



**FERNANDO GOULART FERNANDES DIAS**

**“Análise Imunohistoquímica do Efeito do Recobrimento com Gel Purificado  
de Colágeno na Integração de Telas de Polipropileno em Ratas”**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

Fernando Goulart Fernandes Dias

**“Análise Imunohistoquímica do Efeito do Recobrimento com Gel Purificado de Colágeno  
na Integração de Telas de Polipropileno em Ratas”**

**Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDO GOULART FERNANDES DIAS E ORIENTADA PELO PROF. DR. CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICETTO.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do(a) Orientador(a)

**CAMPINAS**

**2014**

iii

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

D543a Dias, Fernando Goulart Fernandes, 1983-  
Análise imunohistoquímica do efeito do recobrimento  
com gel purificado de colágeno na integração de telas de  
polipropileno em ratas / Fernando Goulart Fernandes  
Dias. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Cássio Luís Zanettini Riccetto.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colágeno. 2. Polipropilenos. 3. Imunohistoquímica.  
I. Riccetto, Cássio Luís Zanettini. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título..

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Immunohistochemical analysis of the effect of a purified collagen gel coating on integration of polypropylene meshes in rats

**Palavras-chave em inglês:**

Collagen

Polypropylenes

Immunohistochemistry

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Mestre em Ciências

**Banca examinadora:**

Cássio Luís Zanettini Riccetto [Orientador]

Adriano Fregonesi

Alberto Azoubel Antunes

**Data de defesa:** 01-07-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Cirurgia

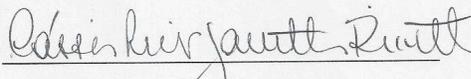
**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

FERNANDO GOULART FERNANDES DIAS

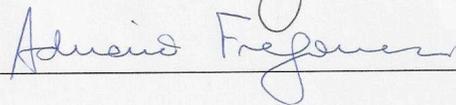
Orientador PROF. DR. CÁSSIO LUIS ZANETTINI RICCETTO

**MEMBROS:**

1. PROF. DR. CÁSSIO LUIS ZANETTINI RICCETTO



2. PROF. DR. ADRIANO FREGONESI



3. PROF. DR. ALBERTO AZOUBEL ANTUNES



Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 01 de julho de 2014

Dedico este trabalho a:

Meus pais Paulo e Maria Luiza, sempre presentes, apoiando e auxiliando em cada etapa de minha vida.

Minha esposa Arethusa, pelo companheirismo, dedicação, incentivo, paciência, carinho e força em todos os momentos.

Meus irmãos Cinthia e Paulo Henrique, pela parceria e amizade.

Naide, pelo amor incondicional e participação ativa em cada novo desafio.

Meus avôs (*in memoriam*), pelos ensinamentos e princípios de vida que nos deixaram.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao meu orientador Prof. Dr. Cássio Riccetto, pelo honroso exemplo de professor, médico e pesquisador.

Ao colega Alessandro Prudente Correa dos Santos, pelo auxílio na execução da análise do material e participação ativa no processo de desenvolvimento do trabalho.

Ao colega Dr. Rodrigo Teixeira Siniscalchi, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos com os animais.

Ao Prof. Benedicto de Campos Vidal, pelo fornecimento do gel de colágeno e preparo das telas revestidas.

Ao Dr Paulo Latuf Filho e a equipe do Laboratorio de Patologia Experimental da CIPED, pelo auxílio no preparo e aplicação dos regentes imunohistoquímicos.

Aos biólogos Willian Adalberto Silva e Ana Cristina de Moraes, pelos cuidados com os animais e suporte durante a execução dos experimentos.

À Promedon, pela doação das telas de polipropileno para o estudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo - FAPESP - pelo apoio financeiro para realização do projeto, na forma de Auxílio Regular à Pesquisa (Processo 2013/05841-3).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

## RESUMO

---

**INTRODUÇÃO:** Telas sintéticas representam, na atualidade, o pilar do tratamento da incontinência urinária e de prolapso vaginais, sendo o polipropileno monofilamentar o material sintético mais utilizado. Apesar de taxas de cura de até 90%, complicações relacionadas à integração, tais como exposição ou erosão das telas, não podem ser negligenciadas. O colágeno, por ser um material biologicamente compatível, pouco imunogênico e com propriedades moduladoras do processo inflamatório, pode ser utilizado como um importante agente cicatricial melhorando a integração das telas. **OBJETIVO:** Avaliar, por meio de técnicas imunohistoquímicas, o efeito do recobrimento de tela de polipropileno monofilamentar, implantada no subcutâneo de ratas, com gel purificado de colágeno bovino, do ponto de vista da resposta imuno-inflamatória, do metabolismo do colágeno, angiogênese e citotoxicidade. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Após aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal, foram utilizadas 20 ratas fêmeas da raça Wistar, tendo sido implantadas, em cada animal, de um lado da parede abdominal, uma tela de polipropileno monofilamentar (PP) e, do outro lado, uma tela semelhante recoberta com gel purificado de colágeno (PPC). Os animais foram divididos em quatro sub-grupos contendo 5 animais cada e foram eutanasiados em 7, 14, 21 e 90 dias após o implante. Foram utilizados reagentes específicos para avaliação dos aspectos de interesse: a) Imunológicos (Interleucina 1 – IL-1); b) Metabolismo do colágeno (Metaloproteinases de Matriz 2 e 3 – MMP-2 e 3); c) Angiogênese (Antígeno de Superfície CD-31); d) Citotoxicidade (Receptor do Fator de Necrose Tumoral alfa – TNF- $\alpha$ ). A análise das imunorreatividades foi realizada com auxílio do software analisador de imagens AxioVision™. **RESULTADOS:** A análise comparativa das variáveis entre os 4 períodos definidos (7,14, 21 e 90 dias) e entre os 2 grupos (PP e PPC) apontou diferença significativa para: CD-31 com maior número de vasos no grupo PPC, no subgrupo 14 dias ( $p=0.002$ ) em relação ao grupo PP, e diminuição após 90 dias ( $p=0.002$ ) no grupo PPC; MMP-2 com redução na densidade média no grupo PPC ( $p=0.046$ ) nos subgrupos 21 e 90 dias em relação ao grupo PP; MMP-3 com maior estabilidade ao longo do tempo no grupo PPC, de modo que houve queda significativa da área percentual reativa no grupo PP após 14 e 90 dias ( $p=0.017$ ), bem como redução da densidade média logo após 21 dias, mas apenas após 90 dias no grupo PPC ( $p<0.001$ ). **CONCLUSÃO:** O recobrimento com gel purificado de colágeno bovino determinou alterações significantes na resposta tecidual das ratas às telas de polipropileno, do ponto de vista imunohistoquímico, quanto à angiogênese e atividade das metaloproteinases na área do implante, sem influência significativa sobre a resposta imuno-inflamatória local (expressas por meio da IL-1 e TNF- $\alpha$ ).

## ABSTRACT

---

**INTRODUCTION:** The use of synthetic meshes, specially the polypropylene mesh, has become the standart treatment of urinary incontinence and vaginal prolapses. Even though presenting high cure rates, complications related to integration issues, such as exposure or erosion of the mesh, cannot be neglected. The collagen, well known as an important immunoinflammatory modulator, has been speculated to be a usefull tool in the healing process and possibly improving integration of meshes. **OBJECTIVE** The aim of this study is to evaluate, using immunohistochemical techniques, the effect of the use of a new purified collagen gel covering the monofilament polypropylene mesh implanted subcutaneously in rats, regarding immune-inflammatory response, collagen metabolism, angiogenesis and cytotoxicity. **METHODS:** After Ethics Committee on Animal Use's approval, in 20 female Wistar rats were implanted, at one side of abdominal wall, a monofilament polypropylene mesh (PP) and on the other side, the same mesh covered with a new developed purified collagen gel (PPC). The animals were divided into four sub-groups containing 5 animals each and were euthanized at 7, 14, 21 and 90 days after implantation. The immunohistochemical assessment of the samples was done by using specific reagents for the evaluation of points of interest: a) Immunologic (Interleukin 1 (IL-1)), b) Collagen metabolism (Metalloproteinases 2 and 3 (MMP-2 and 3)), c) Angiogenesis (surface antigen CD-31), d) Cytotoxicity (Tumor Necrosis Factor-alpha Receptor - TNF-  $\alpha$ ). The objective analysis was performed using the image analysis software AxioVision™. **RESULTS:** Comparative analysis of variables between the four periods defined (7, 14, 21 and 90 days) and between the 2 groups (PP and PPC) showed: higher vessel density in PPC group after 14 days ( $p=0.002$ ) and decrease after 90 days ( $p=0.002$ ); decrease of MMP-2 average density in PPC group after 21 and 90 days ( $p=0.046$ ); more stability in MMP-3's behavior in PPC group along the periods with MMP-3 percent reactive area showing significant decrease just in PP group after 14 and 90 days ( $p=0.017$ ) and also for MMP-3 average density, in which reduction was significant after 21 days in PP group, but just after 90 days in PPC ( $p<0.001$ ). **CONCLUSION:** Highly purified collagen coating causes significant changes in angiogenesis and in metalloproteinase's immunohystochemical expression in meshes implants in rats, without significant influence on the local immuno-inflammatory response (expressed by IL-1 and TNF- $\alpha$ ).

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

CD-31	Antígeno de Superfície CD-31
IL-1	Interleucina-1
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
MMP-2	Metaloproteinases de Matriz 2
MMP-3	Metaloproteinases de Matriz 3
PP	Tela de Polipropileno Monofilamentar
PPC	Tela de Polipropileno Monofilamentar Revestida por Gel de Colágeno Purificado
TNF- $\alpha$	Receptor do Fator de Necrose Tumoral alfa
TVT	Tension-free vaginal Tape
UV	Ultravioleta

## LISTA DE TABELAS

---

**Tabela 1.** Avaliação Imunohistoquímica da Angiogênese (CD-31) – Média do número de vasos sanguíneos por campo.

**Tabela 2.** Expressões de IL-1, TFN- $\alpha$ , MMP-2 e MMP-3 (Area -  $\mu\text{m}^2$  e Densidade Médias).

**Tabela 3.** Resultados das ANOVA para medidas repetidas para comparação das variáveis entre períodos (7, 14, 21 e 90 dias) e grupos (PP e PPC).

## LISTA DE FIGURAS

---

**Figura 1.** **A.** Visão macroscópica (Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2 ): à esquerda a tela de polipropileno revestida com colágeno purificado bovino e, à direita, a tela de polipropileno monofilamentar. **AI e AII** - Microscopia óptica, 4 X 0,65 - “Primo Star” (Carl Zeiss)- AI: tela de polipropileno revestida; AII: tela de polipropileno.

**Figura 2.** Etapa Experimental. **A.** Implante padronizado das telas, a cada lado da parede abdominal, separados pela linha alba entre a hipoderme e a fáscia anterior da musculatura abdominal. **B.** No momento da eutanásia, retirada em bloco da parede abdominal preservando as relações anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio.

**Figura 3.** Avaliação Histológica das lâminas em aumento de 5x, 10x e 20x. No aumento de 5x, delimitação da hipoderme (linha negra), tecido reacional peri implante da tela (linha vermelha) e tecido muscular (linha verde). As áreas circulares brancas destacadas com triângulo azul representam a imagem negativa da tela implantada.

**Figura 4.** **A.** Análise da expressão do CD-31 para estudo da angiogênese na área ao redor da tela implantada. Imagem adquirida com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x.com identificação dos vasos sanguíneos corados em marrom. **B.** Ampliação da imagem, sendo evidenciado em azul, destaque para a contagem de vasos, recurso disponível no Software analisador de imagens utilizado AxioVision Microscope V 4.8.0.0 (Karl Zeiss-Germany).

**Figura 5.** Análise das Imunorreatividades. **A.** Imagem adquirida com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x, demonstrando, como exemplom a análise da expressão da IL-1, corada em marrom. **B.** Representa um recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V 4.8.0.0 Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e, a partir desta marcação, executa automaticamente o cálculo da área percentual e densidade média da marcação.

**Figura 6.** Análise da expressão do CD-31 após 14 dias, sendo observada maior concentração de vasos sanguíneos no grupo PPC (**B**), em comparação com o grupo PP (**A**). Imagens adquiridas

com câmera Zeiss AxioCam ICC 1™ com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares centrais marcadas com (x) negro e cinza representam a imagem negativa da tela implantada, respectivamente, PP e PPC. Os vasos sanguíneos são as estruturas circulares identificadas pela coloração marrom, destacado com (x) azul. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Figura 7.** Análise da expressão imunorreativa do MMP-2 após 21 dias com marcação (tom marrom) mais intensa no grupo PP (**A**) que no grupo PPC (**B**). Imagens adquiridas com câmera Zeiss AxioCam ICC 1™ com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares representam a imagem negativa da tela implantada, destacadas com (x) negro e azul, respectivamente para PP e PPC. **AI e BI.** Recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V 4.8.0.0 Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e, a partir desta marcação, executa a o cálculo da área percentual e densidade média da marcação. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Figura 8.** Análise da expressão imunorreativa do MMP-3 (tom marrom), com diminuição da expressão no grupo PP ao longo do tempo: 7 dias (**A**); 14 dias (**B**); **90 dias (C)**. Imagens adquiridas com câmera Zeiss AxioCam ICC 1™ com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares representam a imagem negativa da tela implantada, destacadas com (x) negro. **AI, BI e CI.** Recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V 4.8.0.0 Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e, a partir desta marcação, executa a o cálculo da área percentual e densidade média da marcação. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

## LISTA DE GRÁFICOS

---

**Gráfico 1.** CD-31 (angiogênese) – demonstrando diferença significativa no número de vasos sanguíneos entre PP e PPC aos 14 dias. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Gráfico 2.** MMP-2 – demonstrando diferença significativa na densidade média de marcação entre PP e PPC aos 21 e 90 dias. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Gráfico 3.** MMP-3 – demonstrando diferença significativa na área percentual de marcação no grupo PP ao longo do tempo (entre 7 ou 14 x 90 dias). PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Gráfico 4.** MMP-3 – demonstrando diferença significativa na densidade média de marcação em ambos os grupos ao longo do tempo. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

# SUMÁRIO

---

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS .....	xv
INTRODUÇÃO .....	17
OBJETIVO .....	20
REVISÃO DE LITERATURA .....	22
MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
RESULTADOS .....	40
DISCUSSÃO .....	49
CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS .....	59
ANEXOS .....	65
APÊNDICES .....	67

# *Introdução*

---

O prolapso urogenital e a incontinência urinária têm sua prevalência e incidência elevadas com o decorrer da idade. Entre mulheres adultas, com sessenta anos ou mais, cerca de um terço possuem algum grau de prolapso urogenital (1). Da mesma forma, a incontinência urinária de esforço (IUE) é a forma mais comum de incontinência no sexo feminino, afetando até 30% das mulheres (2). Já prevalentes na atualidade, com o aumento da expectativa de vida e consequente envelhecimento populacional, essas afecções tendem a se tornar preocupação de saúde pública, uma vez que determinam grande impacto social, econômico e psicológico, sendo muitas vezes incapacitante. Por outro lado, a instituição de um tratamento adequado e bem sucedido pode melhorar a qualidade de vida e a auto-estima dessas mulheres (3, 4).

Diante de altas taxas de recidiva dos prolapso com a utilização das técnicas de correção tradicionais, exclusivamente com suturas (colporrafia anterior, Burch, colporrafia posterior, sacrospinhosopexia), o emprego de próteses (telas sintéticas) foi sugerido, testado e ganhou popularidade principalmente no tratamento da IUE, apresentando bons resultados e reprodutibilidade da técnica, além de diminuição do tempo cirúrgico e de recuperação pós-operatória, possibilitando retorno mais precoce da paciente às suas atividades habituais. As telas sintéticas mais utilizadas na atualidade são as de polipropileno, do Tipo I (de Amid) - macroporosas com poros maiores que  $75\mu\text{m}$  - diâmetro necessário para a passagem de macrófagos e fibroblastos, bem como à angiogênese e deposição de fibras colágenas (5).

Todavia, apesar das altas taxas de sucesso, o uso das telas sintéticas pode estar associado com algumas complicações, tais como: a) Infecção. b) Formação de Seromas. c) Retração cicatricial. d) Erosão e formação de fístulas (6). Tais complicações não podem ser negligenciadas, sendo a preocupação ainda maior na área da cirurgia reconstrutiva pélvica, em virtude dos potenciais efeitos adversos resultantes da interação da tela com a bexiga e o reto, bem como possíveis disfunções sexuais secundárias. Como prova disso, a agência norte-americana de regulamentação de produtos FDA (Food and Drug Administration) tem advertido acerca das altas taxas de complicações do uso de telas na correção dos prolapso urogenitais e recomendado cuidados no emprego desses produtos.

A busca por um produto sintético ideal que proporcione os melhores resultados com baixa morbidade tem sido motivo de inúmeros ensaios clínicos e estudos experimentais na

atualidade. A cobertura das telas com diversas substâncias tem sido testada, procurando-se obter maior biocompatibilidade e integração das próteses, tendo-se em vista que a maioria das complicações decorre de defeitos na integração tecidual. Titânio, prata, pericárdio bovino, submucosa intestinal suína (SIS) são alguns dos materiais já propostos para revestimento de telas atualmente (7-9).

O colágeno, principal proteína estrutural da matriz extracelular dos animais (10), é um importante modulador da resposta imuno-inflamatória, e tem sido apresentado como uma alternativa atraente de implante biológico, pelo potencial de determinar melhor integração e incorporação da tela aos tecidos adjacentes. Entretanto, tentativas prévias de combinação das telas com colágeno basearam-se na no emprego de membranas colágenas não porosas, resultando em tendência de encapsulamento da tela e falha (11-14).

A proposta de cobertura da tela de polipropileno com um gel de colágeno purificado, preparado a partir de colágeno do tipo I obtido de tendões bovinos (12), produzido no Laboratório de Biopolímero, Organização da Cromatina, Anisotropias Ópticas, Microsepectrofotometria, Análise de Imagens e Citoquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas já foi testada em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, do ponto de vista biomecânico e histológico, com análise do colágeno por microscopia de polarização, sugerindo melhora na organização molecular do colágeno neoformado em torno da tela implantada e vantagens biomecânicas (15).

O presente estudo se propôs à avançar e aprofundar a avaliação dos efeitos da cobertura de tela de polipropileno com o mesmo gel, com ênfase na resposta imuno-inflamatória, metabolismo do colágeno e angiogênese ao redor da tela implantada, avaliados por técnicas de imunohistoquímica.

## *Objetivo*

---

## **Objetivo Geral**

Estudar o efeito da impregnação do gel de colágeno na integração de telas de polipropileno monofilamentar implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas.

## **Objetivos Específicos**

- 1) Estudar as características da reação imuno-inflamatória e da citotoxicidade induzidas por telas de polipropileno recobertas por colágeno implantadas no tecido subcutâneo de ratas através da análise da expressão imunohistoquímica dos marcados IL-1 e TNF- $\alpha$ .
- 2) Estudar as alterações no metabolismo do colágeno neoformado de telas de polipropileno recobertas por colágeno implantadas no tecido subcutâneo de ratas através da análise da expressão imunohistoquímica das metaloproteinases MMP-2 e MMP-3.
- 3) Avaliar o impacto do recobrimento das telas com colágeno na angiogênese, através da análise da expressão imunohistoquímica do antígeno de superfície CD-31.

# *Revisão da Literatura*

---

## **Aspectos Gerais sobre Prolapso Urogenital e Incontinência Urinária**

As vísceras pélvicas femininas são sustentadas pelos músculos do assoalho pélvico, que também atuam de forma ativa e sinérgica ao aparelho esfíncteriano intrínseco da uretra durante a micção. São constituídos por agrupamentos musculares identificados como diafragma pélvico e urogenital. O enfraquecimento, distensão e/ou o rompimento das estruturas que compõem o diafragma pélvico levam aos prolapso urogenitais, os quais estão associados à diminuição dos níveis de estrógeno, ao aumento da idade, a partos traumáticos, ao esforço abdominal repetitivo, entre outros fatores (16).

O prolapso urogenital e a incontinência urinária têm sua prevalência e incidência elevadas com o decorrer da idade. Entre mulheres adultas, relativamente saudáveis, com sessenta anos ou mais, cerca de um terço possuem algum grau de prolapso urogenital (1). Da mesma forma, a IUE é a forma mais comum de incontinência no sexo feminino, afetando até 30% das mulheres. Cerca de 10% delas apresentam perdas urinárias semanais e uma em cada 1000 mulheres acabarão necessitando de tratamento cirúrgico (2).

IUE e os prolapso vaginais representam afecções de grande impacto social, econômico e psicológico, sendo muitas vezes incapacitantes. Por outro lado, a instituição de um tratamento adequado e bem sucedido pode melhorar a qualidade de vida e a auto-estima dessas mulheres (3,4).

### **Uso de telas na cirurgia pélvica reconstrutiva**

Diversos tratamentos cirúrgicos baseados em técnicas de correção exclusivamente com suturas já foram utilizados com o intuito de corrigir os prolapso urogenitais, mas a eficácia não tem sido satisfatória em seguimento prolongado (17). Estudos indicam que tais técnicas apresentam altas taxas de recorrência e muitas vezes não solucionam os sintomas apresentados, como a incontinência e a dispareunia. Segundo dados, há recidiva do prolapso anterior de cerca

de 60% após colporrafia anterior e de 20% após colposuspensão de Burch (18). A correção sítio específica também apresentou complicações como obstrução ureteral bilateral, hematoma retropúbico, abscessos vaginais, entre outros (19). A sacroespinhosopexia pode apresentar taxas de recorrência e complicações significativas, assim como a abordagem transanal da retocele, que pode acarretar incontinência de gases e fezes, dor anal, estreitamento retal e fistulas retovaginais (20, 21). Da mesma forma, a colporrafia posterior se associa a taxas de recorrência de 18% a 24% após um ano do procedimento (22).

Fundamentada pela Teoria Integral, Petros e Ulmsten, em 1996, propuseram a colocação de um dispositivo suburetral, na topografia da uretra média, objetivando a estabilização da uretra durante o esforço. Esse procedimento ficou conhecido como TVT (Tension-free vaginal Tape) e tornou-se mundialmente reconhecido (23, 24). Bons resultados e reprodutibilidade da técnica a tornaram padrão-ouro para o tratamento da IUE. A experiência com os slings sintéticos impulsionou o desenvolvimento de próteses sintéticas para correção dos prolapsos vaginais. Ademais, o emprego de próteses (telas) permitiria maior padronização dos procedimentos e diminuição do tempo cirúrgico e de recuperação pós-operatória, possibilitando retorno mais precoce da paciente às suas atividades habituais.

Dessa forma, uma grande variedade de biomateriais passou a ser proposta para emprego na reconstrução do assoalho pélvico. As próteses sintéticas mais utilizadas atualmente são as de polipropileno. O advento do uso de telas sintéticas expandiu as opções para tratamento dos prolapsos dos órgãos pélvicos, sendo desafiadora a escolha do material mais adequado. As telas sintéticas mais utilizadas no momento são as Tipo I (de Amid) - telas macroporosas com poros maiores que 75 $\mu$ m – diâmetro necessário para a passagem de macrófagos e fibroblastos, bem como a angiogênese e deposição de fibras colágenas (5).

### **Complicações associadas ao uso de telas sintéticas**

Apesar das altas taxas de sucesso, o emprego das telas sintéticas pode estar associado com algumas complicações, tendo sido as mais comuns listadas por Cervigni (6): a) Infecção. Taxas de infecção variam de 9,6% a 50% nas telas dos tipos II e III e são raras nas telas do tipo I. b) Formação de Seromas. Gerados pela reação inflamatória local e pelo espaço morto deixado entre os tecidos e a tela. Telas dos tipos I e III permitem a rápida penetração da matriz extracelular em seus macroporos, minimizando esse risco. Telas do tipo II têm risco de formação de seromas que varia de 9,6% a 14,3%. c) Retração cicatricial. Após a formação da cicatriz, pode ocorrer retração da tela em até 20%. Tal reação pode ser desejada ou inconveniente, quando causa efeitos compressivos ou obstrutivos. d) Erosão e formação de fistulas. Uma perigosa reação às telas é a erosão de órgãos ocos contíguos (principalmente bexiga, intestino e vagina). Tal complicação já foi relatada entre seis semanas e seis anos após a cirurgia. Na literatura são descritas taxas de erosão da tela variando entre 2,8% e 20%. Estudos prévios sobre a integração das telas sintéticas no reparo de prolapso genitais permitiram determinar que fatores locais, como trofismo tecidual, infecção e a técnica cirúrgica, estão diretamente relacionados às taxas de extrusão (25). Além disso, a integração tecidual está relacionada às características das telas como o peso, a estrutura e a porosidade das mesmas (26, 27).

### **Biocompatibilidade e a integração das telas**

Muitas das complicações associadas ao uso de telas sintéticas parecem estar associadas a defeitos de integração, com presença de resposta inflamatória intensa ou prolongada ou ainda deposição inadequada de colágeno neoformado (7).

Nesse contexto, cresce a importância da compreensão do termo biocompatibilidade, que basicamente consiste na reação de corpo estranho desencadeada no hospedeiro pelo implante da tela. Trata-se de um processo dinâmico influenciado por diversas variáveis relacionadas às características e propriedades do material implantado. Foram observadas, por exemplo, diferenças clínicas significativas entre as telas de polipropileno monofilamentar e

multifilamentar (28). Considera-se que tais diferenças podem determinar alterações na sua biocompatibilidade e, conseqüentemente, na tendência à infecção, erosão e extrusão vaginal (29).

Recentemente, inúmeras estratégias têm sido desenvolvidas e estudadas procurando a obtenção de um biomaterial que desempenhe seu papel de sustentação e, simultaneamente, favoreça a integração tecidual. Tais estratégias incluem: modificação ou adição de determinado polímero; alterações do peso estrutura filamentar ou tamanho dos poros. Existe um crescente empenho na pesquisa de próteses com a menor quantidade de material sintético possível, sem que haja comprometimento da sua capacidade de sustentação das vísceras pélvicas (7).

A utilização de agentes como revestimento ou cobertura de próteses fundamenta-se na habilidade desses em mascarar a superfície do material recoberto mediante a criação de uma interface hifrofílica com propriedades favoráveis à biocompatibilidade. Dessa forma, postula-se que tais revestimentos exerçam uma modulação, de maneira benéfica, nas interações teciduais tela/hospedeiro. (30, 31). Diversos agentes tem sido estudados, sejam naturais ou polímeros sintéticos (32), com resultados conflitantes até o momento.

### **Colágeno e a integração das telas**

O colágeno é a principal proteína estrutural da matriz extracelular dos animais, representando uma alternativa atraente de implante biológico (11). Sob a microscopia óptica, a porção colagênica da matriz extracelular é formada por numerosos feixes de filamentos, denominados fibrilas. As fibrilas de colágeno são constituídas por moléculas de tropocolágeno, agregadas segundo um arranjo supramolecular helicoidal característico (33). As moléculas de tropocolágeno são constituídas por três cadeias polipeptídicas, entre as quais ocorrem ligações cruzadas intermoleculares de natureza covalente, responsáveis pela estabilidade bioquímica da molécula (34). Diferenças entre as cadeias polipeptídicas caracterizam pelo menos cinco moléculas de colágeno identificadas, que são classificadas de I a V, de acordo com as cadeias que as compõem (33). As ligações intermoleculares concentram-se nas extremidades não-

helicoidais das moléculas de tropocolágeno, também denominadas, de acordo com sua composição bioquímica, de regiões telopeptídicas ou porções carboxi e amino terminais (35).

Nas diferentes espécies de mamíferos ocorreram, durante a evolução, algumas variações na quantidade e na seqüência dos aminoácidos da cadeia polipeptídica do colágeno. No entanto, a composição essencial e o arranjo supramolecular característico desta proteína fibrosa foram preservados, contribuindo para o baixo potencial imunogênico e permitindo sua utilização como xenoenxerto (36).

Os primeiros estudos sobre a antigenicidade do colágeno foram conduzidos por Davison *et al* (37). Os principais determinantes antigênicos tipo-específicos e espécie-específicos do colágeno localizam-se nas porções telopeptídicas amino terminal e carboxi terminal da proteína, em especial na cadeia alfa 2 (38). A remoção seletiva destas regiões através da solubilização em pepsina, apesar de reduzir o potencial antigênico de forma significativa, resulta na diminuição da estabilidade molecular, uma vez que as ligações intermoleculares naturais concentram-se nestas regiões (10). Assim, a introdução artificial de ligações intermoleculares tem a finalidade de prolongar a sobrevida do enxerto, diminuindo a resposta imune celular do hospedeiro (36). O glutaraldeído representa, até o momento, a substância mais utilizada com esta finalidade (39). Através de processos químicos, enzimáticos ou mesmo com irradiação UV (ultravioleta), o colágeno pode ser adicionado a um polímero de modo a melhorar suas características mecânicas (40).

O colágeno tipo I tem sido proposto como possível candidato ao recobrimento de telas de polipropileno devido às suas características biológicas únicas com excelente biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (7). O uso de colágeno derivado de tendão bovino já tem sido utilizado no tratamento de diversas doenças como lesões ortopédicas e axonais, entre outras (8, 41, 42). Entretanto, seu emprego no tratamento cirúrgico dos prolapsos vaginais não se encontra ainda estabelecido, pois tentativas anteriores para combinar malhas e colágeno foram baseadas no recobrimento com membranas colágenas não porosas, que resultaram na encapsulação da tela e falha do procedimento (12-14).

## **Aspectos imunohistoquímicos da reação inflamatória e do metabolismo do colágeno**

O estudo imunohistoquímico compreende o processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada. Esta técnica utiliza a especificidade de ligação dos anticorpos para se ligarem a sequências únicas de aminoácidos nas proteínas. Seu princípio básico consiste na marcação do anticorpo de detecção com uma substância fluorescente, elemento radioativo, ouro coloidal ou enzima. Neste último caso, as amostras são incubadas com substratos enzimáticos, produzindo um produto que sofre precipitação direta no corte histológico, gerando uma coloração castanha ou vermelha, que reflete a distribuição do antígeno alvo no tecido/célula analisado (43).

Apesar de ser um método relativamente simples, a imunohistoquímica tem certas particularidades e seu resultado é influenciado por diversos fatores, como a fixação do espécime, a escolha dos anticorpos a serem analisados em cada caso, as reações propriamente ditas, e, por fim, a interpretação das lâminas (44).

A imunohistoquímica tem aplicação prática na detecção de doenças infecciosas (virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias), na classificação histogenética e de diferenciação de células neoplásicas, na pesquisa de biomarcadores em neoplasias, assim como na pesquisa de enzimas particulares de determinados órgãos em metástases neoplásicas de origem desconhecida, bem como em diversos campos de pesquisa clínica, por exemplo, no estudo dos processos imuno-inflamatórios e do metabolismo do colágeno (45).

Acerca do metabolismo do colágeno, as metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) são parte de uma grande família de enzimas essenciais no processo de reparo tecidual e cicatrização (46). Assim, no processo fisiológico de cicatrização de feridas, as MMPs são produzidas por células inflamatórias ativadas (neutrófilos e macrófagos), bem como células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais. Essas enzimas participam do processo de desbridamento da matriz extracelular desvitalizada, angiogênese, reepitelização, contração da ferida e remodelamento cicatricial (47). Entretanto, há indícios clínicos de que níveis

cronicamente elevados de MMPs podem atrapalhar o processo cicatricial, sendo que tratamentos visando a diminuição da atividade das MMPs podem ser úteis no processo de finalização da cicatrização de feridas (48). Dessa forma, pode-se desprender que a atividade das MMPs pode ser útil ou deletéria, a depender se sua expressão, duração e do local onde sua atividade seja verificada (49).

# *Material e Métodos*

## Amostra e Materiais

Foram utilizadas ratas fêmeas da raça Wistar pesando entre 150g e 200g, e com idade de 8 semanas. As ratas foram fornecidas pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, e permaneceram no biotério desta instituição, alojadas em gaiolas contendo cinco animais cada, sob condições ideais de temperatura, umidade e luz, sendo alimentadas com ração *ad libitum* e água. Os animais foram observados por trinta (30) dias, anteriormente ao início do estudo, a fim de excluir doenças próprias desta espécie.

Foram selecionadas 20 ratas adultas, nas quais foram implantadas, de um lado da sua parede abdominal, na interface entre a hipoderme e a fáscia anterior da musculatura abdominal, uma tela de polipropileno monofilamentar medindo 10 x 20 mm (grupo P) e, do outro lado uma tela semelhante recoberta com gel de colágeno (grupo PPC) (Figura 1). As telas foram implantadas de maneira aleatória (por sorteio) e nenhuma forma de fixação foi utilizada.

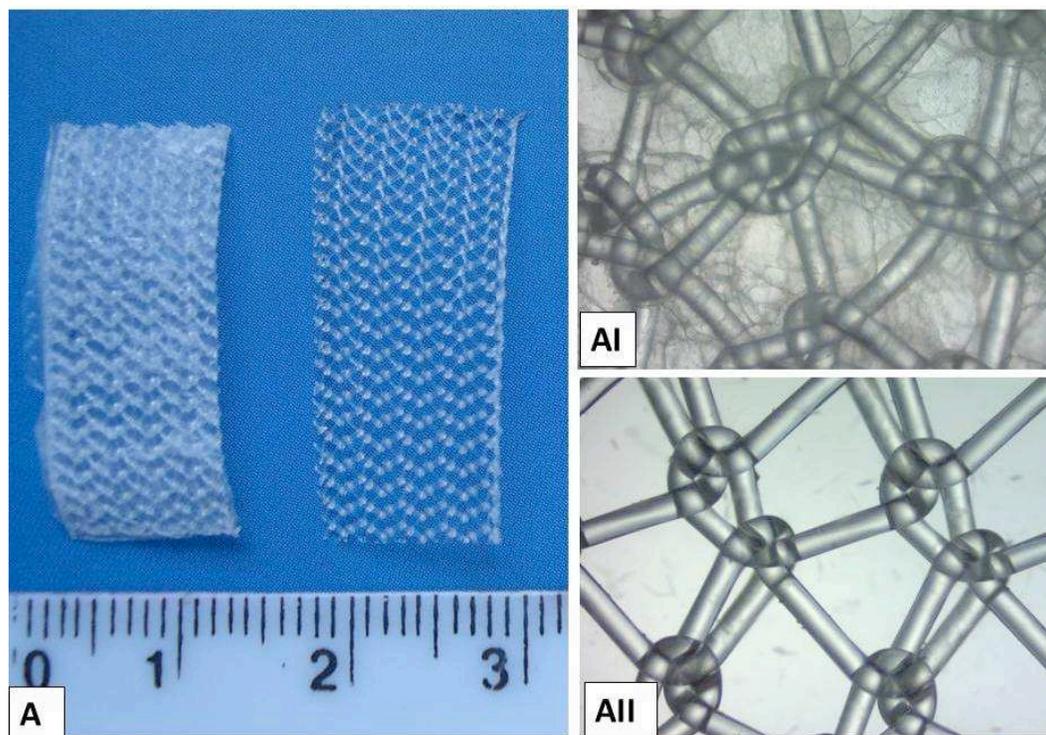
As telas utilizadas foram cedidas pela empresa Promedon (Argentina), consistindo em tela de polipropileno, com as mesmas características das presentes nos kits comercializados no nosso meio NAZCA TC<sup>TM</sup> e Calistar A<sup>TM</sup>.

O gel de colágeno utilizado para o recobrimento das telas foi o gel purificado de colágeno tipo I, produzido no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas pelo Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal (12) proveniente de tendão bovino. Sua obtenção baseou-se no princípio da auto-agregação espontânea das macromoléculas, que garante uma organização supramolecular característica quando fragmentos da molécula original são submetidos a determinadas condições físico-químicas.

Inicialmente, o preparado de colágeno foi submetido a rigoroso processo de purificação, de desenvolvimento próprio, para eliminar as porções imunogênicas telopeptídicas (50, 51). O processo de solubilização consistiu na refrigeração, por período de 24 horas, dos tendões dissecados imersos em solução aquosa, contendo 0,01% de ácido clorídrico e 1 mg de pepsina por grama de tecido. O colágeno obtido foi então reconstituído pela adição de solução de cloreto

de sódio (NaCl 0,9 %) até a concentração final de 5 %. A seguir, esta solução foi estabilizada através de diálise prolongada em água destilada, por período de cinco a sete dias. Esse procedimento objetivou a obtenção de um gel de colágeno com características reológicas, visando facilitar sua adesão aos tecidos circunvizinhos da tela implantada na parede abdominal de ratas adultas.

A esterilização do colágeno foi realizada através do método de irradiação com raios gama na dose de 2,5 Mrads, com o objetivo de preservar a estabilidade estrutural das moléculas (36).



**Figura 1.** A. Visão macroscópica (Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2 ): à esquerda a tela de polipropileno revestida com colágeno purificado bovino e, à direita, a tela de polipropileno monofilamentar. AI e AII. Microscopia óptica, 4 X 0,65 - “Primo Star” (Carl Zeiss)- AI: tela de polipropileno revestida; AII: tela de polipropileno - Foto gentilmente cedida por Siniscalchi et al (15).

## **Etapas experimentais**

- a. Terminado o prazo de observação, as ratas foram levadas para o laboratório do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP.
- b. As ratas foram submetidas a procedimentos pré-operatórios com restrição alimentar a sólidos por 4 horas antes da cirurgia.
- c. Anestesia com 1,5 ml de Hypnol 30%, administrado através de punção da veia caudal com *butterfly* 23 Gauges. Manutenção do nível anestésico com administração complementar de 0,5 a 1,0 ml, de acordo com a necessidade.
- d. Imobilização das ratas em decúbito dorsal horizontal, seguida por tricotomia e antissepsia do abdome com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo (10%) e colocação de um campo estéril delimitando a área cirúrgica.
- e. As ratas, já anestesiadas, foram submetidas ao ato cirúrgico que consistiu em: realização de incisão transversa na região inferior do abdômen, até atingir o subcutâneo, que foi, então, divulsionado para o implante das telas sobre a fáscia da musculatura abdominal, na sua região mediana, de forma padronizada em todos os animais (Figura 2A). Após o implante das telas de polipropileno, a pele foi suturada, tomando-se o cuidado de evitar que a tela ficasse em contato direto com a sutura da pele.
- f. Após o procedimento cirúrgico, após recuperação anestésica, as ratas foram levadas ao biotério da instituição, em suas gaiolas, onde permaneceram sob condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação, até o momento do sacrifício. A analgesia pós-operatória, quando necessária, foi realizada com solução de dipirona intramuscular, na dose de 15 mg/kg por dose.

## **Coleta dos Espécimes**

Após decorrido o período de observação foi realizada, com dose letal de anestésico, eutanásia dos animais, os quais foram divididos em quatro subgrupos:

Subgrupo 1: 5 ratas eutanaziadas 7 dias após o implante das telas;

Subgrupo 2: 5 ratas eutanaziadas 14 dias após o implante das telas;

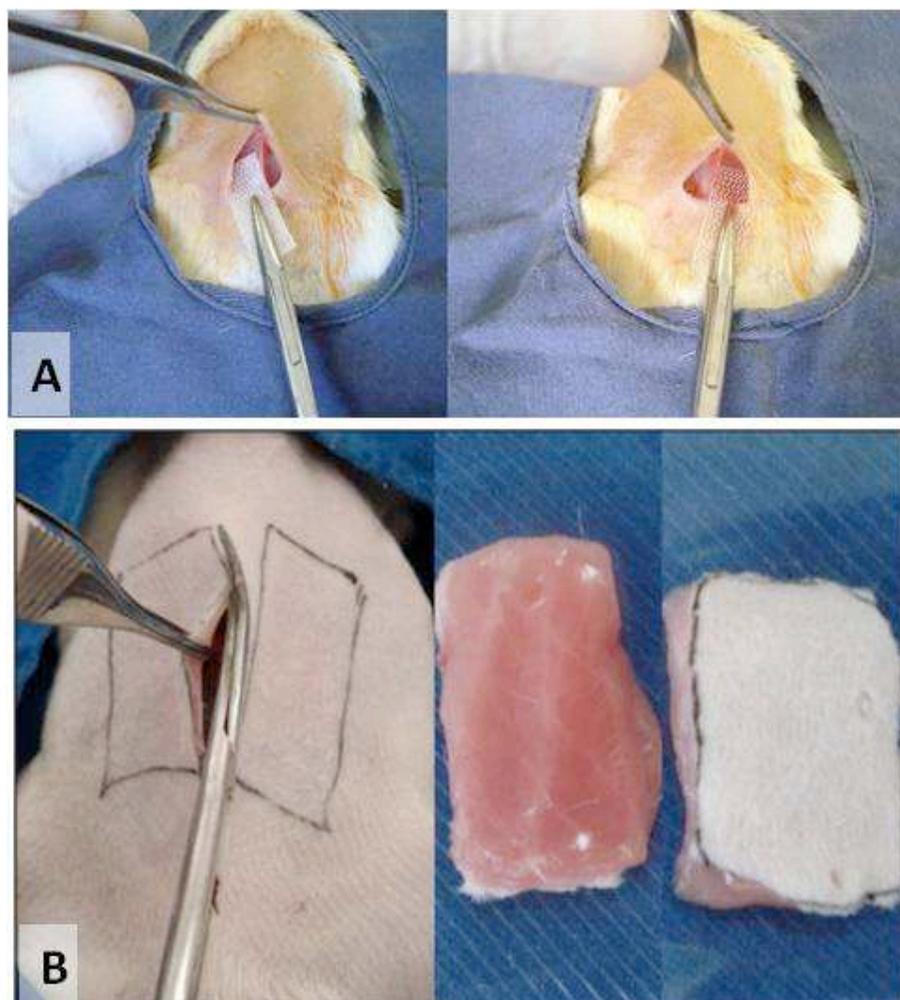
Subgrupo 3: 5 ratas eutanaziadas 21 dias após o implante das telas;

Subgrupo 4: 5 ratas eutanaziadas 90 dias após o implante das telas.

A retirada em bloco da parede abdominal foi realizada de forma asséptica, e de maneira a preservar as relações anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio (Figura 2B). Em seguida, as amostras de tecido tiveram suas extremidades presas, com alfinetes, em placas de material rígido, de forma a impedir retrações e dobras durante a fixação e desidratação do material, o que poderia dificultar a análise anatomopatológica adequada.

A fixação tecidual foi realizada depositando-se as amostras em recipiente contendo formaldeído 10%, no qual permaneceram por 24 horas. Após esse período, as peças foram transferidas para solução de álcool a 70%. A seguir, as regiões com os implantes foram identificadas e separadas, de forma a se obter retângulos de 10 mm por 10 mm. Cada fragmento quadrangular foi, então, cortado em retângulos menores, de 10 mm por 2 mm. Estes fragmentos menores foram depositados em caixetas plásticas apropriadas para a inclusão em parafina. Cada caixeta foi identificada com um número de 1 a 5, com a especificação do tipo de material (grupo tela sem gel e com gel) e do tempo de eutanásia (7, 14, 21 e 90 dias).

Após essa etapa, foram confeccionadas lâminas com 5 µm de espessura, no micrótomo *Hyrax M60* (*Zeiss, Munique, Alemanha*). Os blocos e lâminas foram confeccionados pelo Laboratório de Patologia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas.



**Figura 2.** Etapa Experimental. **A.** Implante padronizado das telas, a cada lado da parede abdominal, separados pela linha alba entre a hipoderme e a fáscia anterior da musculatura abdominal. **B.** No momento da eutanásia, retirada em bloco da parede abdominal preservando as relações anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio. Foto gentilmente cedida por Siniscalchi et al (15).

### **Preparo das lâminas e Aplicação de Marcadores para Avaliação Imunohistoquímica**

As lâminas foram devidamente silanizadas no Laboratório de Patologia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas.

A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6.0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo.

O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina de soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente.

Posteriormente, os antígenos MMP-2, MMP-3, CD31, TNF- $\alpha$  e IL-1 foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* ab37150 (*ABCAM*, EUA) para MMP-2, policlonal *rabbit* ab53015 (*ABCAM*, EUA) para MMP-3, monoclonal *mouse* MAB1393 (*MILLIPORE*, EUA) para CD-31, policlonal *rabbit* ab19139 (*ABCAM*, EUA) para TNF- $\alpha$  e policlonal *rabbit* sc-7884 (*Santa Cruz Biotchenollogy*, EUA) para IL-1 diluídos (1:150; 1:200; 1:100; 1:200; 1:200, 1:250, respectivamente) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C.

### **Análise Histológica e Aquisição das Imagens**

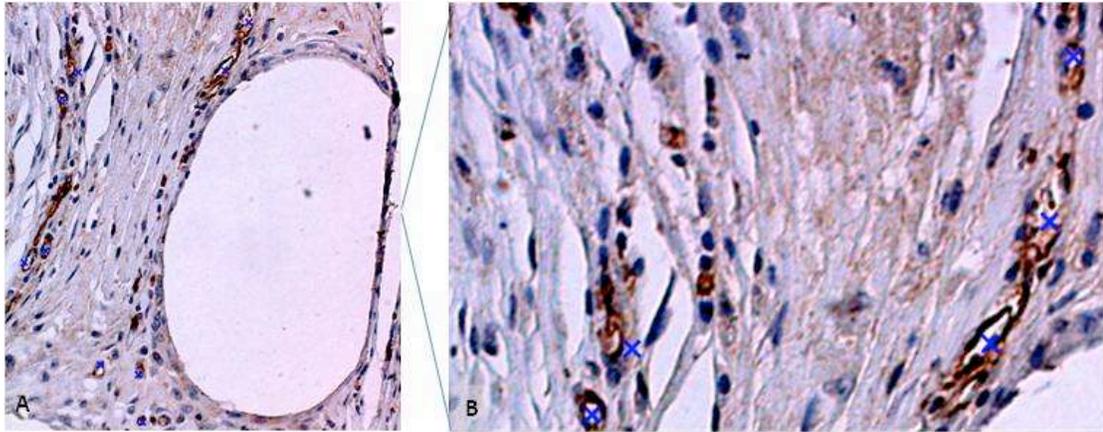
A avaliação histológica foi realizada de microscópio Zeiss Primo Star <sup>TM</sup> (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany), sendo avaliado por um único pesquisador, de maneira “cega”, ou seja, sem saber qual grupo ou período estava sendo avaliado. Todos os campos da lâmina eram visualizados com magnificação de 10x, sendo selecionadas as três áreas com maior intensidade de marcação para registro de imagem com aumento de 20x (Figura 3). A aquisição das imagens foi realizada utilizando câmera Zeiss AxioCam ICC 1 <sup>TM</sup>.



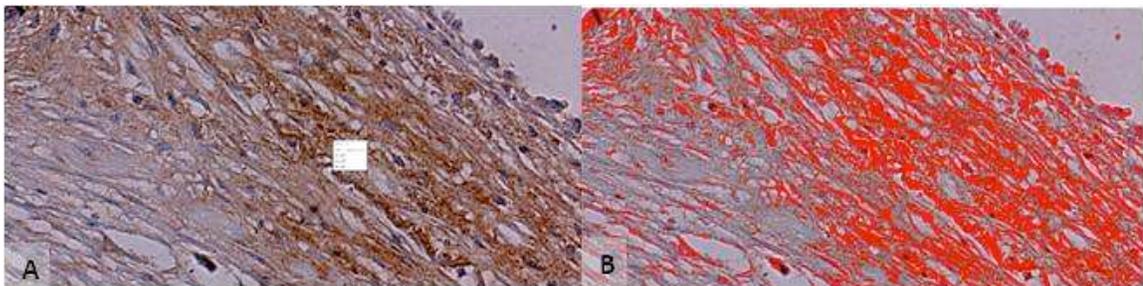
**Figura 3.** Avaliação Histológica das lâminas em aumento de 5x, 10x e 20x. A aquisição das imagens foi realizada utilizando câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup>. No aumento de 5x, delimitação da hipoderme (linha negra), tecido reacional peri implante da tela (linha vermelha) e tecido muscular (linha verde). As áreas circulares brancas destacadas com triângulo azul representam a imagem negativa da tela implantada.

### **Análise das Imunorreatividades**

As análises quantitativas das imunorreatividades foi realizada através do Software AxioVision Microscope V 4.8.0.0 (Karl Zeiss-Germany). Este programa de análise de imagens permite a avaliação de maneira objetiva e sistematizada, sendo que para cada marcador (exceto CD-31), foram avaliados, individualmente em cada uma das fotos, 2 quesitos: (a) a área percentual de marcação; (b) a densidade média de marcação. (figuras 2b). Enquanto o valor da área representa a extensão da imunorreatividade, a densidade média define a intensidade da marcação. O Software AxioVision Microscope V 4.8.0.0 (Karl Zeiss-Germany) disponibiliza recursos para delimitação e realce das áreas coradas pelas técnicas de imunohistoquímica e fornece automaticamente os valores desejados da área percentual e da densidade média de marcação. (figura 5). Os valores finais de cada quesito em cada lâmina avaliada consistiram na média dos valores registrados para cada uma das três áreas fotografadas. Para análise da reatividade ao CD-31 foi realizada a contagem do número de vasos visibilizados no campo de análise (figura 4).



**Figura 4.** Análise da expressão do CD-31 para estudo da angiogênese na área ao redor da tela implantada, **A-** Imagem adquirida com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x.com identificação dos vasos sanguíneos corados em marrom. **B.** Ampliação da imagem, sendo evidenciado em azul, destaque para a contagem de vasos, recurso disponível no Software analisador de imagens utilizado AxioVision Microscope V 4.8.0.0 (Karl Zeiss-Germany).



**Figura 5 .** Análise das Imunorreatividades. **A.** Imagen adquirida com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x, demonstrando, como exemplom a análise da expressão da IL-1, corada em marrom. **B.** Representa um recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V 4.8.0.0 Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e a partir desta marcação executa automaticamente o cálculo da área percentual e densidade média da marcação.

## **Análise Estatística**

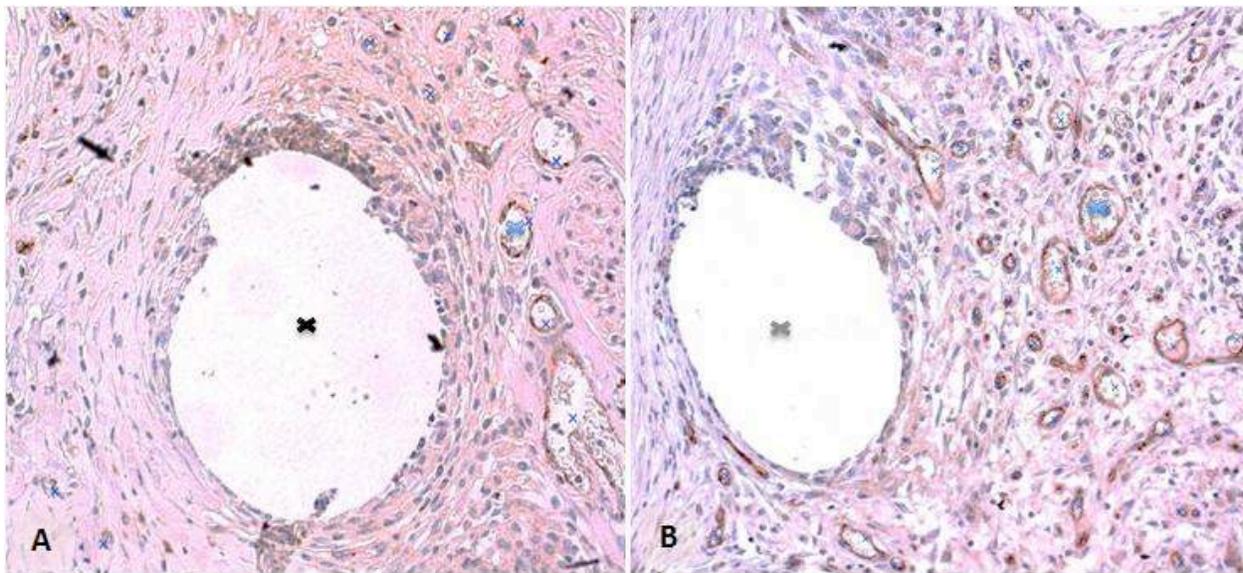
Para comparação das medidas entre períodos e grupos foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA for repeated measures), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey para comparar os quatro períodos, e o teste de perfil por contrastes para comparar as variáveis entre os dois grupos em cada dia. As variáveis foram transformadas em postos (ranks) devido à ausência de distribuição Normal. O nível de significância adotado foi de 5% ( $P < 0.05$ ). Foi utilizado o programa computacional The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

# *Resultados*

---

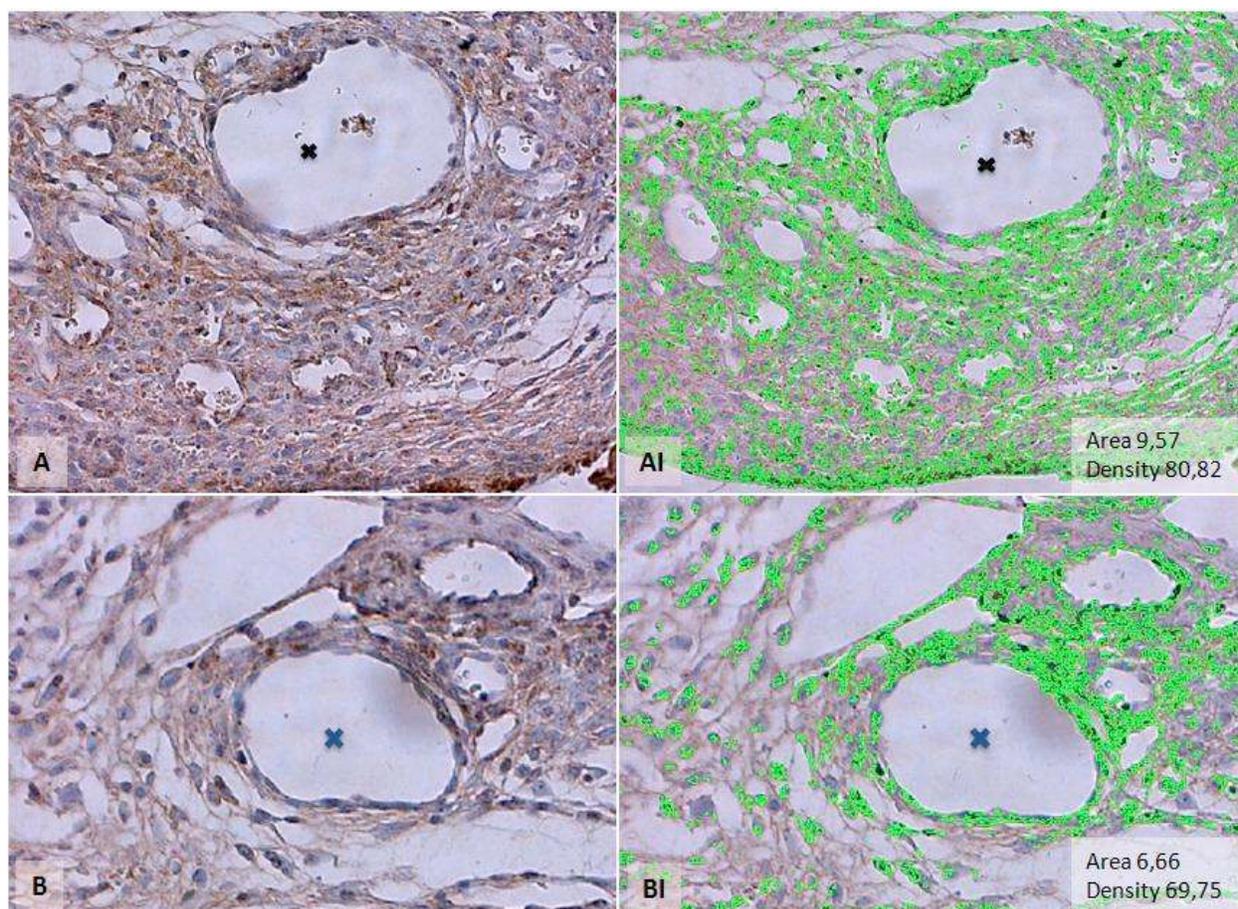
A análise comparativa entre os dois grupos de estudo (PP e PPC) e os subgrupos (7, 14, 21 e 90 dias) apresentou os seguintes resultados (Figuras 6-8; Tabelas 1-3; Gráficos 1-4).

**Angiogênese.** Houve maior concentração de vasos sanguíneos no grupo PPC, em comparação com PP, após 14 dias do implante ( $p=0.002$ ) (Figura 6), com diminuição significativa após 90 dias ( $p=0.002$ ) no grupo PPC (Gráfico 1).



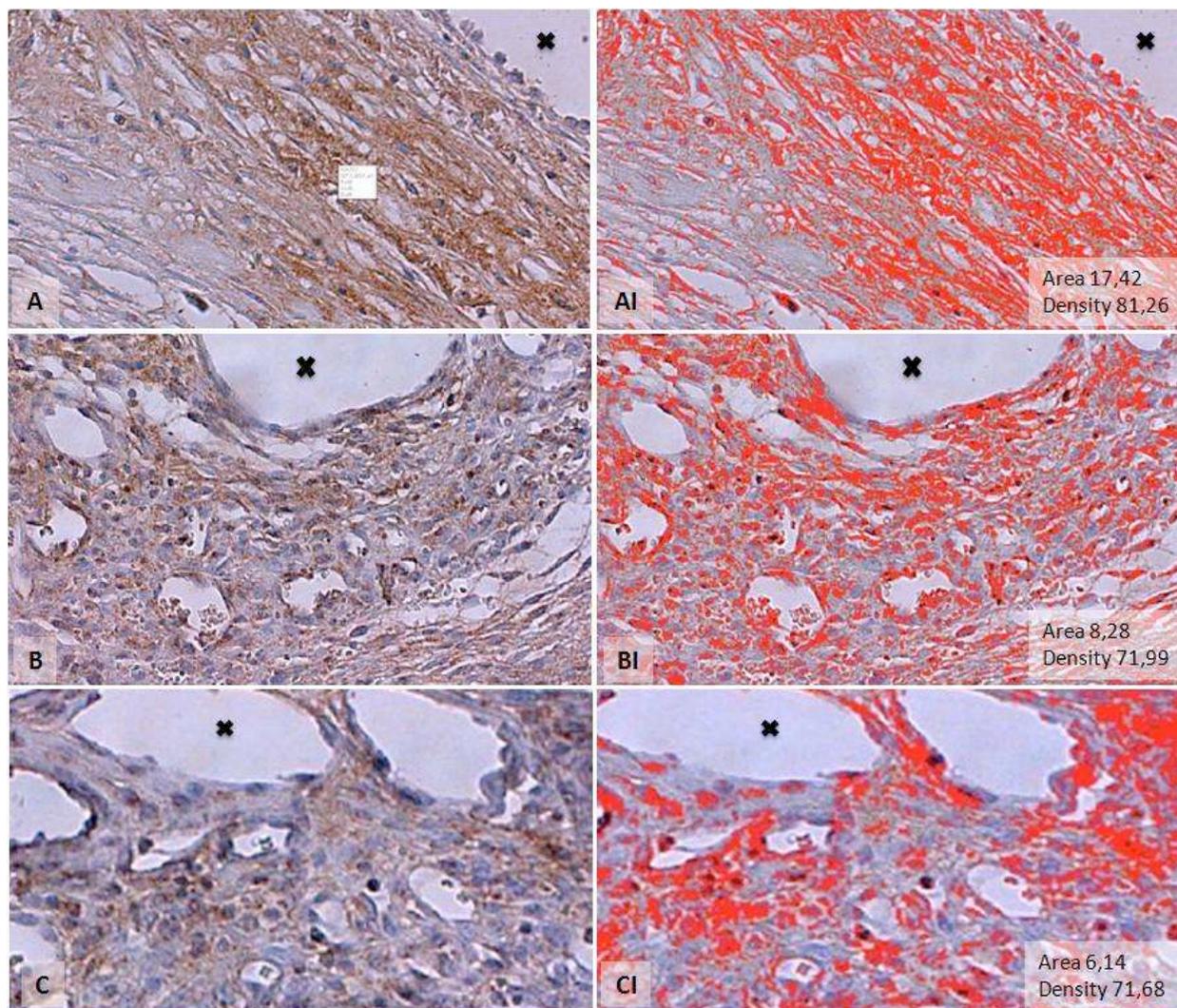
**Figura 6.** Análise da expressão do CD-31 após 14 dias, sendo observada maior concentração de vasos sanguíneos no grupo PPC (**B**), em comparação com o grupo PP (**A**). Imagens adquiridas com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares centrais marcadas com (x) negro e cinza representam a imagem negativa da tela implantada, respectivamente, PP e PPC. Os vasos sanguíneos são as estruturas circulares identificadas pela coloração marrom, destacado com (x) azul. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Metabolismo do colágeno.** A densidade média do MMP-2 no grupo PPC foi significativamente menor que no PP após 21 dias e 90 dias ( $p=0.046$ ) (Figura 7; Gráfico 2). Já o MMP-3 manteve-se mais estável no grupo PPC ao longo do tempo, sendo que a área percentual imunorreativa decresceu, de forma significativa, apenas no grupo PP após 14 e 90 dias ( $p=0.017$ ), e a densidade média atenuou-se após 21 dias neste grupo, mas apenas após 90 dias no grupo PPC ( $p<0.001$ ) (Figura 8; Gráficos 3 e 4).



**Figura 7.** Análise da expressão imunorreativa do MMP-2 após 21 dias com marcação (tom marrom) mais intensa no grupo PP (A) que no grupo PPC (B). Imagens adquiridas com câmera Zeiss AxioCam ICC 1<sup>TM</sup> com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares representam a imagem negativa da tela implantada, destacadas com (x) negro e azul, respectivamente para PP e PPC. AI e BI. Recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V

4.8.0.0 Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e, a partir desta marcação, executa o cálculo da área percentual e densidade média da marcação. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.



**Figura 8.** Análise da expressão imunorreativa do MMP-3 (tom marrom), com diminuição da expressão no grupo PP ao longo do tempo: 7 dias (A); 14 dias (B); 90 dias (C). Imagens adquiridas com câmera Zeiss AxioCam ICC 1™ com magnificação de 20x. As áreas brancas circulares representam a imagem negativa da tela implantada, destacadas com (x) negro. AI, BI e CI. Recurso especial do Software analisador de imagens AxioVision Microscope V 4.8.0.0

Software (Karl Zeiss-Germany), que destaca as áreas coradas e, a partir desta marcação, executa a o cálculo da área percentual e densidade média da marcação. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

**Resposta imunológica (IL-1).** Não houve diferença significativa entre os grupos, no que se refere a densidade média ( $p=0.313$ ) e área percentual reativa ( $p=0.635$ ).

**Citotoxicidade (TNF- $\alpha$ ).** Não houve diferença significativa entre os grupos, seja na densidade média ( $p=0.726$ ) ou na área percentual reativa ( $p=0.866$ ).

Vale ressaltar que não foram observadas nos animais da amostra, em ambos os grupos, quaisquer complicações infecciosas ou mesmo áreas de exposição ou extrusão da tela durante o período de avaliação. Não houve óbitos.

**Tabela 1. Avaliação Imunohistoquímica da Angiogênese (CD-31) – Média do número de vasos sanguíneos por campo**

	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>21</b>	<b>90</b>
<b>PP</b>	25.82	14.44	15.58	7.30
<b>PPC</b>	29.90	29.88	23.24	8.64

PP: grupo com inserção da tela de polipropileno

PPC: grupo com implante de tela de polipropileno revestida com gel purificado de colágeno

CD-31: Antígeno de superfície CD-31

**Tabela 2. Expressões de IL-1, TFN- $\alpha$ , MMP2, MMP-3 (Area -  $\mu\text{m}^2$  e Densidade Médias)**

	7		14		21		90	
	Área	Dens	Área	Dens	Área	Dens	Área	Dens
<b>IL-1</b>								
PP	41.28	82.76	29.28	79.54	27.42	78.58	17.75	72.87
PPC	32.45	81.28	21.72	79.80	36.47	79.54	22.11	76.77
<b>TFN-<math>\alpha</math></b>								
PP	6.43	59.03	4.30	58.15	4.22	76.94	5.82	68.43
PPC	7.03	65.97	5.05	53.33	3.83	58.75	8.61	66.43
<b>MMP-2</b>								
PP	10.40	75.59	7.46	76.16	9.57	80.82	9.64	85.86
PPC	11.14	80.91	11.79	74.61	6.66	69.75	8.64	74.72
<b>MMP-3</b>								
PP	17.42	81.26	6.78	80.60	8.28	71.99	6.14	71.68
PPC	7.54	84.45	7.00	79.13	11.18	73.10	5.49	66.37

Dens: Densidade média de marcação

Área: área percentual média de marcação

PP: grupo com inserção da tela de polipropileno

PPC: grupo com implante de tela de polipropileno revestida com gel purificado de colágeno

IL-1: Interleucina -1

MMP-2: Metaloproteinase - 2

MMP-3: Metaloproteinase - 3

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral – alpha

**Tabela 3. Resultados das ANOVA para medidas repetidas para comparação das variáveis entre períodos (7, 14, 21 e 90 dias) e grupos (PP e PPC) \***

<b>Variável</b>	<b>Comparação entre períodos (p)</b>	<b>Comparação entre grupos (p)</b>
<b>CD-31 (vasos)</b>	<b>0.002 (a)</b>	<b>0.002 (b)</b>
<b>IL-1 área</b>	0.762	0.866
<b>IL-1 densidade</b>	0.245	0.726
<b>MMP-2 área</b>	0.947	0.807
<b>MMP-2 densidade</b>	0.496	<b>0.046 (c)</b>
<b>MMP-3 área</b>	<b>0.017 (d)</b>	0.310
<b>MMP-3 densidade</b>	<b>p&lt;0.001 (e)</b>	0.779
<b>TNF-<math>\alpha</math> área</b>	0.280	0.635
<b>TNF-<math>\alpha</math> densidade</b>	0.155	0.313

(a) 7 $\neq$ 90, 14 $\neq$ 90, 21 $\neq$ 90 no grupo PPC / Poder do teste: 95%

(b) PP $\neq$ PPC, dia 14/ Poder do teste: 95%

(c) PP $\neq$ PPC, dias 21 e 90/ Poder do teste: 53%

(d) 7 $\neq$ 14, 7 $\neq$ 90 no grupo PP/ Poder do teste: 79%

(e) 7 $\neq$ 21, 7 $\neq$ 90, 14 $\neq$ 21, 14 $\neq$ 90 no grupo PP; 7 $\neq$ 90, 14 $\neq$ 90 no grupo PPC / poder do teste: 99%

Densidade: Densidade média de marcação

Área: área percentual média de marcação

PP: grupo com inserção da tela de polipropileno

PPC: grupo com implante de tela de polipropileno revestida com gel purificado de colágeno

IL-1: Interleucina - 1

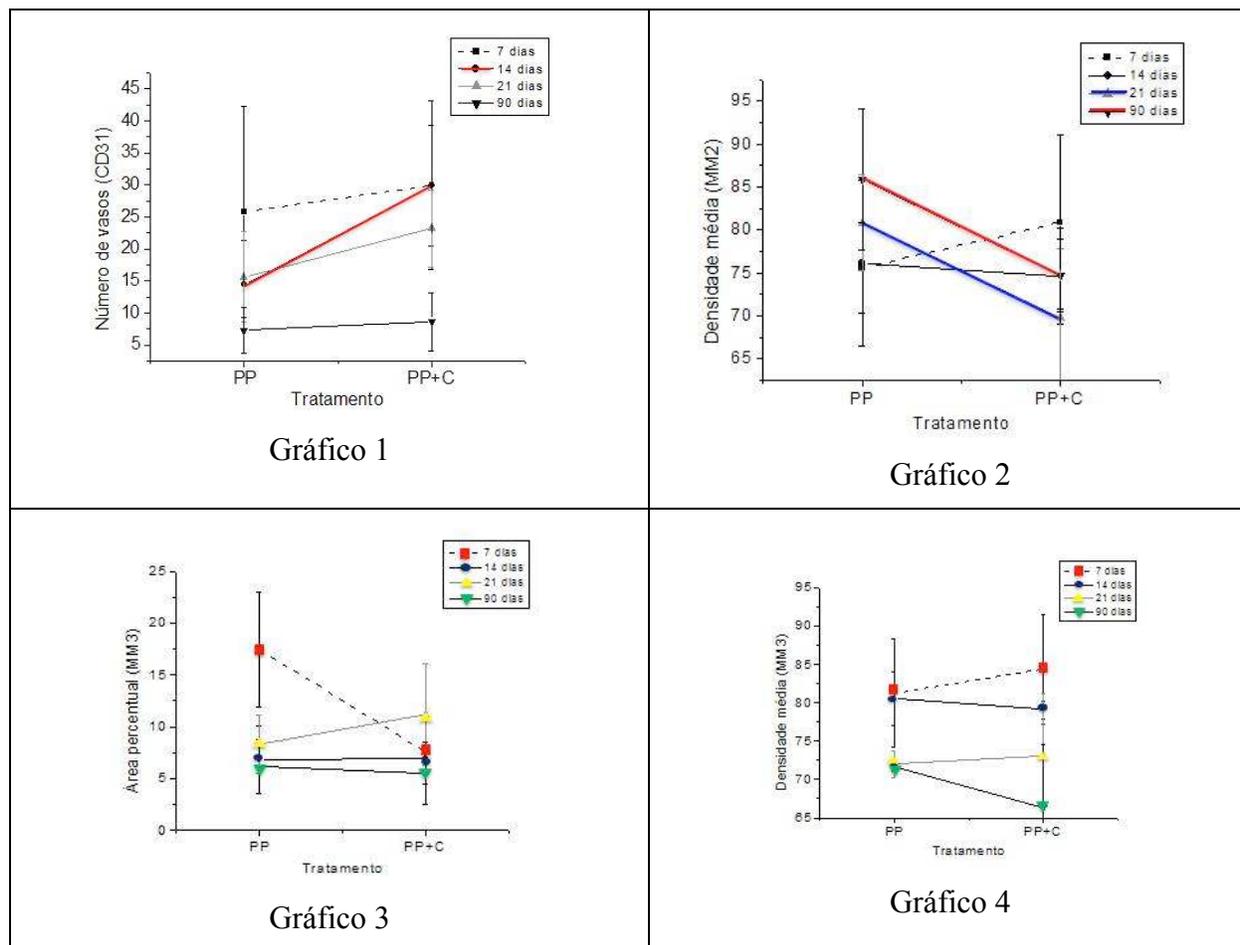
MMP-2: Metaloproteinase - 2

MMP-3: Metaloproteinase - 3

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

\* Variáveis transformadas em postos (*ranks*) para os testes devido à ausência de distribuição Normal.

## Representação Gráfica dos Resultados Significativos



**Gráficos:** 1. CD-31 (angiogênese) – demonstrando diferença significativa no número de vasos entre PP e PPC aos 14 dias. 2. MMP-2 – diferença significativa na densidade média de marcação entre PP e PPC aos 21 e 90 dias. 3. MMP-3 – diferença significativa na área percentual de marcação no grupo PP ao longo do tempo (entre 7 ou 14 x 90 dias). 4. MMP-3 – diferença significativa na densidade média de marcação em ambos os grupos ao longo do tempo. PP: Polipropileno/ PPC: Polipropileno + gel de colágeno.

# *Discussão*

---

A maioria dos eventos adversos relacionados aos implantes de telas nas cirurgias uroginecológicas deve-se à resposta inflamatória intensa ou prolongada ou ainda à inadequada deposição de colágeno em torno do implante. Nesse sentido, têm sido buscadas estratégias que possibilitem a modulação da resposta inflamatória aguda e crônica, bem como da reação fibroblástica reacional ao material implantado. O colágeno é, sem dúvida, um possível candidato para exercer tal papel. Como já demonstrado em estudos experimentais anteriores, a adição de colágeno à tela de polipropileno pode minimizar complicações, por meio da atenuação da inflamação circunjacente ao material e redução da tendência de encapsulamento da prótese (8, 9). A justificativa do uso do colágeno como biomaterial baseia-se nas suas propriedades biológicas, particularmente na sua grande biocompatibilidade e baixa imunogenicidade (7). Prova disso é que, mesmo quando o colágeno empregado é originado de outra espécie (xenogênico), seu emprego em humanos é seguro, sem resposta imunológica importante (52). Além disso, o colágeno é facilmente disponível, uma vez que é a principal proteína dos mamíferos, podendo ser extraído por eficientes métodos laboratoriais (52) e complexado a determinado polímero através de inúmeras técnicas químicas, enzimáticas ou radioativas (irradiação UV) já descritas (40).

O colágeno utilizado em nosso estudo foi originalmente desenvolvido na UNICAMP (Registro no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual 018100044206), sendo os grandes diferenciais de sua formulação a diálise prolongada e o tratamento enzimático empregados. A aquisição do gel de colágeno foi baseada no princípio da auto-agregação espontânea das macromoléculas, segundo o qual algumas moléculas, entre as quais o colágeno, podem se organizar no nível supramolecular quando fragmentos de moléculas originais são submetidos a determinadas condições físico-químicas. Em 1995, Vidal (12) foi pioneiro em descrever a

obtenção de moléculas com arranjo supramolecular semelhante ao colágeno de tendão por meio de diálise prolongada com água destilada. Nesse processo, moléculas de água formam pontes de hidrogênio com moléculas de colágeno, que facilitam o movimento fibrilar e a reorganização da estrutura helicoidal semelhante à estrutura fibrilar tendínea. O autor descreveu ainda que a diálise abreviada resulta em feixes de fibras de diâmetro e orientação irregulares, sendo a elasticidade diretamente proporcional ao tempo de duração da diálise, atingindo seu pico em 5 a 7 dias. Além disso, verificou que a viscosidade diminui na proporção inversa ao período de diálise. Dessa forma, podemos considerar que a baixa viscosidade permite a manutenção da estrutura fibrilar ordenada e a elevada elasticidade do material contribui para impedir sua fragmentação e migração à distância, além de propiciar o preenchimento uniforme da tela a ser recoberta.

A matriz de colágeno oriundo de tendão bovino já tem algumas aplicações médicas definidas, como na ortopedia e na neurologia (lesões axonais), e mesmo na área da urologia feminina. De qualquer forma, o preparo do colágeno utilizado em nosso estudo abrange rigoroso processo de purificação, de desenvolvimento próprio, para eliminar as porções imunogênicas telopeptídicas (50, 51).

Ainda que a colonização bacteriana não tenha sido motivo de avaliação no presente estudo, deve-se ressaltar que as complicações infecciosas relacionadas ao implante de material exógeno são importantes causas de preocupação, e podem repercutir no processo imuno-inflamatório e na integração final do material. A fim de se controlar possíveis efeitos decorrentes de contaminação infecciosa, as telas puras ou recobertas foram esterilizadas com radiação gama, para preservar as características biológicas do colágeno, além de tratamento enzimático com solução ácida (pH=1,7), o que também contribuiu para a esterilização do colágeno. Embora o

glutaraldeído seja freqüentemente usado como estabilizadores de colágeno, vários estudos têm advertido sobre a possibilidade de efeitos de citotóxicos produzidos por concentrações crescentes desta substância durante preparação (39).

O uso do colágeno na forma de gel para recobrimento de tela sintética tem sido sugerido como uma opção mais adequada do que na forma de membrana (53, 54). Isso se justifica pela possibilidade do gel aderir-se aos filamentos das telas, mantendo os poros livres para o processo de integração tecidual, o que diminuiria a tendência ao encapsulamento e ao tropismo de células gigantes de corpo estranho. Além disso, o gel parece ser mais rápido e completamente degradado após o implante, com substituição por colágeno nativo em uma fase mais precoce do processo (39). Isso pode se relacionar à maior superfície de exposição do gel ao sistema imune do hospedeiro, quando comparado ao colágeno na forma de membranas.

Postula-se que o recobrimento das telas sintéticas com gel purificado de colágeno tipo I poderia melhorar as reações imunológicas e proliferativas no processo de reparo tecidual que se iniciam após o implante. Testes iniciais com cultura de fibroblastos demonstraram que essas células se aderem às fibras colágenas tipo I, obtidas a partir de tendão bovino (8, 41, 42). Alguns estudos descreveram um possível efeito antiadesivo através do estímulo à proliferação de células mesoteliais, funcionando como uma barreira (55). Em estudo experimental prévio do nosso grupo de pesquisa, o recobrimento de tela de polipropileno com o mesmo gel resultou em aumento da aderência da tela ao tecido circunjacente e menor densidade e duração do infiltrado linfocitário, plasmocitário e da reação do tipo granulomatosa. Observou-se, também, maior birrefringência das fibras de colágeno, refletindo melhora no processo de remodelação mesenquimatosa representada por melhor organização supramolecular do colágeno neoformado

(15).

O modelo experimental por meio de implante das telas no subcutâneo de ratas já foi empregado anteriormente, sendo comumente utilizado para o estudo da integração de próteses e enxertos (56). Ademais, o implante dos dois tipos de telas a serem comparadas (pura ou recoberta) no mesmo animal possibilitou que o animal atuasse como seu próprio controle. Outros modelos experimentais têm sido descritos na literatura com interessantes achados. Huffaker et al. (8) comparou a resposta tecidual, após 12 semanas do implante, de telas de PP pura (Gynemesh PS<sup>TM</sup>) e PP recoberta com colágeno (Pelvitex<sup>TM</sup>), implantadas na vagina de coelhas e descreveram resposta inflamatória crônica discreta em ambos os grupos, sem diferenças significativas quanto à inflamação, neovascularização e fibroplasia, porém com maior atividade apoptótica no grupo revestido por colágeno (0.39% vs. 0.1%; p=0.04). Em contrapartida, no presente estudo, não foram observadas diferenças na expressão do TNF- $\alpha$  tecidual entre os grupos. Todavia, devido as diferentes metodologias e tipos de colágeno utilizados, tais estudos não são passíveis de comparação.

Um outro quesito que dificulta a comparação entre os estudos é a ampla variação na escolha dos marcadores imunohistoquímicos. Não há consenso definindo qual é o marcador mais indicado para cada situação de interesse. Pelo contrário, há uma gama de marcadores disponíveis e diferentes resultados acerca de seu uso para determinado objetivo. A escolha dos cinco marcadores neste estudo foi empírica, baseada nas experiências prévias acumuladas em estudos da linha de pesquisa do nosso grupo (57).

De Tayrac et al (9) também compararam telas não-revestidas versus revestidas por colágeno em um modelo com ovelhas, avaliadas após 1 semana e 12 semanas, encontrando

maior risco de erosões vaginais no grupo não-recoberto (33% vs. 16.7%;  $p= 0.04$ ). Tal comportamento provavelmente decorreu do efeito protetor do recobrimento de colágeno, com menor aderência da tela à ferida operatória na fase precoce do processo de integração. No mesmo estudo, não foram observadas diferenças significativas na resposta inflamatória após 12 semanas do implante, o que corrobora com nossos achados, os quais não demonstraram diferenças entre os grupos quanto a imunorreatividade da IL-1, sendo assim descartado um efeito imunológico negativo do uso da cobertura de colágeno.

A compreensão da resposta imuno-inflamatória envolvida no processo de integração das telas ao hospedeiro e o real papel da cobertura de colágeno na modulação desse processo foi nosso objeto de estudo, e os achados nos levaram a algumas possíveis inferências. Com relação à angiogênese, já havia sido descrito que a composição do colágeno tipo I e sua organização ultraestrutural favorecem a aderência plaquetária, com subsequente liberação de fator de crescimento fibroblástico (FGF) e outros fatores angiogênicos, que contribuem para a neoformação vascular (12-14). Corroborando essa informação, encontramos no grupo PPC maior número de vasos sanguíneos neoformadas após 14 dias do implante ( $p=0.002$ ). Pode-se esperar que tal incremento na angiogênese, na fase inicial, contribua de maneira positiva no processo de integração da tela. Por outro lado, o achado de diminuição da densidade de vasos no grupo PPC no período tardio (90 dias) após o implante é compatível com o processo cicatrização fisiológico, em que, após um período inicial de intensificação da angiogênese (fases inflamatória e proliferativa), com a progressão para fase de maturação ou remodelamento, a ferida se torna menos vascular e com maior força tênsil secundária à deposição de colágeno.

Considerando-se o metabolismo do colágeno, as metaloproteinases da matriz extracelular

(MMP) são parte de uma grande família de enzimas essenciais no processo de reparo tecidual e cicatrização (46), participando do processo de desbridamento da matriz extracelular desvitalizada, angiogênese, reepitelização, contração da ferida e remodelamento cicatricial (47). Entretanto, há indícios clínicos de que níveis cronicamente elevados de MMPs podem atrapalhar o processo cicatricial, sendo que tratamentos visando a diminuição da atividade das MMPs podem ser úteis no processo de finalização da cicatrização de feridas (48). Dessa forma, pode-se desprender que a atividade das MMPs pode ser útil ou deletéria, a depender se sua expressão, duração e do local onde sua atividade seja verificada (49). No presente estudo, demonstrou-se que o recobrimento com o gel de colágeno modificou a concentração e duração da expressão das MMP-2 e MMP-3 nos tecidos avaliados. O grande desafio é a correta compreensão acerca da aplicação desse achados na prática clínica. Levando-se em consideração evidências prévias de que um desequilíbrio a favor de proteólise prejudicaria o processo de cicatrização (58), o achado de uma menor densidade média de MMP-2 no grupo PPC após 21 e 90 dias ( $p=0.046$ ) poderia representar uma vantagem para o grupo revestido por colágeno. Já quanto a MMP-3, ainda que não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos, notou-se um padrão mais estável em sua concentração no grupo PPC ao longo do tempo, sendo que, no grupo PP, a área percentual reativa diminuiu de maneira significativa após 14 e 90 dias ( $p=0.017$ ) e a densidade média reduziu-se significativamente após 21 dias e apenas após 90 dias no grupo PPC ( $p<0.001$ ). Estudo experimental prévio demonstrou que níveis deficientes de MMP-3 eram associados a retardo no processo cicatricial em ratos (59), Nesse contexto, a maior estabilidade da expressão imunohistoquímica da MMP-3 encontrada no grupo PPC poderia atuar positivamente no processo cicatricial.

Algumas limitações deste estudo merecem ser citadas. Trata-se de estudo experimental, dificultando o extrapolamento para humanos. Além disso, o implante das telas no subcutâneo, muito embora seja um modelo já testado para estudo de cicatrização e integração, pode não representar fielmente as respostas que ocorreriam no tecido vaginal onde, de fato, as telas serão implantados, o qual, indubitavelmente, apresenta características peculiares (espesso e queratinizado). Ainda, a interpretação e análise das lâminas coradas por técnicas imunohistoquímicas ainda carece de padronização. O uso de softwares analisadores de imagens representa uma estratégia interessante na tentativa de anular possíveis vieses inerentes à subjetividade de avaliações observador-dependentes.

Os presentes achados imunohistoquímicos reforçam o potencial uso do colágeno com propriedades reológicas definidas como um biomaterial promissor, particularmente na forma de gel complexado à tela de polipropileno, na cirurgia pélvica reconstrutiva.

# *Conclusão*

---

O recobrimento de telas de polipropileno com gel purificado de colágeno bovino determinou alterações significativas na angiogênese e metabolismo local do colágeno, do ponto de vista imunohistoquímico, representadas por:

- a) Angiogênese (CD-31) mais intensa no período precoce (14 dias) após implante;
- b) Alteração do metabolismo do colágeno local, por meio da diminuição da expressão da MMP-2 (21 e 90 dias) e expressão uniforme da MMP- 3 até o período mais tardio após o implante.

O recobrimento de telas de polipropileno com gel purificado de colágeno bovino não determinou alterações significativas na resposta imuno-inflamatória e citotoxicidade (IL-1 e TNF-  $\alpha$  ) local.

## *Referências*

---

- 1- DeCherney AH, Nathan L. Relaxamento das estruturas de sustentação da pelve. In: Current obstetric & gynecologic diagnosis and treatment. 9.ed. Mac Graw Hill Companies; 2003; 661-79.
- 2- Ogah J, Cody JD, Rogerson L. Minimally invasive synthetic suburethral sling operations for stress urinary incontinence in women. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2009; 7(4): CD006375.
- 3- Ramsey SD, Wagner TH, Bavendam TG. Estimating costs of treating stress urinary incontinence in elderly women according to the AHCPR clinical guidelines. Am J Man Care 1996; 2: 146-54.
- 4- O'Brien BJ, Goeree R, Bernard L, Rosner A, Williamson T. Cost-effectiveness of tolterodine for patients with urge incontinence who discontinue initial therapy with oxybutinin: a Canadian perspective. Clin Ther 2001; 23(12): 2038-49.
- 5- Amid PK, Lichtenstein IL, Shulman AG, Hakakha M. Biomaterials for "tensionfree" hernioplasties and principles of their applications. Minerva Chir 1995; 50(9):821-6.
- 6- Cervigni M, Natale F. The use of synthetics in the treatment of pelvic organ prolapse. Curr Opin Urol 2001;11(4):429-35.
- 7- Patel H, Ostergard DR, Sternschuss G. Polypropylene mesh and the host response. Int Urogynecol J. 2012; 23(6):669-79.
- 8 - Huffaker RK, Muir TW, Rao A, Baumann SS, Kuehl TJ, Pierce LMI. Histologic response of porcine collagen-coated and uncoated polypropylene grafts in a rabbit vaginal model. Am J Obstet Gynecol. 2008; 198(5):582.
- 9 - De Tayrac R, Alves A, Thérin M. Collagen-coated vs noncoated low-weight polypropylene meshes in a sheep model for vaginal surgery. A pilot study. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct. 2007; 18(5):513-20.
- 10- Knapp TR, Luck E, Daniels JR. Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. J Surg Res.1977; 23(2):96-105.
- 11- Maciel, L.C. Purified porcine collagen membrane modulates integration of polypropylene mesh implant in rat model. 2011. Tese (Doutorado em Ciências da Cirurgia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2011.
- 12- Vidal BC. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self assembly phenomenon. C. R. Acad Sci III. 1995;318(8):831-6.
- 13- Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. Micron. 2003; 34(8):423-32.
- 14- Vidal BC. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. Biotech Histochem. 2010; 85(6):365-378.

- 15- Siniscalchi RT, Melo M, Palma PC, Dal Fabbro IM, Vidal BC, Riccetto CL. Highly purified collagen coating enhances tissue adherence and integration properties of monofilament polypropylene meshes. *Int Urogynecol J*. 2013; 24(10):1747–54.
- 16- Goldman L, Ausiello D, et al. Incontinência urinária. In: *Cecil Textbook of Medicine*. 22.ed. Elsevier; 2004. p.127-8.
- 17- Maher C, Baessler K, Glazener CMA, Adams EJ, Hagen S. Surgical Management of Pelvic Organ Prolapse in Women: A Short Version Cochrane Review. *Neurourol and Urodynamics*. 2008; 27(1):3–12.
- 18- Colombo M, Vitobello D, Proietti F, Milani R. Randomised comparison of Burch colposuspension versus anterior colporrhaphy in women with stress urinary incontinence and anterior vaginal wall prolapse. *BJOG*. 2000; 107(4): 544-51.
- 19- Mallipeddi PK, Steele AC, Kohli N, Karram MM. Anatomic and functional outcome of vaginal paravaginal repair in the correction of anterior vaginal wall prolapse. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001; 12(2): 83-8.
- 20- Maher CF, Murray CJ, Carey MP, Dwyer PL, Ugoni AM. Iliococcygeus or sacrospinous fixation for vaginal vault prolapsed. *Obstet Gynecol* 2001; 98(1): 40-4.
- 21- Ho YH, Ang MG, Nyam D, Tan M, Seow-Choen F. Transanal approach to rectocele repair may compromise anal sphincter pressures. *Dis Colon Rectum* 1998; 41(3): 354-58.
- 22- Kahn MA, Stanton SL. Posterior colporrhaphy: its effects on bowel and sexual function. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(1): 82-6.
- 23- Petros P, Ulmsten UI. An integral theory and its method for the diagnosis and management of female urinary incontinence. *Scand J Urol Nephrol*. 1993; 153:1–93.
- 24- Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varhos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J*. 1996; 7(2):81–6.
- 25- Cosson M. Risk of infection and prostheses: time out or a red flag? *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004, 33(7):559–60.
- 26- Yildirim A, Basok EK, Gulpinar T, Gurbuz C, Zemheri E, Tokuc R. Tissue reactions of 5 sling materials and tissue material detachment strength of 4 synthetic mesh materials in a rabbit model. *J Urol*. 2005, 174(5):2037–40.
- 27- Bazi TM, Hamade RF, Hussein IAH, Nader KA, Jurjus A. Polypropylene midurethral tapes do not have similar biologic and biomechanical performance in the rat. *Eur Urol* 2006; 51(5):1364-73.
- 28- Riccetto C, Miyaoka R, De Fraga R, Barbosa R, Dambros M, Teixeira A, Palma P. Impact of the structure of polypropylene meshes in local tissue reaction: in vivo stereological study. *Int Urogynecol J*. 2008; 19(8):1117–23.

- 29- Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral sling materials. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2006;17(2): 106-10.
- 30- Morais JM, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010; 12(2):188–96.
- 31- Shastri VP. Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. *Curr Pharm Biotechnol.* 2003; 4(5):331–7.
- 32- Junge K, Binnebösel M, von Trotha KT, Rosch R, Klinge U, Neumann UP et al. Mesh biocompatibility: effects of cellular inflammation and tissue remodeling. *Langenbecks Arch Surg.* 2012; 397(2): 255–70. doi 10.1007/s00423-011-0780-0
- 33- Hay ED. Extracellular matrix. *J. Cell Biol.*1981; 91(3):205-9.
- 34- Bornstein P, Piez KA. The nature of the intramolecular cross-links in collagen. *Biochemistry.* 1966; 5(11):3460-73.
- 35- Takeda T, Isawa M, Koeda T, Shibata U. Laboratory studies of collagen wound dressing. *J Dermatol* 1983; 10(5):475-86.
- 36- Chvapil M, Kronenthal RL, Van Winkle WJr. Medical and surgical application of collagen. *Int. Rev. Conn. Tissue Res.* 1973; 6:1-15.
- 37- Davison PF, Levine L, Drake MP, Rubin AL, Bump S. The serologic specificity of tropocollagen telopeptides. *J. Exp. Med.* 1967;126(2):331-46.
- 38- Senyk G, Michaeli D. Induction of cell-mediated immunity and tolerance to homologous collagen in guinea pigs: demonstration of antigen-reactive cells for a cell- antigen. *J. Immunol* 1973; 111(5):1381-8.
- 39- Dawson RC, Krisht AF, Barrow DL, Joseph GI, Shengelaia GG, Bonner G. Treatment of experimental aneurysms using collagen-coated microcoils. *Neurosurg* 1995; 36(1):133-9.
- 40- Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials.* 2010; 3(3):1863-87.
- 41- Kuiper N, Gabriel N, Griffiths S, Tew S. Shaping and sensing the extracellular matrix. *Int J Exp Pathol.* 2008; 89:A1–A29.
- 42- Maturana LG, Zanon RG, Pierucci A, Vidal BC, Oliveira AL. Supraorganized collagen enhances Schwann cell reactivity and organization in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(7):682–7.
43. Alves, VAF, Bacchi, CE, Vassallo, J. *Manual de Imunohistoquímica.* São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia. 1999.

44. Bodey, B. The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms. *Expert Opin Biol Ther*, 2002; 2,(4):371-93,
- 45- Werner, B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica • *J Bras Patol Med Lab*. 2005; 41 (5):353-64.
- 46- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8(3): 221-33.
- 47- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A et al. Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993; 4(2):197-250.
- 48- Lobmann R, Zemlin C, Motzkau M, Reschke K, Lehnert H. Expression of matrix metalloproteinases and growth factors in diabetic foot wounds treated with a protease absorbent dressing. *J Diabetes Complications*. 2006; 20(5): 329-35.
- 49- Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G. MMPs Made Easy. *Wounds International* 2009; 1(1).
- 50- Palma PCR, Vidal BC, Riccetto CLZ, Herrmann V, Dambros M, Thiel M et al. Effect of purified collagen on lipograft survival: Experimental basis for periurethral lipoinjections. *J Endourology*, 2003; 17(4):255-9.
- 51- Riccetto CLZ, Novaski GL, Palma PCR, Dambros M, Thiel M, Vidal BC. New biocompatible highly purified collagen gel for therapeutic renal artery embolization. *Urology*. 2006; 67(4):851-4.
- 52- Lukaszewicz A, Skopinska-Wisniewska J, Marszalek A, Molski S, Drewa T. Collagen/Polypropylene Composite Mesh Biocompatibility in Abdominal Wall Reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg*. 2013; 131: 731e -740e.
- 53- Cervigni M, Natale F, La Penna C, Saltari M, Padoa A, Agostini M. Collagen-coated polypropylene mesh in vaginal prolapsed surgery: an observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011; 156(2):223–227.
- 54- Van't Riet M, Burger JM, Bonthuis F, Jeekel J, Bonjer HJ. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating: a randomized controlled study in a rat model of ventral hernia repair. *Surg Endosc*. 2004;18(4):681–5.
- 55- Yung S, Li FK, Chan TM. Peritoneal mesothelial cell culture and biology. *Perit Dial Int*. 2006; 26(2):162–73.
- 56- Thiel M, Palma PCR, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto NR Jr. A stereological analysis of fibrosis and inflammatory reaction induced by four different synthetic slings. *BJU Int*. 2005; 95(6):833–7.

57- Prudente A, Dias FGF, Oliveira MG, Riccetto CLZ. Can nitric oxide coating modify polypropylene mesh immune-inflammatory reaction and collagen metabolism? Immunohistochemical analysis in a rat model. In: AUA Annual Meeting, 2014. Orlando –FL, USA. Abstratct MP4-05.

58- Steffensen B, Häkkinen L, Larjava H. Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(5):373-98.

59- Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B et al. Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg.*1999; 230(2):260-5.

# *Anexos*

---

## ANEXO 1. Aprovação Comitê de Ética na Experimentação Animal



CEUA/Unicamp

### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeitos biomacânicos e histológicos do recobrimento de tela de polipropileno com gel purificado de colágeno: estudo experimental, Sub-projeto: Análise imunohistoquímica do efeito do recobrimento com gel purificado de colágeno na integração de telas de polipropileno em ratas" (protocolo nº 1972-1(A)), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cássio Riccetto / Fernando Goulart Fernandes Dias, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de maio de 2013.

Campinas, 21 de maio de 2013.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

# *Apêndices*

---

## APÊNDICE 1 - Apresentação Oral no Congresso Brasileiro de Urologia



## APÊNDICE 2 - Apresentação Oral no Congresso da American Urological Association (AUA)



Jan 8 2014 1:36PM

Abstract ID: 14-4668

Abstract Title: CAN HIGHLY PURIFIED COLLAGEN COATING MODULATE POLYPROPYLENE MESH IMMUNE-INFLAMMATORY AND FIBROBLASTIC REACTIONS? IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS IN RAT MODEL.

Dear Dr. DIAS:

I am happy to inform you that the Program Abstract Review Committee has accepted your abstract for presentation in a **Moderated Poster Session** at the 2014 Annual Meeting of the American Urological Association Education and Research Inc., to be held in Orlando, Florida, May 16-21, 2014. Complete details regarding your presentation can be found on the 2014 AUA Annual Meeting Online Acknowledgement Form, which has been developed for your convenience. To access the Online Acknowledgement Form and accept or decline this invitation, click on the following URL:

<http://submissions.miracl.com/AUA2014/m.aspx?m=Xrz58wRV1>

### Session Details:

Type: Moderated Poster - MP4  
Title: Urodynamics/Incontinence/Female Urology: Basic Research II  
Date: Friday, May 16, 2014  
Time: 3:30 PM - 5:30 PM  
Building: Orange County Convention Center  
Room: W 315

Thank you and we look forward to seeing you in Orlando.  
Sincerely,

Gopal H. Badlani, MD  
AUA Secretary and Program Committee Chair

## APÊNDICE 3 – Submissão do artigo ao International Urogynecology Journal

The screenshot shows the Editorial Manager interface for the International Urogynecology Journal. The header includes the journal logo, navigation links (HOME, LOGOUT, HELP, REGISTER, UPDATE MY INFORMATION, JOURNAL OVERVIEW, MAIN MENU, CONTACT US, SUBMIT A MANUSCRIPT, INSTRUCTIONS FOR AUTHORS), and user information (Role: Author, Username: fernandomestrado). The main content area is titled "Submissions Being Processed for Author FERNANDO GOULART FERNANDES DIAS, Ph.D." and displays a table with one submission. The table has columns for Action, Manuscript Number, Title, Initial Date Submitted, Status Date, and Current Status. The submission details are: Manuscript Number (blank), Title "CAN HIGHLY PURIFIED COLLAGEN COATING MODULATE POLYPROPYLENE MESH IMMUNE-INFLAMMATORY AND FIBROBLASTIC REACTIONS? IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS IN A RAT MODEL", Initial Date Submitted "Mar 28, 2014", Status Date "Mar 28, 2014", and Current Status "Submitted to Journal".

# Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>		CAN HIGHLY PURIFIED COLLAGEN COATING MODULATE POLYPROPYLENE MESH IMMUNE-INFLAMMATORY AND FIBROBLASTIC REACTIONS? IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS IN A RAT MODEL	Mar 28, 2014	Mar 28, 2014	Submitted to Journal

Dear MR. DIAS,

Your submission entitled "CAN HIGHLY PURIFIED COLLAGEN COATING MODULATE POLYPROPYLENE MESH IMMUNE-INFLAMMATORY AND FIBROBLASTIC REACTIONS? IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSIS IN A RAT MODEL" has been received by the International Urogynecology Journal

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://iujo.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office  
International Urogynecology Journal