização membrana-musculatura (seta preta).

No M60, verificou-se que 20% dos animais apresentaram aderência da área do implante com o omento (Figura 17A) e visibilizou-se em 100% dos ratos boa cicatrização entre membrana e musculatura do animal e mudança na forma da membrana (Figura 17B).

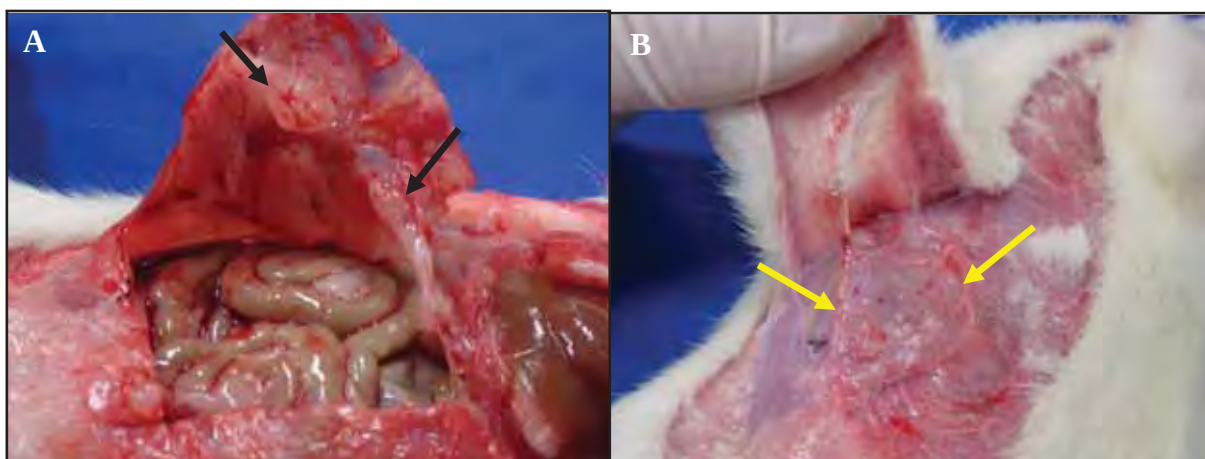


Figura 17. Imagens fotográficas do abdome de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório onde nota-se em A, aderência do omento com o implante (setas) e em B, boa cicatrização membrana-musculatura (setas).

5.3. Avaliação Histológica

5.3.1 Grupo Controle (GI)

Em todas as amostras referentes ao GI em todos os momentos (M7, M15, M30 e M60), observou-se, sob microscopia de luz, na região da retirada do segmento elíptico do músculo aponeurótico com todas as camadas e posterior sutura, presença de tecido fibroso separando as camadas musculares (Figura 18) e a presença de infiltrado inflamatório misto ao redor do fio de sutura, com predominância de células mononucleares e raros polimorfonucleares (Figura 19).

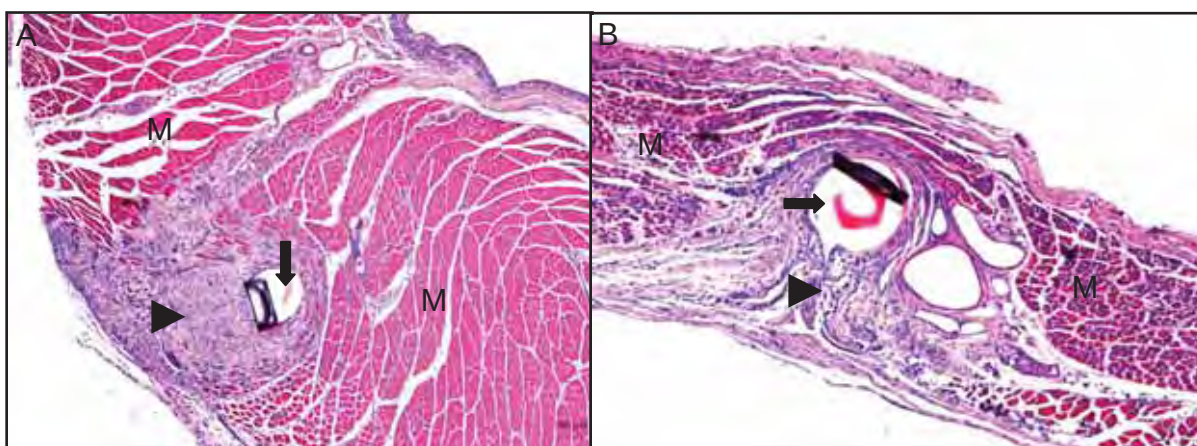


Figura 18. Fotomicrografias de fragmento abdominal do Grupo controle (GI) de rato Wistar, macho. Em A aos 7 dias de pós-operatório e em B aos 60 dias de pós-operatório, nota-se a presença de tecido fibroso (►) separando as camadas musculares (M). Presença do fio de sutura (seta) (Paraplast, HE, 5X).

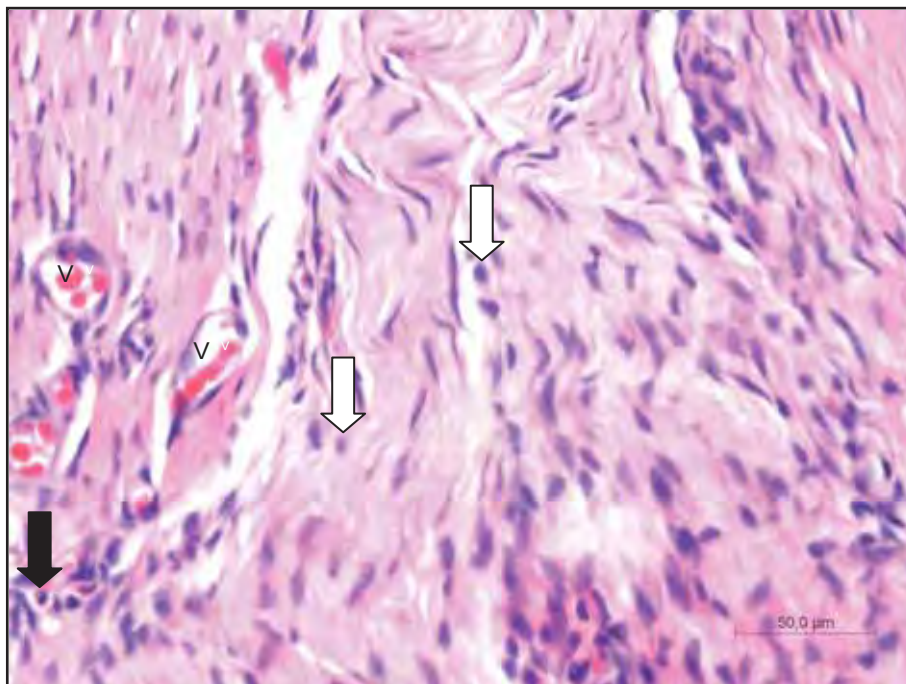


Figura 19. Fotomicrografia de fragmento abdominal do Grupo controle (GI) de rato Wistar, macho aos 60 dias de pós-operatório, nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e linfócitos (seta branca), vasos (V) e feixes musculares (M). (Paraplast, HE,40x).

5.3.2 Grupo Peritônio da Paca conservado em açúcar 300% (GII)

Nas amostras relativas aos implantes de peritônio do GII no M7 observadas à microscopia de luz, verificou-se no local em que o implante foi afixado, área de fibrose separada do tecido muscular e presença de tecido adiposo, acompanhado de grande infiltrado inflamatório mononuclear e raros polimorfonucleares (Figura 20).

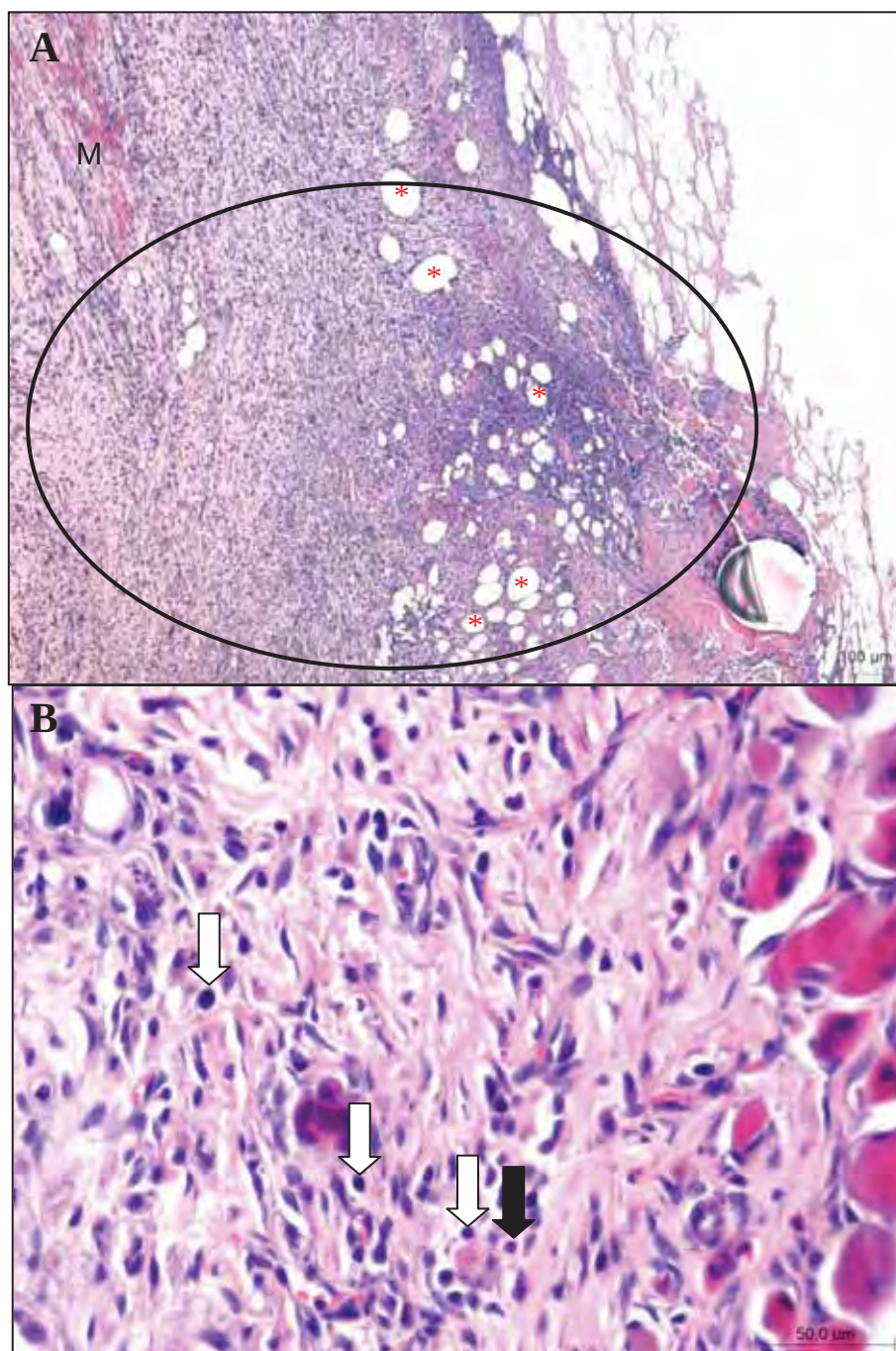


Figura 20. Fotomicrografias da região de implante peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, eutanasiado aos 7 dias de pós-operatório. Em A, nota-se área de fibrose (elipse), próxima ao fio de sutura (F), separada do tecido muscular (M) e imagem negativa de tecido adiposo (*). Em B nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca) (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

No M15, observou-se área de fibrose separada do tecido muscular, presença de tecido adiposo, acompanhado de moderado infiltrado inflamatório misto predominantemente por células mononucleares ao redor do fio de sutura e do implante (Figura 21).

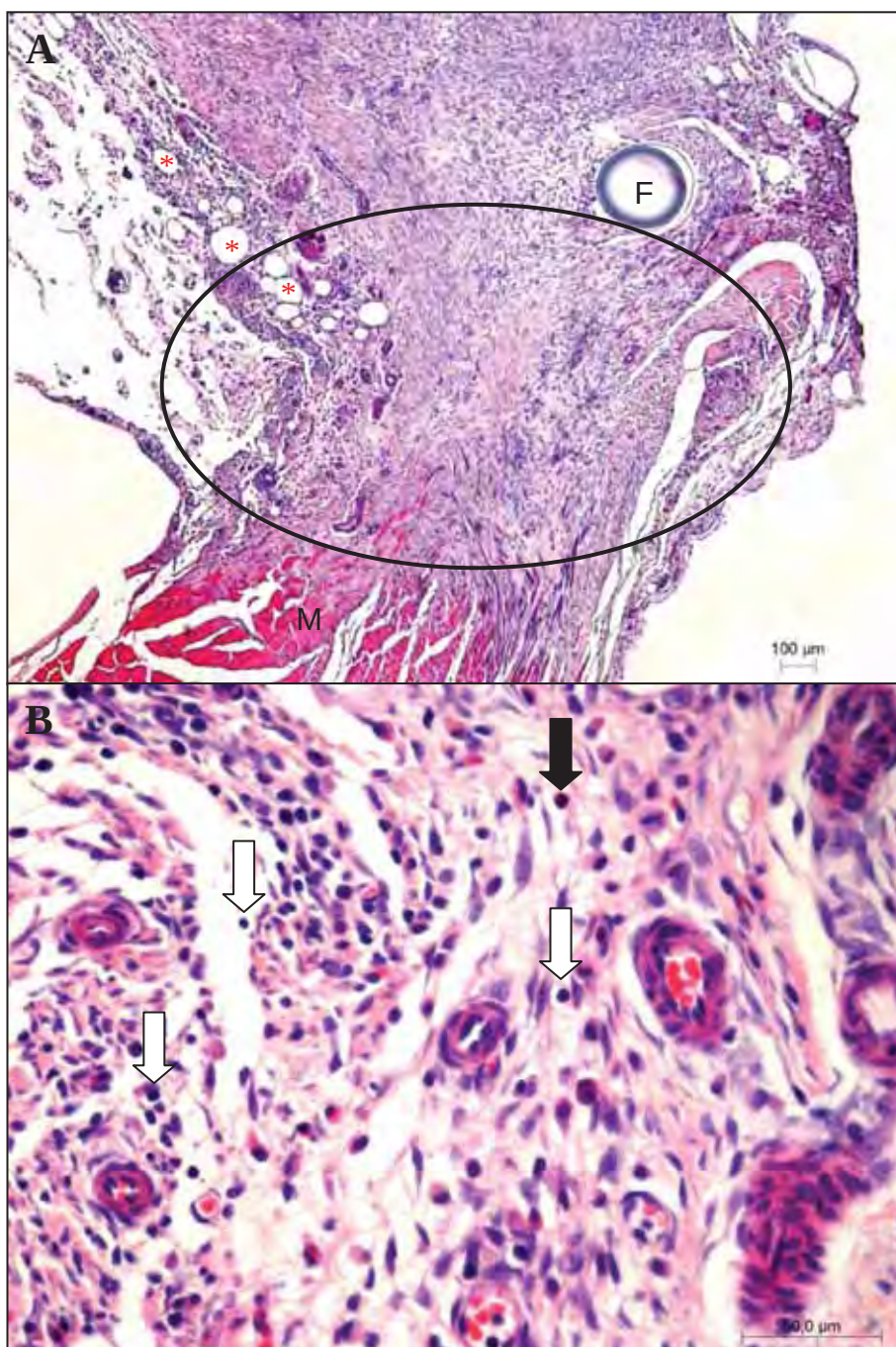


Figura 21. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório. Em A nota-se área de fixação do implante, o qual verifica-se imagem negativa de tecido adiposo (*) e a camada muscular (M) unida por um tecido fibroso (elipse), próximo ao fio de sutura (F) e em B, em maior aumento, nota-se a presença de infiltrado inflamatório misto, polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca), (Paraplast, HE, 5X e 40X respectivamente).

Nas amostras relativas dos animais do M30, constatou-se no local em que o implante foi afixado, a presença de moderado tecido fibroso justaposto à camada muscular (Figura 22 A). Nota-se também a presença de infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 22 B).

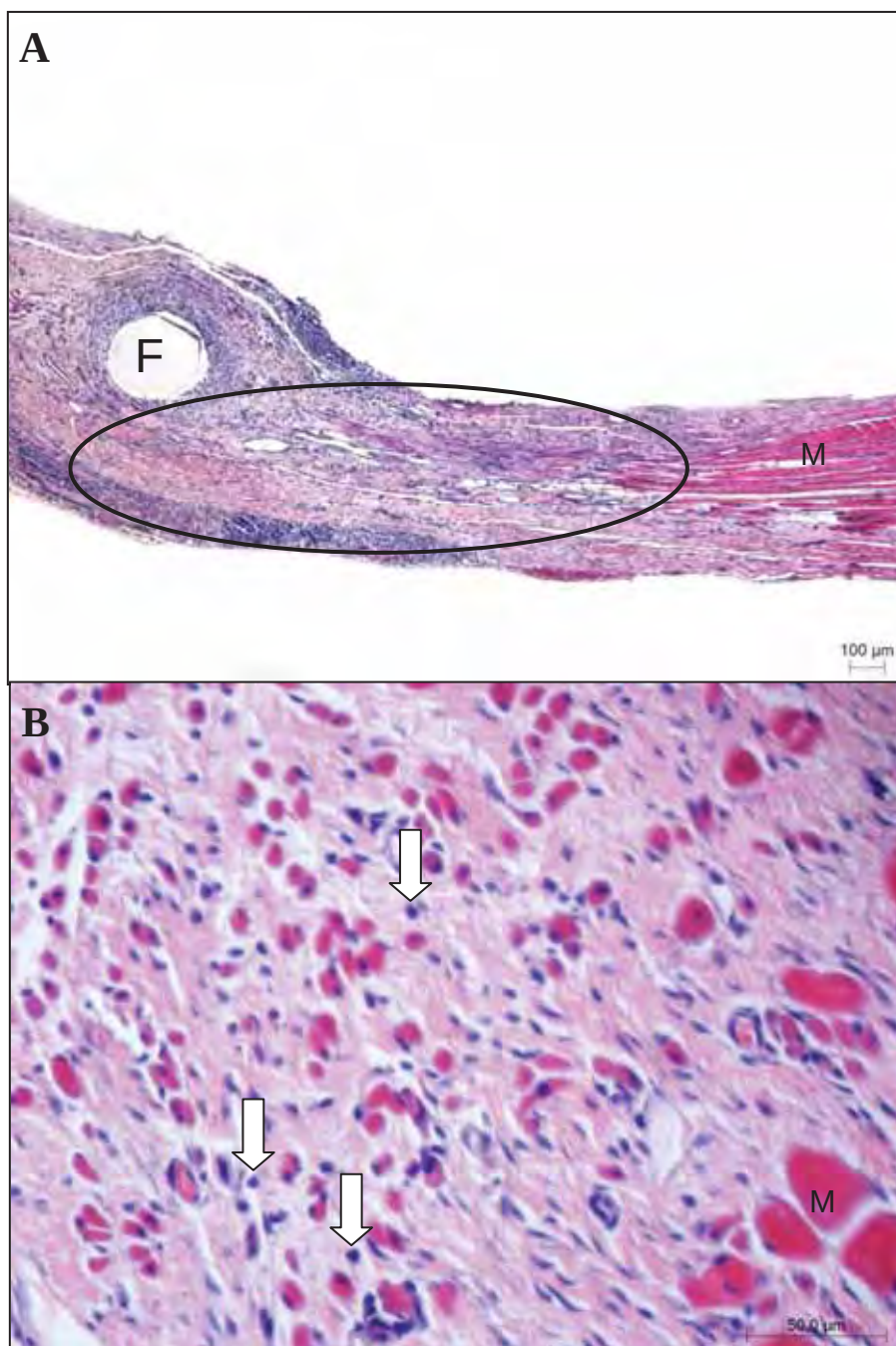


Figura 22. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório. Em A, nota-se a presença de moderado tecido fibroso (elipse) justaposto à camada muscular (M), próximo ao fio de sutura (F). Em B verifica-se a presença de infiltrado inflamatório mononuclear (seta), entremeado ao tecido muscular (M) (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

No M60, verificou-se na interface implante com tecido nativo a presença de abundante tecido fibroso entremeado a camada muscular (Figura 23 A) acompanhado de discreto infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 23 B).

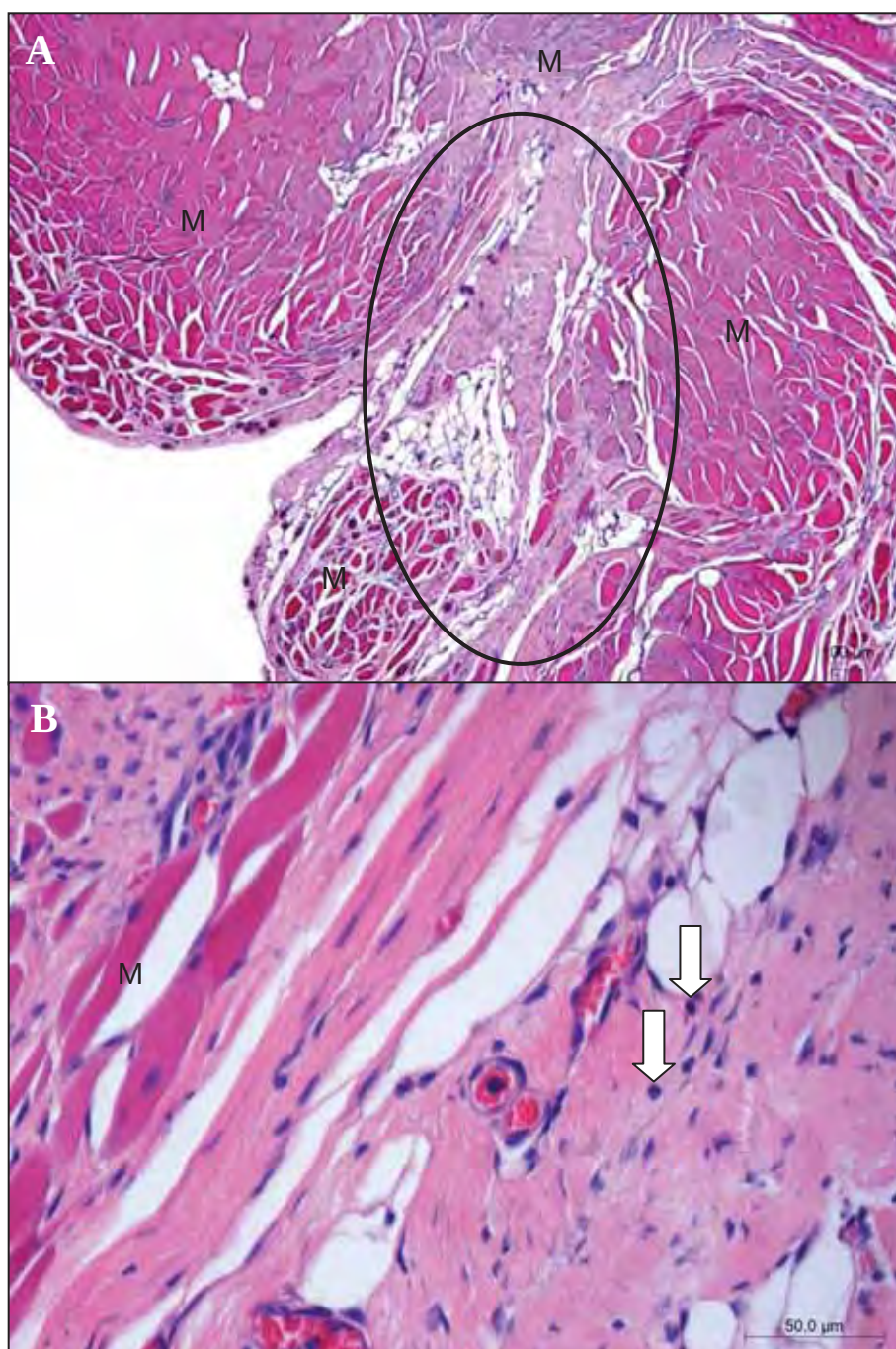


Figura 23. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GII, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório. Em A nota-se, no local onde o implante foi afixado, a presença de tecido fibroso (elipse) entremeado ao tecido muscular (M). Em B, infiltrado inflamatório mononuclear (seta) junto ao tecido fibroso (área rosea) e muscular (M), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

5.3.2 Grupo Peritônio da Paca em glicerina 98% (GIII)

Nas amostras relativas aos implantes de peritônio da paca, dos animais no M7, observadas à microscopia de luz, verificou-se no local em que o implante foi afixado a presença de tecido adiposo, descontinuidade das camadas musculares unidas por tecido fibroso acompanhado de moderado infiltrado inflamatório misto com predominância de mononucleares e raros polimorfonucleares (Figura 24).

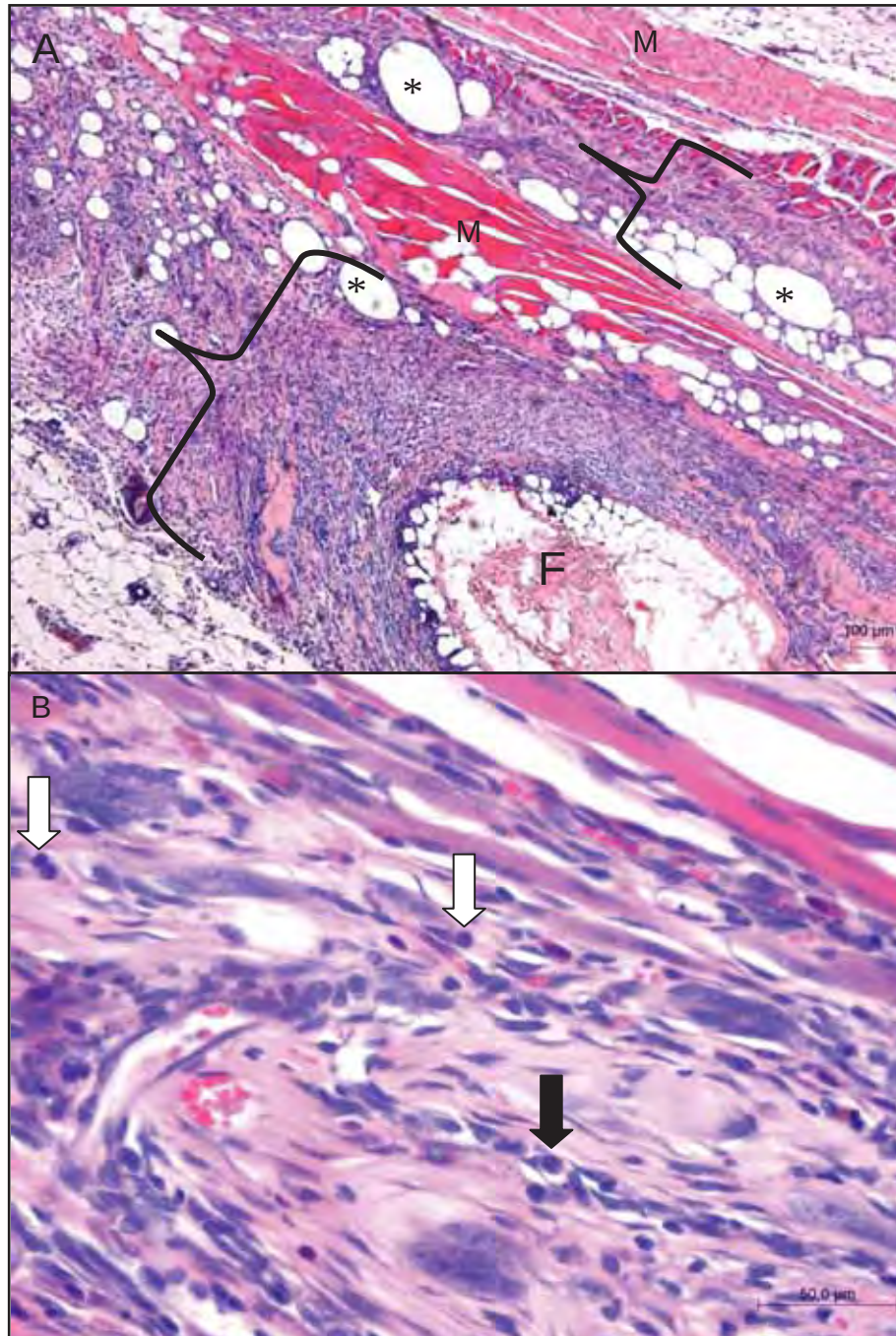


Figura 24. Fotomicrografias da região de implante peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 7 dias de pós-operatório onde em A nota-se imagem negativa de tecido adiposo (*), descontinuidade das camadas musculares (M), unidas por um discreto tecido fibroso () próximo ao espaço ocupado pelo fio de sutura (F). Em B, presença de infiltrado inflamatório misto representado por polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca). (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

No M15, verificou-se tecido adiposo, descontinuidade das camadas musculares unidas por um moderado tecido fibroso acompanhado de infiltrado inflamatório misto com raros polimorfonucleares e predominância de mononucleares ao redor do fio de sutura e do implante (Figura 25).

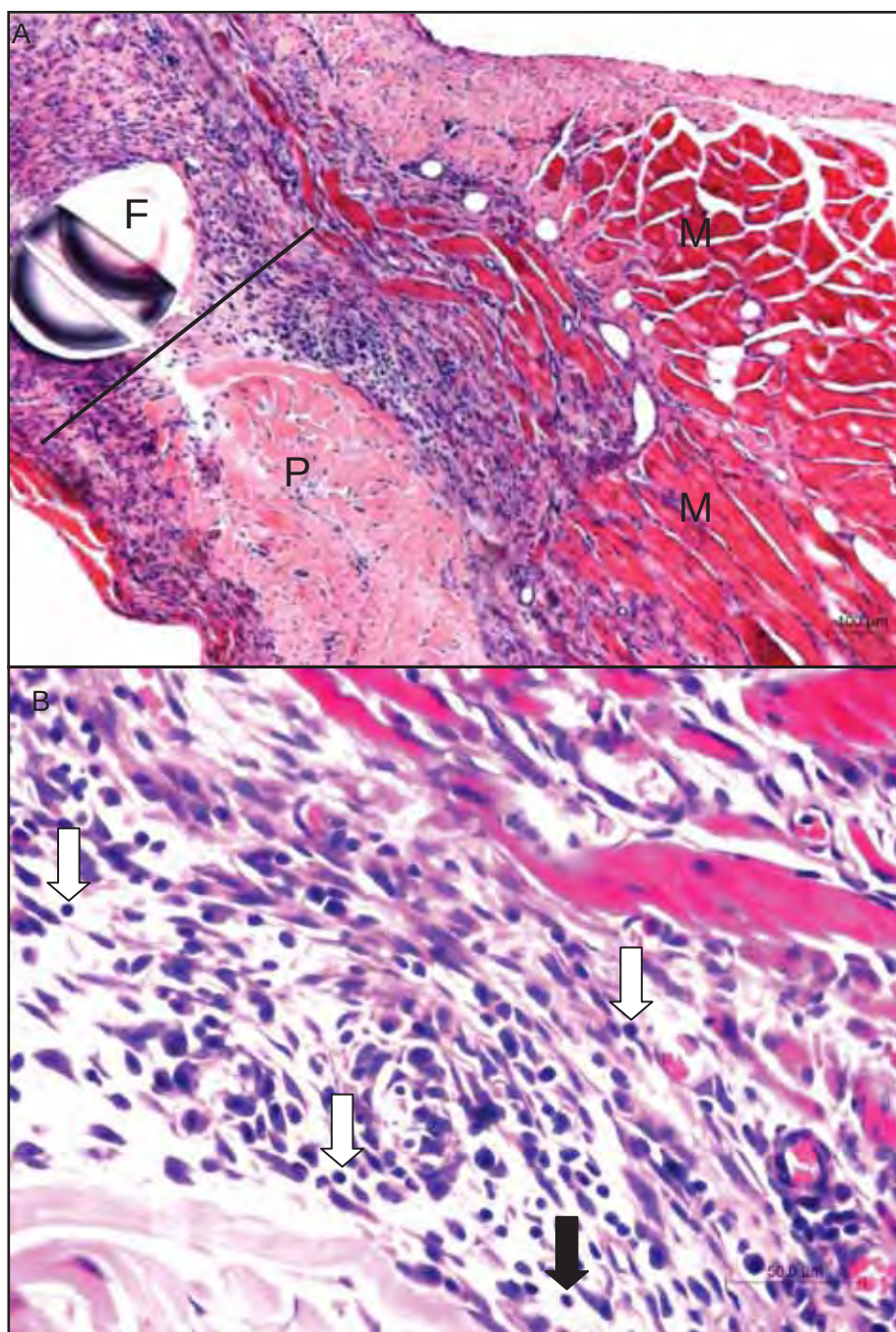


Figura 25. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 15 dias de pós-operatório. Em A nota-se tecido adiposo (*), descontinuidade das camadas musculares (M), unidas por um discreto tecido fibroso (traço), próximos ao fio de sutura (F) e ao implante (P) e em B notam-se a presença de infiltrado inflamatório misto, representado por polimorfonucleares (seta preta) e mononucleares (seta branca). (seta), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

No M30, constatou-se, a presença de moderado tecido fibroso justaposto à camada muscular. Presenciou-se também infiltrado inflamatório mononuclear no local em que foi afixado o implante (Figura 26).

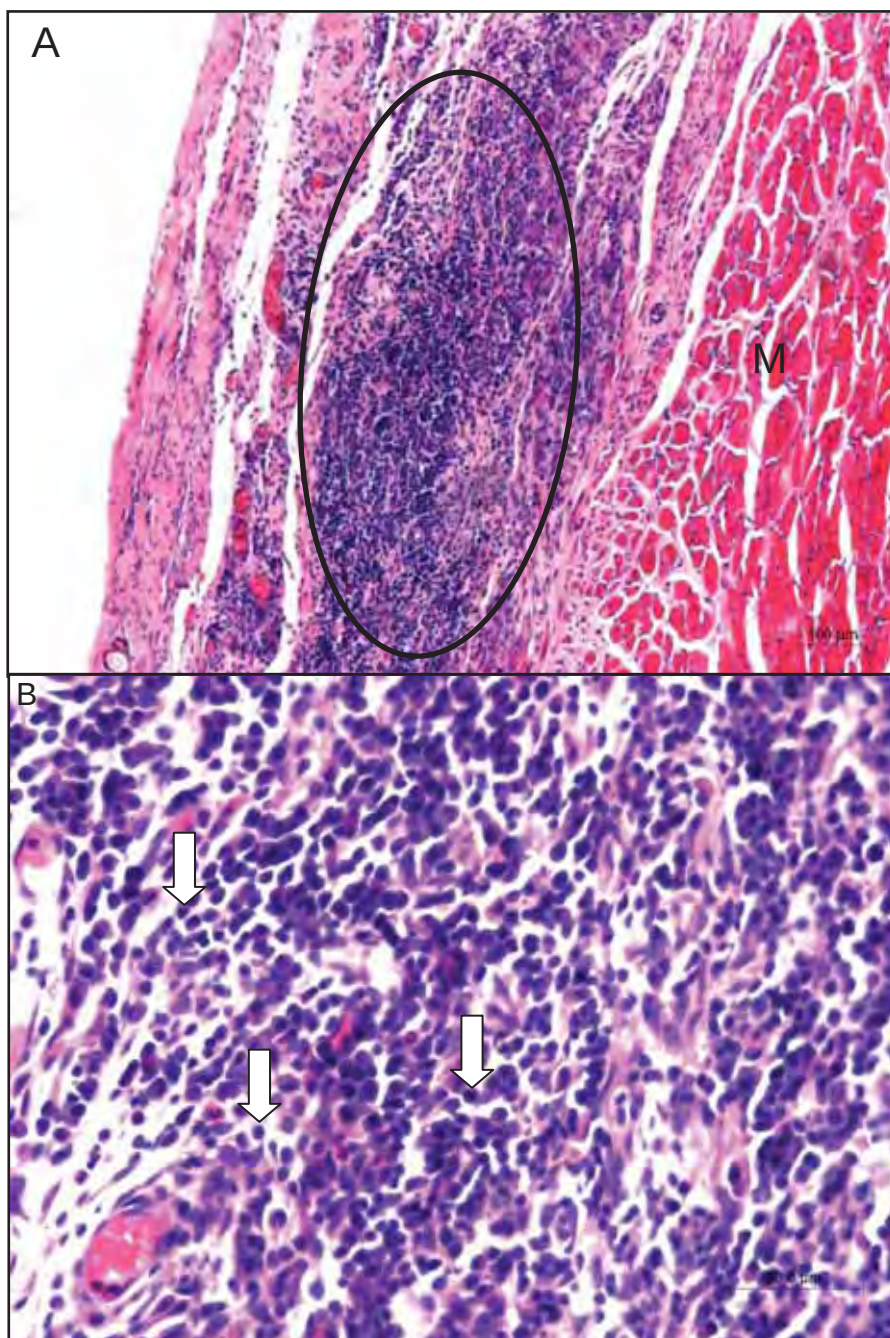


Figura 26. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 30 dias de pós-operatório. Em A nota-se a presença de moderado tecido fibroso justaposto à camada muscular (M), acompanhado da presença de infiltrado inflamatório mononuclear acentuado focal (elipse). Em B, presença de infiltrado inflamatório mononuclear (seta) (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

No M60, verificou-se a presença de intenso tecido fibroso entremeado a camada muscular (Figura 27 A). Em meio aos fibroblastos, notou-se a presença de feixes musculares e discretos mononucleares (Figura 27 B).

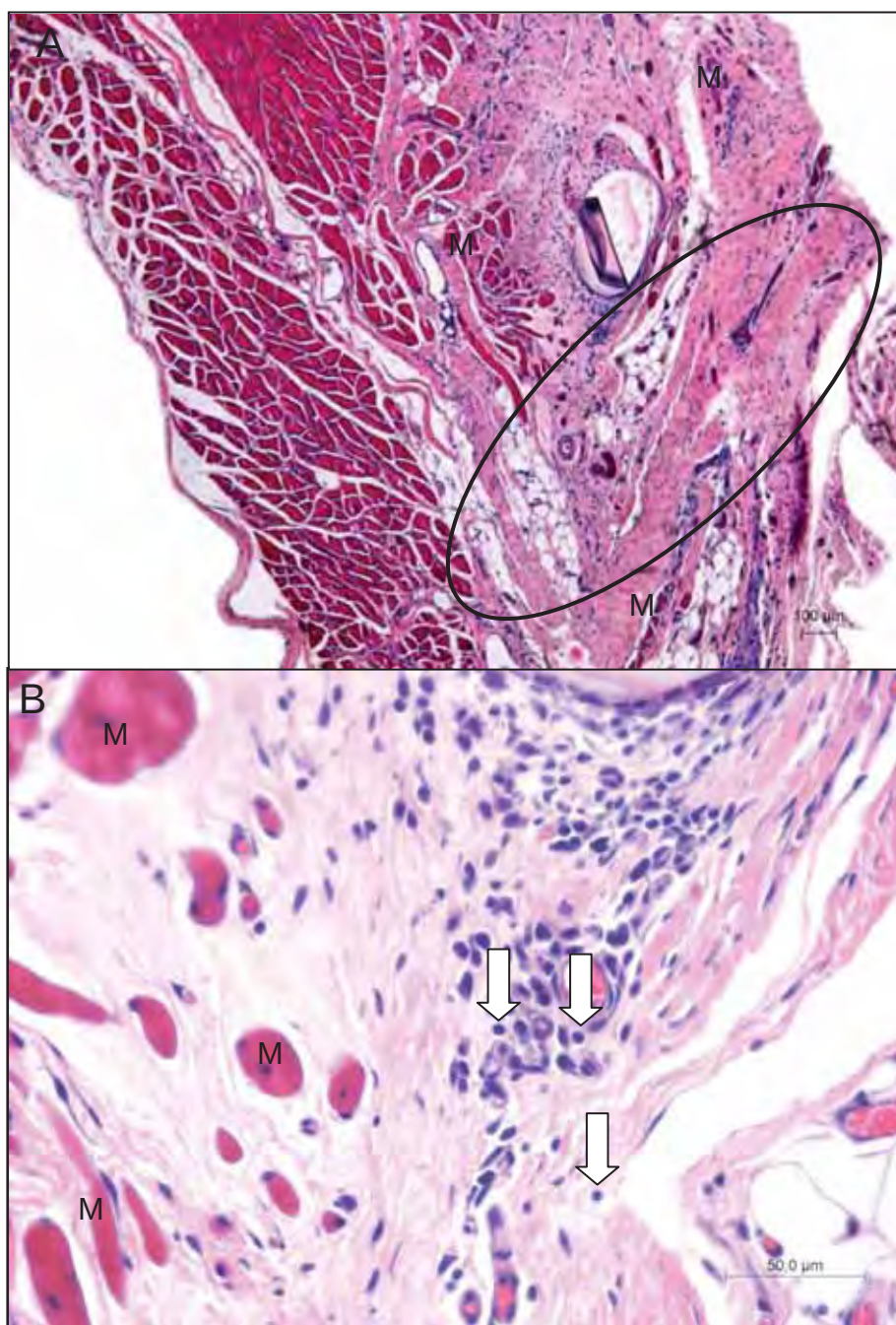


Figura 27. Fotomicrografias da região de implante de peritônio da paca, de um rato Wistar, macho, GIII, eutanasiado aos 60 dias de pós-operatório. Em A nota-se no local onde o implante foi afixado a presença de moderado tecido fibroso (elipse) entremeados a camada muscular (M). Em B verifica-se a presença de feixes musculares (M) e linfócitos (seta) juntos ao tecido fibroso (área rósea), (Paraplast, HE, 5X e 40 X respectivamente).

5.4 Estereologia

O número total de células mononucleares verificados em cada animal nos diferentes grupos e momentos obtidos pelas análises estereológicas podem ser visibilizados nas tabelas (1, 2 e 3). O número total de células polimorfonucleares foi zero, desta forma não foi possível a avaliação de seus valores.

Tabela 1. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GI, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.

<i>Animal</i>	<i>M7</i>	<i>M15</i>	<i>M30</i>	<i>M60</i>
1	18.701.280	5.994.000	7.072.920	5.874.120
2	5.434.560	6.833.160	9.190.800	4.315.680
3	5.314.680	11.268.720	28.411.560	6.153.840
4	6.833.160	4.755.240	7.512.480	4.515.480
5	4.395.600	18.301.680	10.709.280	4.915.080
Total	40.679.280	47.152.800	62.897.040	25.774.200

Tabela 2. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GII, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.

<i>Animal</i>	<i>M7</i>	<i>M15</i>	<i>M30</i>	<i>M60</i>
1	31.888.080	32.007.960	13.466.520	27.732.240
2	33.326.640	40.239.720	17.182.800	29.170.800
3	29.970.000	16.543.440	11.748.240	8.391.600
4	20.939.040	24.375.600	21.378.600	6.713.280
5	37.362.600	15.344.640	24.215.760	20.139.840
Total	153.486.360	128.511.360	87.991.920	92.147.760

Tabela 3. Registros referentes ao número total de mononucleares nos animais do GIII, observados nos momentos: M7, M15, M30 e M60 de pós-operatório. Jaboticabal, SP, 2012.

<i>Animal</i>	<i>M7</i>	<i>M15</i>	<i>M30</i>	<i>M60</i>
1	12.987.000	6.033.960	90.309.60	6.033.960
2	14.065.920	10.309.680	18.621.360	11.188.800
3	19.060.920	13.186.800	4.315.680	17.942.040
4	19.020.960	11.108.880	31.568.400	9.670.320
5	13.226.760	23.136.840	16.463.520	16.623.360
<i>Total</i>	78.361.560	63.776.160	79.999.920	61.458.480

5.5 Análise estatística pelo teste de tukey a 5% de probabilidade

Pelo teste f da análise de variância na avaliação do número de mononucleares, a interação grupo x tempo não foi significativa ($p = 0.131$), ou seja, no geral, os grupos possuíam o mesmo comportamento ao longo do tempo (figura 28). Todavia, analisando esta interação, encontrou-se diferença significativa entre os grupos nos momentos 7 e 15 dias de pós-operatório conforme o gráfico de interação (figura 28).

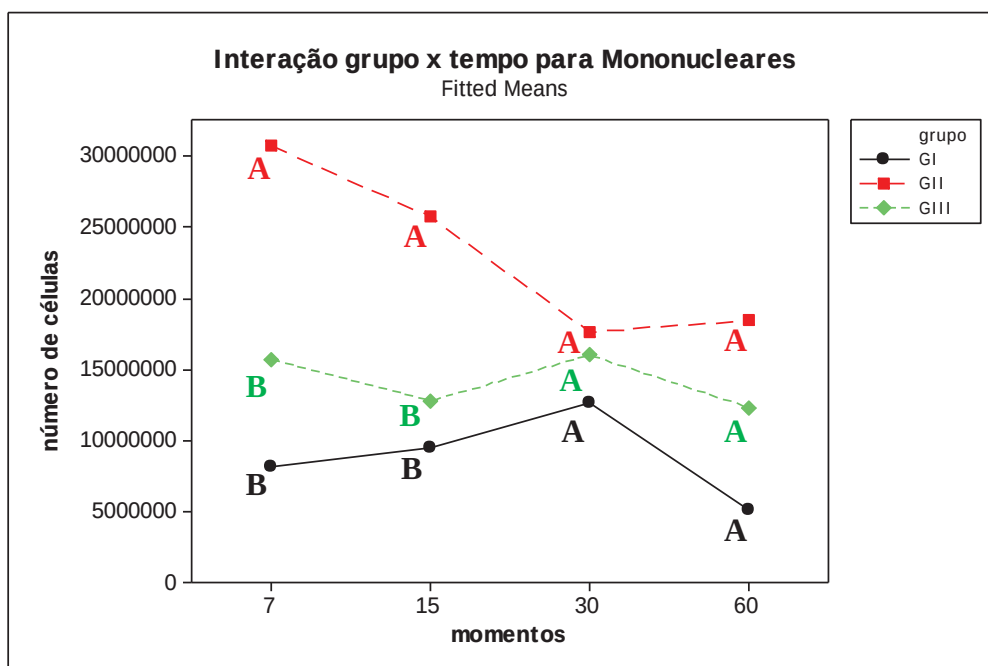


Figura 28. Gráfico da interação grupo x tempo para a contagem de mononucleares. Os grupos seguidos pelas mesmas letras nos diferentes momentos não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

De forma isolada, é possível interpretar significância entre os grupos ($p=0.0006$). No grupo GII a média do número de mononucleares foi estatisticamente superior aos grupos GI e GIII (Figura 29).

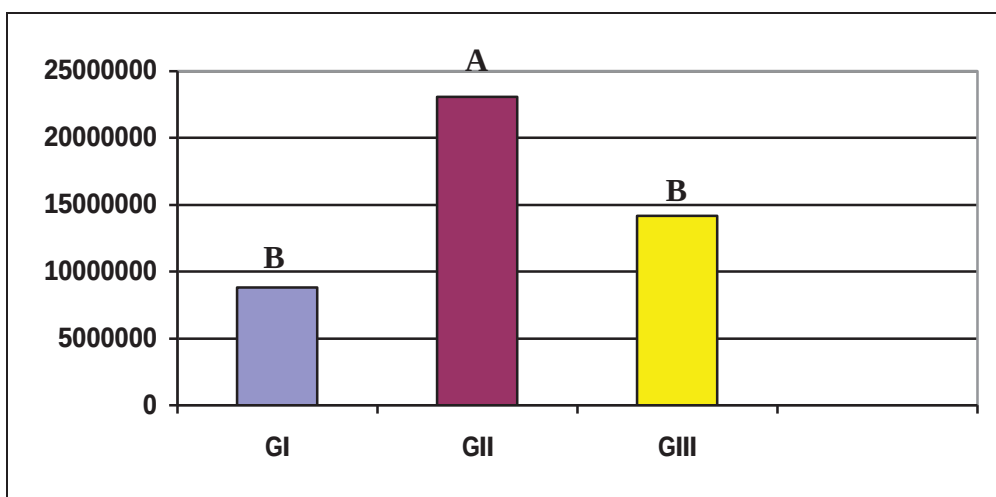


Figura 29. Gráfico da média do número de mononucleares nos grupos sem considerar o momento de avaliação. Os grupos seguidos pelas mesmas letras nos diferentes momentos não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

6. DISCUSSÃO

Os achados relativos à boa cicatrização da ferida cirúrgica e ausência de reações teciduais adversas, nos animais do grupo controle (GI) corroboram com as descrições de Turner e McIlwraith (1985), ao afirmarem que o náilon é um fio relativamente inerte que causa mínima reação tecidual.

Segundo Alvarenga (1992), as membranas biológicas devem ser inertes, com predominância de material rico em colágeno e isento de tecido muscular e adiposo. Assim, o aumento de volume abdominal seguido por fistulação cutânea que foi observado na avaliação clínica em 50% e 65% respectivamente, dos animais do GII e GIII, além da expulsão da membrana, verificada em 5% dos ratos do GIII e a evisceração intestinal notada em 5% dos animais também no GIII, provavelmente, decorreram de uma reação tecidual provocada pela grande quantidade de tecido adiposo existente em parte do peritônio da paca que foi implantado.

Reforça-se a idéia de que o tecido adiposo favorece a rejeição do enxerto pelo hospedeiro (ALVARENGA, 1992), pois em 100% dos animais que receberam o peritônio com pouca quantidade de tecido gorduroso, correspondendo a 50% e 35% dos animais do grupo GII e GIII, respectivamente, houve, clinicamente, boa cicatrização da ferida cirúrgica e ausência de reações teciduais adversas, tal qual ocorreu no grupo controle.

Dessa forma, recomenda-se que a colheita do peritônio da paca, para o uso em enxertos como membrana biológica, seja da região mais ventral do abdômen, próxima a linha Alba, pois nesta área essa membrana é mais delgada e livre de tecido gorduroso. Na região mais dorsal do abdômen da paca, próxima a coluna vertebral, o peritônio é espesso e possui uma grande camada de tecido gorduroso. Na avaliação macroscópica e microscópica do peritônio da paca, Camargo et al. (2012) verificaram a presença de tecido adiposo nessa membrana, todavia não quantificaram esse tecido.

Atribui-se a ocorrência de pequena aderência do omento à linha de sutura abdominal, observada em todos os animais do grupo controle em todos os momentos, à pouca reação tecidual provocada pelo náilon (TURNER; McILWRAITH, 1985; RAHAL et al, 1997; BOOTHE, 2007).

Foi verificada boa cicatrização do implante à musculatura abdominal em 95% dos animais que receberam a membrana de peritônio; tal reação foi também observada no uso do pericárdio canino (BRUN et al., 2002); do pericárdio bovino (QUITZAN et al., 2003) e do peritônio bovino (BASTOS et al., 2005), quando implantados na parede abdominal de ratos.

A aderência acentuada do omento, ora observada, é fato comum no uso de membranas biológicas e também foi verificado no emprego de retalho de peritônio bovino na substituição a segmento diafragmático em cães (DALECK et al., 1988); no uso de peritônio autólogo em cistoplastia de cães (DALECK et al., 1989); no estudo do pericárdio canino e bovino na reparação do músculo reto abdominal de ratos (BRUN et al., 2002; QUITZAN et al., 2003); na cistoplastia experimental em coelhos utilizando o peritônio bovino (OLIVEIRA et al., 2008) e na hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina (SILVA et al., 2009).

Verificou-se aumento de volume com conteúdo seroso não purulento em um animal do GII, no M15 e em todos os animais do GIII, no M7; observou-se ainda, a presença de fístula não infeccionada com conteúdo seroso, em um animal do GII no M7. Todos esses animais receberam o peritônio com grande quantidade de tecido adiposo, dessa forma reforçam-se as observações de Alvarenga (1992), ao afirmar que as membranas biológicas devem ser livres de tecido adiposo.

O abscesso verificado em 40% dos animais do GIII no M15, em 20% dos animais do GII no M30 e em 20% dos animais do GIII, também no M30 ocorreu sempre após fistulação cutânea inicial. Acredita-se que o contato direto da ferida cirúrgica com as fezes do próprio animal favoreceu a contaminação da fístula e posterior formação do abscesso. Tal ocorrência corrobora, em parte, com as descrições de Daleck et al. (1992) que ao estudarem o uso do peritônio bovino na reparação de hérnia perineal em cães relataram que a contaminação da ferida cirúrgica com as fezes do animal levou a rejeição do implante. Todavia, no presente estudo, a infecção não provocou a expulsão da membrana.

Há décadas, as contaminações de membranas biológicas, dos instrumentos e do centro cirúrgico são referidas como as principais causas de infecção e rejeição do enxerto (PIGOSSI et al. 1964; ALVARENGA, 1992; BRUN et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2009). Entretanto, neste estudo, o abscesso verificado em alguns animais teve

sua origem pós-cirúrgica, pois apenas os animais que apresentaram a fistulação da pele desenvolveram a infecção; no grupo controle e nos animais que receberam o peritônio livre de gordura, não se verificou fistulação cutânea e consequente formação de abscesso. Assim, a presença de abscesso, possivelmente, foi em decorrência da contaminação da fístula pelos dejetos do próprio animal e não por contaminação da membrana ou dos instrumentos.

A mudança na forma da membrana, a difícil delimitação de sua margem e conseqüente identificação, observada em 100% dos animais no M60 no GII e GIII corroboram com os estudos de Pigossi (1964) na implantação de dura-máter homogênea em cães; de Daleck et al. (1988) na substituição de um retalho diafragmático em cão por peritônio bovino e de Brun et al. (2002) na utilização do pericárdio canino no reparo do músculo reto abdominal de ratos, os quais afirmam que as membranas fornecem arcabouço para orientação e desenvolvimento de novos tecidos possibilitando sua incorporação ao organismo receptor mediante processos de reparação que restabelecem a estrutura ou a função do órgão atingido.

Quanto aos meios de conservação da membrana avaliados neste estudo, verificou-se que estes não interferiram nos resultados macroscópicos observados, pois os grupos GII e GIII tiveram a mesma resposta clínica em relação ao processo cicatricial no uso do peritônio da paca nos diferentes momentos. Tal ocorrência corrobora com as observações de Gonçalves et al. (2003) ao afirmarem que a solução de açúcar a 300% e a glicerina a 98% proporcionaram resultados clínicos semelhantes e satisfatórios na conservação de córneas para ceratoplastias em cães.

Verificou-se ainda que as membranas conservadas em solução de açúcar a 300% apresentaram melhor maleabilidade no ato cirúrgico, assemelhando-se ao peritônio a fresco, enquanto que o material conservado em glicerina, mesmo após a reidratação, mantinha-se mais rígido e assim apresentando maior dificuldade de sua implantação em diferentes tecidos (ALVARENGA, 1992). Tais observações contrariam as descrições de Bastos et al. (2005) ao relatarem a manutenção da maleabilidade da membrana, mesmo antes do período de hidratação, no estudo da aplicação de peritônio bovino conservado em glicerina a 98% em hérnia ventral de ratos.

Histologicamente, a presença de fina camada de tecido fibroso ao redor do fio de sutura separando as camadas musculares, além de pouco infiltrado inflamatório, em todos os momentos de avaliação do GI, apóiam as observações de Turner e McIlwraith (1985) e Boothe (2008), ao afirmarem que o náilon provoca discreta reação tissular.

A ocorrência de infiltrado inflamatório com predominância de mononucleares verificada no GI, em todos os momentos (M7, M15, M30 e M60) também foi observada por Rahal et al. (1997) na utilização do fio de náilon cirúrgico e “linha de pesca esterelizada” na parede abdominal de ratos.

A presença de células mononucleares no GII e GIII em todos os momentos estudados também foi verificada por Brun et al (2002), em estudo do pericárdio canino conservado em solução supersaturada de sal implantado na parede abdominal de ratos wistar. Neste estudo os autores notaram maior concentração de mononucleares nos tempos iniciais, com diminuição progressiva até o último período de avaliação. Tais autores relatam ainda que a resposta inflamatória por polimorfonucleares foi abundante no período de três dias após o procedimento cirúrgico, entretanto, este momento não foi avaliado no estudo em questão; assim, raros polimorfonucleares foram verificados nesta oportunidade.

Nos animais do GII e GIII que receberam o peritônio da paca ficou demonstrada a ocorrência de reação inflamatória aguda (M7 e M15), que gradativamente foi desaparecendo e a membrana foi sendo substituída por tecido conjuntivo fibroso entremeado ao tecido muscular (M30 e M60). Tal padrão de resposta foi evidenciado em estudos referentes a diferentes materiais biológicos conservados, tanto na glicerina, quanto na solução supersaturada de açúcar (PIGOSSI, 1964; DALECK et al., 1987; DALECK et al., 1988; MAZZANTI et al., 2001). Sabe-se que as membranas biológicas atuam como arcabouço para o crescimento do tecido vivo (ALVARENGA, 1992) e dessa forma, o peritônio da paca também teve essa atuação, independentemente dos meios em que foram conservados.

As avaliações estereológicas foram fundamentais nas análises comparativas entre os resultados observados em cada grupo estudado, pois possibilitaram quantificar as alterações verificadas (PEREIRA; MANDARIM-DE-LACERDA, 2001).

Como os campos para a análise estereológica eram sistematicamente aleatórios, a contagem de polimorfonucleares foi zero, diferentemente da análise histológica, na qual verificou-se presença de alguns polimorfonucleares em M7 e M15. Esse fato indica que cortes histológicos simples não podem ser utilizados para a quantificação celular, uma vez que não representam uniformemente toda a amostra.

A presença exclusiva de células mononucleares, observada na análise estereológica em todos os grupos, em todos os momentos, justifica-se pela resposta inflamatória normal que é observada na cicatrização por primeira intenção, na qual o número de células polimorfonucleares é verificado até o terceiro dia, sendo substituídos por mononucleares, que diminuem progressivamente ao passo que o processo cicatricial ocorre (TURNER; McILWRAITH, 1985; COTRAN et al., 2000). Entretanto, deve-se considerar que nesta oportunidade o primeiro momento de avaliação foi realizado aos sete dias de pós-operatório e assim não se verificou a presença significativa de polimorfonucleares.

A estereologia permitiu a ratificação dos resultados gerais observados na histologia, quanto à diminuição da resposta inflamatória no decorrer dos momentos de avaliação pós-operatórios (TURNER; McILWRAITH, 1985; COTRAN et al., 2000). O aumento de células inflamatórias observadas pela histologia nos animais do GII no M30 não foi estatisticamente significativa pela análise estereológica, quando comparada com os outros grupos, ora estudados, no mesmo momento de avaliação.

Mota et al. (2003) e Bariani Junior et al. (2007) afirmaram que a solução de açúcar a 300% e a de glicerina a 98% são os meios de conservação que se assemelham por manterem a integridade celular; todavia, essa semelhança não pode ser sustentada ao se avaliar os conservantes pela resposta inflamatória do hospedeiro, pois houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, ao se verificar maior infiltrado inflamatório nos animais do GII quando comparado ao GIII.

7. CONCLUSÃO

Da forma que se conduziu este experimento e mediante os resultados observados nas avaliações clínicas, macroscópicas e histológicas, pode-se concluir que o peritônio de paca como membrana biológica conservado nos meios estudados pode ser utilizado com bons resultados referentes à biocompatibilidade e capacidade de cicatrização na parede abdominal de ratos, especialmente, quando colhido da parede abdominal mais ventral da paca, onde o peritônio é mais delgado com mínima quantidade de tecido adiposo.

A conservação da membrana em solução supersaturada de açúcar a 300% permitiu melhor maleabilidade no ato cirúrgico, todavia a conservação em glicerina a 98% possibilitou, microscopicamente pelas análises estereológicas, menor resposta inflamatória.

8. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

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

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.

AYYILDIZ , A.; CELEBI , B.; AKGÜL , K. T.; NUHOGLU, B.; CAYDERE, M.; GERMIYANOGLU, C. A. Comparison of free skin graft, fascia lata, alloderm, bovine pericardium and primary repair in urethrocutaneous fistulas without diversion: an experimental study. **Pediatric Surgery International**, Germany, v. 22, p. 809-814, 2006

BARBOSA, R. R.; LEAL, L. M.; MARTINS, L. L.; GARCIA FILHO, S. P.; MACHADO, M. R. F. Estrutura e ultra-estrutura de membranas biológicas de ovinos da raça Santa Inês (*Ovis aries*, L., 1758) a fresco e conservadas em glicerina. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2012.

BARIANI JÚNIOR, A. F.; GUIMARÃES, G.C.; FERRACINI JÚNIOR R. Análise microbiológica de diferentes meios de conservação utilizados para preservar membranas biológicas bovinas. In : 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2007, São Paulo. **Anais eletrônicos**, São Paulo: USP, 2007. Disponível em <http://www.usp.br/siicusp/Resumos/15Siicusp/2383.pdf> acesso em 10/08/2010.

BASTOS, E. L. S.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O.; NOVO, N. F.; SILVADO, R. A. B. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 256-260, set./out., 2005.

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, vol. 33, p. 305-312, 1996.

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

BOOTHE, H. W. Fios de sutura, adesivos de tecidos, grampeadores e cliques hemostáticos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2007. v. 1, cap. 18, p. 235 243.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L. DREIMEIER, D; CONTENSINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S. T. L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R. Solução hiperstaurada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1019-1025, 2002.

BRUN, M. V.; PIPPI, N. L. DREIMEIER, D; CONTENSINI, E. A.; BECK, C. A. C.; CUNHA, O.; PINTO FILHO, S. T. L.; ROEHSIG, C.; STEDILE, R.; SILVA, T. F. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.147-153, 2004.

BUSNARDO, C. A.; FREITAS, P. M. C.; EURIDES, D.; RONCETII, G. R.; NUNES L. C.; BELETTI, M. E. Peritônio de bovino como bandagem em queimaduras cutâneas experimentais em coelhos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 823-828, 2009.

CAMARGO, A. D. **Comparação entre a morfologia microscopica e ultraestrutural de membranas biológicas da paca, a fresco e conservadas em glicerina**, 2005. 44 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinaria) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, 2009.

CAMARGO, A. D.; LEAL, L. M.; GARCIA FILHO, S. P.; MARTINS, L. L.; REIS, A. C. G.; MACHADO, M. R. F. Propriedades morfológicas do peritônio da paca (*Cuniculus*

paca, L. 1766) a fresco e conservados em glicerina 98%. **Biotemas**, Florianópolis, v. 25, n.4, p. 187-194, 2012.

COSTA NETO, J. M.; DALECK, C. R.; ALESSI, A. C.; BRACCIALLI, C. S. Tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.29, n.4, p. 697-703, 1999.

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

DALECK, C. L. M.; DALECK C. R.; PADILHA-FILHO, J. G. Cistoplastia com peritônio autólogo em cães. **Semina**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 22-26, 1989.

DALECK C. R.; ALESSI A. C.; COSTA-NETO, J. M. et al. Substituição de um retalho diafragmático de cão por peritônio de bovino conservado em glicerina: estudo experimental. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p. 53-61, 1988.

DALECK, C. R.; DALECK, C. L. M.; GANDOLFI, W.; ALESSI, A. C. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina – “estudo experimental”. **Ars Veterinária**. Jaboticabal, v.3, n. 2, p. 195-202, 1987.

DALECK, C.R.; DALECK, C.L.M.; FILHO, J.G. P.; NETO, J.C.M. Reparação de hérnia perineal em cães com peritônio de bovino conservado em glicerina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, n.2, p. 179-183, 1992.

DYCE, K. M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. Aparelho Digestório. In:_____. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. cap. 3, p. 99-145.

DUBOST, G.; HENRY, O. Comparison of diets of the acouchy, agouti and paca, the three largest terrestrial rodents of French Guianan forests. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v.22, p.641-651, 2006.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the central neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil**. Chicago: University of Chicago, 1999, v.3, 609p.

FOSSUM, T. W. Cirurgia da Cavidade Abdominal. In:_____. **Cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 18, p. 317-338.

FREITAS, D. S. T. **Reparo de defeito da parede abdominal em cães com xenoenxerto de peritônio bovino omentalizado**, 2005. 48f. Monografia (raduação em medicina veterinária) – Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

GONÇALVES, G. PARIZOTTO, N. A. Fisiologia da Reparação Cutânea: Atuação da Fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, Campinas, v. 3, n.1, p.5-13, 1998.

GONÇALVES, G. F.; PIPPI, N. L.; RAISE, A. G.; OLIVEIRA, S. T.; GRAÇA, D. L.; MAZZANTY, A.; STEDILE, R. Ceratoplastia lamelar homóloga em cão com conservação supersaturada de açúcar ou glicerina – aspectos macroscópicos. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**. Umuarama v. 6, n.1, p. 31-37, 2003.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 96, n.7-12, p. 857-881, 1988.

INATOMI, L. S.; PRANTONI, G. A.; ARAÚJO, F. C.; RAISER, A. G.; PEREIRA, S. N.; CARDOSO, G.; BARROS, S. S.; SANTOS, M. N. Implante de dura-máter heteróloga em cães. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 10, n. 3, p. 291-297, 1980.

LACERDA, P. M. O. **Aspectos estereológicos dos vilos coriônicos da placenta de bovinos clonados**, 2006. 77f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais

Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LANGE, R. R.; SCHMIDT, E. M. S. Rodentia: roedores silvestres (capivara, cutia, paca, ouriço). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. A. **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. cap. 29, p.475-491.

LOPES-PAULO, F. Emprego da estereologia em pesquisas colorretais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 73-76, 2002.

MARTINEZ, N. R.; SGARBI, E. C.; SGARBI, S. T.; SGARBI, J. M.; SGARBI, D. M. O açúcar no tratamento das feridas infectadas. **Revista Brasileira de Cirurgia**, Rio de Janeiro, v. 76, n.1, p. 23-26, 1986.

MAZZANTI, A.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; GRAÇA, D. L.; FARIA, R. X.; OLIVEIRA, L. O.; GUIMARÃES, L. D. Músculo diafragma homólogo conservado em solução supersaturada de açúcar para a reparação de grande defeito na diafragma de cão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, p. 277-283, 2001.

MAZZANTI, A. et al. Hernioplastia diafragmática em cão com pericárdio bovino conservado em solução supersaturada de açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, p. 677-684, 2003.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; FREITAS, P. M. C.; BELETTI, E.; MASTRANTONIO, E.C.; SHIMIZU, B. J.; SILVA, L. A. R.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K.. Análise ultra-estrutural da túnica muscular do intestino delgado de cães preservado em diferentes meios. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, p. 13-17, 2002.

MOTA, F. C. D.; EURIDES, D.; FREITAS, P. M. C.; BELETTI, E.; MASTRANTONIO, E.C.; SHIMIZU, B. J.; SILVA, L. A. R.; CARDOSO, J. R.; MARTINS, A. K. Análise

morfológica e microbiológica utilizando-se diferentes métodos de preservação sobre a camada muscular do intestino delgado de cães. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 4, p. 117-123, 2003.

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

NOLASCO, R. M.; BELETTI, M. E.; EURIDES, D.; SILVA, F. O. C. E.; COELHO, H. E.; DALECK, C. R.; SILVA, L. A. F. Avaliação histológica e ultra-estrutural de tendões de bovinos preservados em diferentes meios. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p.210-215, 2003.

OLIVEIRA, L. L.; SOUZA, D. B.; ABÍLIO, E. J.; CARVALHO, E. C. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **JBCA – Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, Campos dos Goytacazes, v.2, n.3, p. 175-188, 2009

OLIVEIRA, T. C.; SCAVONE, A. R. F.; MACHADO, M. R. F.; MAZZUCATTO, B. C. Cistoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 8, p. 2218-2224, 2008.

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. **Histology and Histopathology** , Spain, v. 16, p. 15-20, 2001.

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

PRATA, M. B.; HADDAD, C. M.; GOLDENBER, G. S. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea: estudo experimental em rato. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

QUEIROLO, D.; VIEIRA, E.; EMMONS, L.; SAMUDIO, R. *Cuniculus paca*. In: **IUCN Red List of Threatened Species**, Version 2010.1. 2008. Disponível em:<www.iucnredlist.org>. Acesso: em 28 mar. 2010.

QUEIROZ, F. F.; CORDEIRO, G. C.; RODRIGUES, A. B. F.; SILVEIRA, L. S.; Ensaio biomecânico da túnica albugínea bovina conservada em glicerina 98% para utilização como membrana biológica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 501-506, 2012.

QUITZAN, G. Q.; RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; CROCCI, A. J. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 297-301, 2003.

RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; FIGUEIREDO, L. A.; IAMAGUTI, P. Estudo comparativo das reações teciduais produzidas pela “linha de pesca” (poliamida) e fio de náilon cirúrgico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n.1, p. 89-93, 1997.

RAISER, A. G.; BALDKE, M. R. Terapia de infecções cirúrgicas com jatos de solução salina e açúcar granulado. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 6, p. 125-128, 1987.

RAPPETI, J. C. S. **Homoimplante de costela conservada em solução supersaturada de açúcar a 300% ou em açúcar *in natura* na reconstituição experimental de costelas em gatos (*Felis catus*)**. 2006. 90f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

REDFORD, K. H.; ROBINSON, J. G. Subsistence and commercial uses of wildlife in Latin America. In: ROBINSON, J. G.; REDFORD, K. H. **Neotropical wildlife use and conservation**. Chicago: The University of Chicago Press, 1991. p.6-23.

REYES, E. E. F. **Testes físicos comparativos de membranas biológicas preservadas em glicerina, congeladas e a fresco**. 1993. 85f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

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

RODASKI, S.; CUNHA, O.; DE NARDI, A. B.; RIOS, A.; COMAR, F. A.; CASTRO, J. H. T. Artroplastia acetábulo-femoral em cães com pericárdio bovino conservado. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 179-187, 2002.

SANTOS, B. F. Modelo Animal. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006. cap.2, p.23-24.

SAPORITO, W. F.; PIRES, A. C.; CARDOSO, S. H.; CORREA, J. A.; ABREU, L. C.; VALENTI, V. E.; MILLER, L. M. R.; COLOMBARI, E. Bovine pericardium retail preserved in glutaraldehyde and used as a vascular patch. **Biomedcentral Surgery**, Colorado, v.11, n.37, p. 1-8, 2011.

SARAC, T. P.; CARNEVALE, K.; SMEDIRA, N.; TANQUILUT, E.; AUGUSTINOS, P.; PATEL, A.; NASKA, T.; CLAIR, D.; OURIEL, K. In vivo and mechanical properties of peritoneum/fascia as a novel arterial substitute . **Journal of Vascular Surgery**, Chicago, v.41, n.3, p. 490-497, 2011.

SARTORI FILHO, F.; GANDOLFI, W.; BANDARRA, E. P. Emprego da membrana biológica (centro frênico) na reparação das lesões tendíneas em coelhos. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.9, p .69-77, 1997.

SHIRAZI, M.; NOORAFSHAN, A.; SERHAN, A. Effects of different suture materials used for the repair of hypospadias: a stereological study in a rat model. **Urologia Internationalis**, Switzerland, v.89, p. 3985-401.

SILVA, L. A. F.; FRANCO, L. G.; MENEZES, L. B.; MOURA, V. M. B. D.; BERNARDES, K. M.; SOUZA, M. A. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.3, p. 606-612, 2009.

SILVA, S. V.; QUESSADA, A. M.; SILVA, F. L. et al. Açúcar na cicatrização de ferida infectada em eqüino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 84, 1996.

SOUZA FILHO, Z.A. Próteses biológicas. In SILVA, L.A. **Hérnias**. São Paulo: Roca, 1992. p.1138-1142.

THIEL, M. **Análise quantitativa da fibrose e semiquantitativa da reação inflamatória de quatro diferentes slings sintéticos**. 2006, 71f. Tese (Doutorado Ciências Médicas) Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

TURIEL, M. C. P. **Encefalite viral induzida pelo vírus da dengue em camundongos suíços albinos: a resposta inflamatória no sistema nervoso central do hospedeiro neonato**, 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Universidade Federal do Pará, UFPa, Belém, 2011.

TURNER, A. S.; McILWRAITH, C. W. Materiais de sutura e agulhas. In _____ **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 1985. p. 67-77

VÁMHIDY, L.; STRAUCH, B.; BIRÓ, V. Preserved tendon grafts in reconstructive hand surgery: a review. **Acta Chirurgica Hungarica**, Budapest, v. 31, n. 3, p. 209-215, 1990.

VULCANI, V.A.S.; MARCORIS, D.G.; PLEPIS, A.M.G.; MARTINS, V.C.A.; LAPENA, M.H. Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de eqüinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 778-785, 2008.

WEISS, R. G.; NECTOUX, J. L.; FALLEIRO, R. P. T. et al. Tratamento da ferida operatória infestada: açúcar, uma nova opção. **Prática Médica Geral**, v.28, n. 4, p. 337-342, 1984.

ZERWES, M. B. C.; STOPIGLIA, A. J.; MATERA, J. M.; FANTONI, D. T.; STERMAN, F. A.; LACERDA, P. M. O. Avaliação do tratamento cirúrgico da hérnia perineal em cães com o reforço de membrana de pericárdio eqüino preservado em glicerina a 98%. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 220-227, 2011.

Anexo I

 Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis COMPROVANTE DE REGISTRO Nr. de Cadastro: 482508 CPF/CNPJ: 48.031.918/0012-87 Nome/Razão Social/Endereço UNESP JABOTICABAL VIA DE ACESSO PROF. PAULO D. CASTELLANE, S/N ZONA RURAL JABOTICABAL/SP 14884-900 Atividades Potencialmente Poluidoras Categoria / Detalhe Moto-serras - Lei 7803/89 / Proprietário de motosserras Uso de Recursos Naturais - Criadouro científico de fauna silvestre para fins de pesquisa Atividades de Defesa Ambiental Não existem atividades de defesa ambiental	 Observações: 1 - Este cartão é o documento comprobatório de inscrição no Cadastro Técnico Federal - CTF e de uso obrigatório nos casos legalmente determinados. Para qualquer orientação de natureza cadastral, procure a unidade local do cadastro do IBAMA. 2 - Para verificar a regularidade desta pessoa junto ao IBAMA, visite http://www.ibama.gov.br e procure Serviços On-Line, depois Consulta de Regularidade. 3 - Este certificado não habilita o interessado ao exercício da(s) atividade (s) descrita(s), sendo necessário, conforme o caso de obtenção de licença, permissão ou autorização específica após análise técnica do IBAMA, do programa ou projeto correspondente. 4 - No caso de encerramento de qualquer atividade especificada neste certificado, o interessado deverá comunicar ao IBAMA, obrigatoriamente, no prazo de 30 (trinta) dias, a ocorrência para atualização do sistema. 5 - Este certificado não substitui a necessária licença ambiental emitida pelo órgão competente. 6 - Este certificado não habilita o transporte de produtos ou subprodutos florestais e faunísticos. 7 - Este certificado não habilita o transporte de produtos ou subprodutos florestais e faunísticos. Data de emissão: 03/03/2009 Autenticação: dnntl.wrfg.azkc.ve46
---	--