

**ALESSANDRO CORRÊA PRUDENTE DOS SANTOS**

---

**ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E  
QUANTITATIVA DA DEPOSIÇÃO COLÁGENA DE TELAS DE  
POLIPROPILENO MONOFILAMENTAR RECOBERTAS COM  
MATRIZ POLIMÉRICA ELUIDORA DE S-NITROSOGLUTATIONA  
IIIMPLANTADAS NO SUBCUTÂNEO DE RATAS ADULTAS**

---

**CAMPINAS  
2010**

|

**ALESSANDRO CORRÊA PRUDENTE DOS SANTOS**

---

---

**ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA E  
QUANTITATIVA DA DEPOSIÇÃO COLÁGENA DE TELAS DE  
POLIPROPILENO MONOFILAMENTAR RECOBERTAS COM  
MATRIZ POLIMÉRICA ELUIDORA DE S-NITROSOGLUTATIONA  
IIIMPLANTADAS NO SUBCUTÂNEO DE RATAS ADULTAS**

---

---

*Dissertação de Mestrado apresentada à  
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Cirurgia, área de Cirurgia*

**ORIENTADOR: PROF.DR..CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO**  
**CO-ORIENTADOR: PROF.DR. MARCELO GANZAROLLI DE OLIVEIRA**

**CAMPINAS  
UNICAMP  
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59a Santos, Alessandro Corrêa Prudente dos  
Análise semiquantitativa da reação inflamatória e quantitativa da deposição colágena de telas de polipropileno monofilamentar recobertas com matriz polimérica eluidora de s-nitrosoglutathione implantadas no subcutâneo de ratas adultas / Alessandro Corrêa Prudente dos Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Cássio Luís Zanettini Riccetto, Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Incontinência urinária. 2. Assoalho pélvico. 3. Óxido nítrico. 4. Bioprótese. I. Riccetto, Cássio Luis Zanettini. II. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Semi quantitative analysis of inflammatory reaction and quantitative collagen deposition evaluation of monofilament polypropylene mesh coated with S-nitrosoglutathione –releasing poly (vinyl alcohol) film implanted in subcutaneous of female rats**

**Keywords:** • Urinary incontinence  
• Pelvic floor  
• Nitric oxide  
• Bioprosthesis

**Titulação: Mestre em Cirurgia**  
**Área de concentração: Cirurgia**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Cássio Luis Zanettini Riccetto**  
**Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar**  
**Prof. Dr. Marcelo Thiel**

**Data da defesa: 25-05-2010**

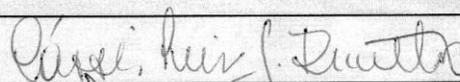
# Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Alessandro Corrêa Prudente dos Santos

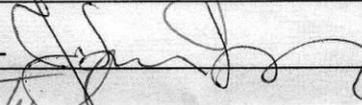
Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto

## Membros:

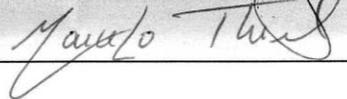
1. Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto -



2. Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar -



3. Prof. Dr. Marcelo Thiel -



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

Data: 25/05/2010

## ***Dedicatória***

*Ao meu pai Aracê e minha mãe Lúcia (post mortem) por terem sido fundamentais em todo meu processo de formação que culminou nesse trabalho.*

*Aos meus pacientes e alunos, do passado e do futuro, razão do meu esforço.*

## ***Agradecimentos***

Ao então acadêmico, Thiago Serrano, que auxiliou em várias fases da pesquisa.

À aluna de pós-graduação do Instituto de Química da UNICAMP, Maíra Martins de Souza Godoy Simões, pela importante parceria em, praticamente, todas as fases da pesquisa.

Ao Urologista Flávio Sousa de Andrade e à estudante Fernanda Oliveira Reis pela importante colaboração em alguns procedimentos cirúrgicos.

Aos funcionários do Núcleo de Cirurgia Experimental da UNICAMP: Ana Cristina de Moraes; William Adalberto Silva; Miguel Luis Candido; Waldemir Benedito Costa, que auxiliaram no cuidado com as ratas e em todas as fases dos procedimentos cirúrgicos, demonstrando cordialidade e disposição em todos os momentos.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Anatomia Patológica Experimental, pelo suporte técnico durante a pesquisa.

À estatística Cleide Aparecida Moreira Silva, do Serviço de Bioestatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

Aos demais Professores, Residentes e Ex-residentes da Disciplina de Urologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, que sempre estimularam o desenvolvimento de atividades científicas e me proporcionaram sólida formação clínica e acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, pelo apoio prestado ao presente estudo na forma de concessão de apoio à pesquisa regular (Processo 2008/09450-0).

À minha esposa Diama pela força transmitida nos melhores e piores momentos desse processo.

Ao amigo e ex-residente Daniel Carlos Silva, pelo generoso abrigo mensal após minha mudança de cidade.

Ao co-orientador Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, pelo empenho na formulação do protocolo e análise dos resultados alcançados.

Ao meu orientador Prof. Cássio Riccetto, pela colaboração inestimável em todas as fases da investigação e pelos sólidos ensinamentos, que, em muito, extrapolaram o escopo da pesquisa.

*“O drama de nosso mundo é que aos seres imaginativos falta a experiência, enquanto que àqueles dotados de experiência falta a imaginação. Os tolos vivem da imaginação sem sabedoria. Os pedantes vivem de saber sem imaginação. O papel de uma Universidade é unir a imaginação à experiência”*

***Whitehead, 1927***

# Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XVII</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1- Incontinência Urinária e Prolapsos Vaginais.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2- Emprego do polipropileno no assoalho pélvico.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3- Efeitos Biológicos do Óxido Nítrico.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1- Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2- Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1- Aprovação pelo Comitê de Ética.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2- Padronização da Técnica de Recobrimento das Telas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3- Estudo in vitro da difusão da GSNO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4- Composição dos Grupos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5- Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>22</b>
<b>3.6- Eutanásia dos animais, coleta e preparo das amostras teciduais</b>	<b>23</b>
<b>3.7- Avaliação do Infiltrado inflamatório Agudo.....</b>	<b>24</b>
<b>3.8- Avaliação das Fibras Colágenas.....</b>	<b>27</b>
<b>3.9- Análise Estatística.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1- Análise das Variáveis do Processo Inflamatório.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2- Análise Estereológica da Densidade Volumétrica de Fibras Colágenas.....</b>	<b>38</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1- Considerações sobre biocompatibilidade e reparação tecidual... </b>	<b>41</b>
<b>5.2- Considerações sobre o modelo experimental.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3- Considerações sobre óxido nítrico e reação tecidual.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4- Considerações sobre estereologia e deposição colágena.....</b>	<b>49</b>

5.5- Outras considerações.....	50
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>52</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>54</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>74</b>
8.1- Parecer do Comitê de Ética.....	75
<b>9. Apêndices.....</b>	<b>76</b>
9.1- Tabelas de avaliação das variáveis do processo inflamatório nas ratas eutanasiadas aos 2 dias.....	77
9.2- Tabelas de avaliação das variáveis do processo inflamatório nas ratas eutanasiadas aos 21 dias.....	78
9.3- Tabelas de avaliação das fibras colágenas nas ratas eutanasiadas aos 21 dias.....	79

## Lista de Abreviaturas

PVA	Poli(álcool vinílico)
PVP	Poli(vinil pirrolidona)
PP	Polipropileno
GSNO	S-nitrosoglutaciona
NO	Óxido Nítrico
nNOs	Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
eNOs	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
iNOs	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
PVA/PVP	Solução de Poli(álcool vinílico)e Poli (vinil pirrolidona)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ânion nitrato
GSNO1/PVA	Solução de Poli(álcool vinílico) e S- Nitrosoglutaciona 1 mM
GSNO1/PVP	Solução de Poli(álcool vinílico)/Poli (vinil pirrolidona) e S- Nitrosoglutaciona 1 mM
GSNO10/PVA	Solução de Poli(álcool vinílico) e S-Nitrosoglutaciona 10mM
GSNO10/PVP	Solução de Poli(álcool vinílico)/Poli (vinil pirrolidona) e S- Nitrosoglutaciona 10 mM
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
TVT <sup>®</sup>	<i>Tension Free Vaginal Tape</i> <sup>®</sup>
IVS <sup>®</sup>	<i>Intravaginal Slingplasty</i> <sup>®</sup>
SPARC <sup>®</sup>	<i>Suprapubic arc</i> <sup>®</sup>
SIS <sup>®</sup>	Small Intestine Submucosa <sup>®</sup> (Submucosa do Intestino delgado de Porcos)
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
FAPESP	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo
HE	Hematoxilina-Eosina

Vv	Densidade volumétrica
Pp	Número de pontos da estrutura em estudo que tocam as extremidades dos arcos ciclóides no sistema-teste
Pt	Número de pontos teste no sistema-teste
EPR	Erro Padrão Relativo
mM	Mili Molar
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta.
IL-8	Interleucina 8
IL- 6	Interleucina 6
DP	Desvio Padrão
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
Q	Quartil

## Lista de Tabelas

	<b>Páginas</b>
Tabela 1: Classificação dos tipos de tela de polipropileno	9
Tabela 2. <i>Slings</i> de polipropileno monofilamentar – erosão e extrusão	11
Tabela 3: Análise estatística diferencial entre os tratamentos após 21 dias	38

## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1: Estrutura Molecular da S-Nitrosoglutationa (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S).....	18
Figura 2: Fotomicrografias de varredura eletrônica das telas de PP.....	20
Figura 3: Concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> e NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (nM) em Solução Tampão Bicarbonato em função do tempo (min).....	21
Figura 4: Disposição dos fragmentos de tela no abdome da rata.....	22
Figura 5: Fotografias do procedimento cirúrgico.....	23
Figura 6: Avaliação do Edema Tecidual.....	25
Figura 7: Avaliação do Infiltrado Inflamatório.....	26
Figura 8: Avaliação da angiogênese.....	27
Figura 9: Tipos de corte propostos para estruturas anisotrópicas durante o método estereológico.....	28
Figura 10: Exemplos de Sistemas-Teste utilizados em Estereologia.....	29
Figura 11: Exemplo de avaliação de campo através de grade de arcos ciclóides	30
Figura 12: Média das notas atribuídas ao infiltrado inflamatório aos 2 e 21 dias	35
Figura 13: Média das notas atribuídas ao edema aos 2 e 21 dias.....	36
Figura 14: Média das notas atribuídas à angiogênese aos 2 e 21 dias.....	37
Figura 15: Média da Densidade Volumétrica (Vv) fibras colágenas (21 dias).....	39

# ***Resumo***

**Introdução:** A introdução de telas de polipropileno no reparo de incontinência urinária e distopias genitais diminuiu a recorrência do problema, mas também trouxe o inconveniente de complicações como extrusões vaginais. O óxido nítrico (NO) tem propriedades vasodilatadoras e moduladoras dos processos inflamatórios. Assim, o recobrimento das telas com matriz polimérica eluidora de um carreador de NO pode modificar a resposta tecidual ao implante em organismos biológicos.

**Objetivo:** Estudar o efeito do recobrimento com matriz polimérica eluidora do carreador de NO, S-nitrosoglutationa (GSNO), na resposta biológica tecidual de telas de polipropileno (PP) monofilamentar implantadas no subcutâneo de ratas adultas.

**Materiais e Métodos:** Utilizaram-se 20 ratas fêmeas da raça Wistar (peso médio= 250 g). Cada animal recebeu o implante de 4 fragmentos de tela medindo 10 x 10 mm no subcutâneo. As amostras obtidas dos animais foram divididas em 7 grupos, designados como: grupo PP – tela de PP sem recobrimento (grupo controle) (n=20); grupo PVA -tela de PP com recobrimento de poli(alcool vinílico) (n=10); grupo PVA/PVP – tela de PP com recobrimento de blenda de poli(alcool vinílico)/poli(vinil pirrolidona) (n=10); grupo PVA/GSNO 1 – tela de PP com recobrimento de poli(alcool vinílico), contendo GSNO 1 mM (n=10); grupo PVA/GSNO 10 – tela de PP com recobrimento de poli(alcool vinílico) contendo GSNO 10mM (n= 10), grupo PVA/PVP/GSNO 1 – tela de PP com recobrimento de poli(alcool vinílico)/poli(vinil pirrolodona), contendo GSNO 1mM (n=10); grupo PVA/PVP/GSNO 10 – tela de PP com recobrimento de poli(alcool vinílico)/poli(vinil pirrolodona) contendo GSNO 10mM (n= 10).

Dez ratas foram eutanasiadas após 2 dias e outras dez após 21 dias do procedimento cirúrgico. Após a eutanásia, uma excisão em bloco da parede abdominal foi feita para análises microscópicas. Infiltrado inflamatório, edema e angiogênese foram avaliados em lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A deposição colágena foi avaliada em lâminas coradas com Picrosirius Red. As

variáveis estudadas nas lâminas HE foram categorizadas em ausente, leve, moderado ou intenso. A formação colágena foi quantificada com método estereológico. Todas as avaliações foram feitas pelo mesmo pesquisador, que não sabia de que animal ou fragmento se tratava a lâmina que estava analisando.

**Resultados:** Nas ratas eutanasiadas após dois dias do procedimento, não se identificou diferença estatística entre os diversos tratamentos. No entanto, naquelas estudadas após 21 dias do implante, observou-se menor edema ( $p=0.0039$ ) tecidual e maior angiogênese ( $p=0.0031$ ) no grupo PVA/GSNO 1. O grupo PVA também demonstrou maior formação vascular que o controle ( $p=0.0027$ ). Além disso, ratas eutanasiadas aos 21 dias apresentaram maior infiltrado inflamatório ( $p= 0,0474$ ) e menor edema ( $p= 0,0064$ ) quando comparadas àquelas aos 2 dias. Na quantificação de fibras colágenas, não houve diferença significativa entre os fragmentos.

**Conclusões:** O recobrimento com PVA e PVA contendo GSNO modificou a resposta biológica tecidual de telas de PP monofilamentar implantadas no subcutâneo de ratas adultas. O recobrimento com PVA, isoladamente ou contendo GSNO 1mM demonstrou efeito angiogênico. O grupo PVA/GSNO 1 apresentou, ainda, redução do edema. Não houve diferenças significativas da deposição colágena.

***Abstract***

**Introduction:** The use of polypropylene (PP) mesh to repair urinary incontinence and vaginal prolapse has decreased recurrence. However, it has also been related to specific complications such as vaginal erosions. Nitric oxide (NO) can produce vasodilatation and modulate inflammatory reaction. The NO containing (S-nitrosoglutathione - GSNO) eluted from a polymeric coating could modify tissue response of meshes.

**Objective:** To study the effect of a NO containing (S-nitrosoglutathione - GSNO) eluted from a polymeric coating in the tissue response of monofilament polypropylene mesh implanted in subcutaneous of rats.

**Materials and Methods:** Twenty adult female Wistar rats were used (mean weight: 250g). Four mesh fragments measuring 10 x 10 mm were implanted in subcutaneous tissue of each rat. The samples were divided in 7 groups: PP group – PP mesh without coating (control) (n=20); PVA group – PP mesh coated with poly(vinyl alcohol) (PVA) (n=10); PVA/PVP group – PP mesh coated with a solution of poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) (PVA/PVP) (n=10); PVA/GSNO 1 group – PP mesh coated with PVA containing GSNO 1mM (n=10); PVA/GSNO 10 group – PP mesh coated with PVA containing GSNO 10mM (n=10); PVA/PVP/GSNO 1 group – PP mesh coated with PVA/PVP containing GSNO 1mM (n=10); PVA/PVP/GSNO 10 group – PP mesh coated with PVA/PVP containing GSNO 10mM (n=10);. Ten rats were euthanized at 2 days and the other at 21 days postoperatively. Abdominal wall was excised *en bloc* for microscopic analyses. Inflammatory infiltrate, edema and angiogenesis were analyzed in hematoxylin-eosin (HE) slices and categorized as absent, mild, moderate or severe. The collagen deposition was stained with Picrosirius red and quantified using stereological method. The same researcher did all evaluations without knowing what fragment he was analyzing.

**Results:** No statistical difference was identified among treatments in euthanized rats at two days after the implants. However, in rats studied at 21 days, less edema (p=0.0039) and greater angiogenesis (p=0.0031) were observed for PVA/GSNO 1 group. PVA group also was related to induced a higher angiogenesis (p=0.0027).

Furthermore, euthanized rats at 21 days demonstrated a greater inflammatory infiltrate ( $p= 0,0474$ ) and less edema ( $p= 0,0064$ ) than those at two days. In collagen deposition analyses no statistical difference was identified among treatments.

**Conclusion:** Coating monofilament PP meshes with GSNO-containing PVA modified the tissue response when implanted in subcutaneous of rats. The PVA alone or with GSNO 1 showed angiogenic effect. The PVA/GSNO1 group presented less edema too. There were not effects in collagen deposition.

# ***1- Introdução***

## 1.1-Incontinência Urinária e Prolapsos Vaginais

A incontinência urinária foi definida pela Sociedade Internacional de Continência como qualquer perda involuntária de urina. Entre as várias formas de apresentação dessa condição, há a incontinência urinária aos esforços (IUE), definida como a perda que ocorre em situações, tais como tosse ou espirro (1). No mesmo consenso, prolapso de órgãos pélvicos é definido como a descida de uma ou mais estruturas, entre as citadas: parede vaginal anterior; parede vaginal posterior; ápice ou cúpula vaginal em pacientes histerectomizadas (1).

Os prolapsos vaginais e a incontinência urinária têm sua prevalência e incidência maiores com o decorrer da idade. A prevalência da IUE encontra-se entre 10-40% em mulheres acima de 40 anos, podendo atingir até 69% em idosas (2,3). Entre mulheres adultas e saudáveis, após os sessenta anos de idade, cerca de um terço possui algum grau de prolapso vaginal (4). Os principais fatores de risco associados com as afecções do assoalho pélvico são idade, número de gravidezes, via de parto, estado de pós-menopausa, dieta e mobilidade reduzida (2).

Essas afecções apresentam grande impacto social, econômico e psicológico. Fritel et al (2009), em estudo envolvendo 2640 mulheres de meia idade, após aplicação do questionário de qualidade de vida *Nottingham Health Profile*, identificaram que todos os domínios estudados (mobilidade física, reação emocional, isolamento social, energia e sono) apresentaram piores resultados entre as pacientes com prolapsos vaginais quando comparados com mulheres sem esse acometimento (5). Por outro lado, o tratamento dessas enfermidades tem resultados positivos sobre a sociedade e sobre a mulher individualmente, visto que melhora sua qualidade de vida e sua auto-estima (6, 7).

As vísceras pélvicas femininas são sustentadas pelos músculos do assoalho pélvico, que também atuam de forma ativa e sinérgica ao aparelho esfinteriano intrínseco da uretra durante o ciclo miccional. São constituídos por agrupamentos musculares identificados como diafragma pélvico e urogenital. O

primeiro é composto pelos músculos elevadores do ânus, músculos coccígeos e por fâscias que recobrem suas faces. O segundo é constituído pelos músculos transversos superficial e profundo do períneo, músculos bulbo-esponjoso, ísquio-cavernoso e suas respectivas fâscias. Além dessas estruturas, destacam-se aquelas que compõem o suporte anatômico da uretra feminina, tais como, o ligamento pubouretral e uretropélvico (8). A interação entre a contração de músculos do assoalho pélvico, estiramento de ligamentos de suporte, contração de músculos estriados do esfíncter uretral e selo da mucosa uretral previnem a incontinência urinária, como descrito na Teoria Integral da Continência (9). O enfraquecimento, a distensão e/ou o rompimento das estruturas que compõem, principalmente, o diafragma pélvico levam aos prolapsos urogenitais, os quais também se associam à diminuição dos níveis de estrogênio, à idade avançada, aos partos traumáticos e ao esforço abdominal repetitivo, entre outros fatores (10). Os prolapsos vaginais podem ser classificados, de acordo com sua localização anatômica, em anormalidades da parede vaginal anterior (cistocele), defeitos apicais (prolapso uterino ou da cúpula vaginal e a enterocele) e anormalidades de parede posterior (retoceles e roturas perineais) (4).

Uma mulher tem a probabilidade de 11% de necessitar de cirurgia para prolapso ao longo de sua vida e em, aproximadamente, 30% dos casos necessitará de reintervenções (11). Diversos tratamentos cirúrgicos, que, na sua maioria, baseiam-se em técnicas de correção exclusivamente com suturas, já foram utilizados com o intuito de corrigir a incontinência urinária e os prolapsos urogenitais, mas a recorrência do problema é comum em seguimento prolongado (12). O mesmo estudo de revisão demonstrou menor recidiva do prolapso vaginal anterior ao se utilizar próteses (poliglactina ou derme suína) quando comparada com técnicas convencionais (12).

Segundo dados, há recidiva do prolapso anterior em cerca de 60% dos casos após colporrafia anterior e em 20% após colposuspensão de Burch (13, 14, 15, 16). Kapoor et al (2010) estudaram 207 mulheres submetidas a colporrafia anterior e identificaram índice de recorrência do problema igual a 12% em apenas

3 meses de acompanhamento pós-operatório (17). Lunardelli et al (2009) compararam 16 mulheres submetidas a correção sítio-específico de cistocele com igual número submetido a implante de tela monofilamentar de polipropileno. O estudo utilizou parâmetros anatômicos de comparação e demonstrou superioridade do uso de telas (18). A correção sítio específica apresentou, ainda, complicações como obstrução ureteral bilateral, hematoma retropúbico e abscessos vaginais (19).

Em relação aos defeitos da parede vaginal posterior e região apical da vagina, a colpórrafia posterior associa-se a taxas de recorrência de 18% a 24% após um ano do procedimento (12,20). A sacroespinhosopexia também apresentou taxas de recorrência e complicações significativas, assim como a abordagem transanal da retocele, que, por sua vez, pode acarretar incontinência de gases e fezes, dor anal, estreitamento retal e fístulas retovaginais (21, 22).

Estudo com mulheres, que haviam sido submetidas a duas ou mais cirurgias para correção de prolapsos pélvicos sem sucesso e fizeram reparo com tela de Marlex<sup>®</sup>, demonstrou redução na taxa de recidiva de 33% para 0 % (23). Em outro estudo, de Tayrac (2005) comparou pacientes que realizaram colpórrafia anterior exclusivamente ou em associação com implante de tela de polipropileno e evidenciou que a taxa de sucesso no segundo procedimento (75%) foi superior à do primeiro (57%) (24). A eficácia da colpórrafia posterior com ou sem tela de polipropileno também foi comparada pelo mesmo autor, que comprovou diferença nas taxas de recorrência entre os grupos de 24%, com vantagem para o grupo que usou tela (25).

Em consenso publicado pela Sociedade de Cirurgiões Ginecológicos em 2008, é sugerido que o reparo de prolapsos vaginais baseado em tecidos nativos continua a ser o mais apropriado, quando comparado com enxertos biológicos (26). O uso de telas sintéticas pode melhorar resultados anatômicos do reparo vaginal anterior e incontinência urinária, mas não está livre de efeitos adversos e riscos adicionais relacionados aos materiais (27, 28, 29, 30). Além disso, não há

estudos comparativos adequados, que considerem o uso de material sintético na correção do prolapso vaginal posterior (26).

Em recente revisão da colaboração *Cochrane*, Lapitan et al (2009) reuniram 46 estudos, totalizando 4.738 mulheres com IUE e demonstraram que a colposuspensão retropúbica (Cirurgia de Burch) obteve sucesso no tratamento da incontinência em 70% dos casos após 5 anos da cirurgia. Esses valores foram superiores aos alcançados com a colporrafia anterior e não demonstraram diferença com os *slings* suburetrais. No entanto, a cirurgia de Burch apresentou maior índice de distopias vaginais e sintomas miccionais no pós-operatório quando comparada com as outras modalidades terapêuticas (31).

Sling é uma palavra de origem inglesa que significa laço, tipóia, gancho. Esse termo transmite, portanto, a imagem de sustentação de estruturas. A idéia de empregar *slings* suburetrais data do início do século XX. Giordano (1907) sugeriu o uso do músculo grácil ao redor da uretra (32). A partir daí, surgiram propostas de aperfeiçoamento da técnica, com destaque para Aldrige (1942), que foi o primeiro a descrever o emprego de retalhos da aponeurose do músculo reto do abdome, os quais eram suturados sob a uretra (33). Apesar de lançar as bases dos futuros *slings* aponeuróticos, tal procedimento determinava obstrução infravesical e não foi popularizado na época. Somente em 1978, McGuire e Lytton reintroduziram a técnica, desta vez utilizando as faixas de aponeurose do músculo reto abdominal na forma de enxertos, de maneira simples e padronizada, com o acesso combinado abdominal e vaginal (34).

O emprego dos *slings* se disseminou, sobretudo, a partir da década de 90, com a apresentação da Teoria Integral da Continência, por Petros e Ulmsten (1990). Segundo essa teoria, o assoalho pélvico feminino se comporta como uma unidade anatomo-funcional, que reage de maneira integrada aos defeitos estruturais e, também, à sua correção cirúrgica (35). Nela, foi valorizada a participação do suporte anatômico da uretra, composta de tecido conjuntivo, na manutenção da continência urinária e, ainda, proposto o seu reforço por meio de faixas sintéticas.

Com base nessa teoria, surgiram os *slings* sintéticos, minimamente invasivos, de uretra média, cujo precursor foi o *Tension-free Vaginal Tape (TVT®)*, que, após seu lançamento comercial, foi rápido e largamente popularizado (36,37). A partir da experiência com os *slings* pubouretrais de uretra média, Delorme (2001) propôs a ancoragem das faixas através do acesso transobturatório (38).

Em nosso meio, Bezerra et al (2005) realizaram revisão sistemática, com a base de dados *Cochrane*, sobre *slings* para tratamento da IUE. Embora o dispositivo tenha apresentado boa eficácia, não houve evidência suficiente para determinar a superioridade dos mesmos, em virtude do número pequeno de estudos que os compararam com outras formas de tratamento, e pela falta de padronização das informações (39).

Recentemente, a Associação Americana de Urologia lançou consenso sobre incontinência urinária, no qual são apresentados cinco tipos de procedimentos cirúrgicos recomendáveis para o tratamento da afecção: materiais injetáveis, colossuspensões laparoscópicas, *slings* de uretra média, *slings* pubovaginais e colossuspensões retropúbicas. Embora não sejam equivalentes, todos podem ser considerados para esse grupo de pacientes. Os novos materiais e novas técnicas desenvolvidas permitiram a realização de procedimentos com menor tempo cirúrgico, recuperação rápida e menor morbidade. No entanto, podem ocorrer complicações tais como: erosão uretral; extrusão vaginal; perfuração intestinal e lesão vascular. Tais complicações podem ser difíceis de tratar e, até, pôr a vida da paciente em risco. Dessa forma, a decisão do procedimento cirúrgico deve considerar a experiência do cirurgião, a disponibilidade de tecnológica e a opinião da paciente (40).

Atualmente, a escolha do material para confecção do *sling* suburetral envolve o emprego de material autólogo ou heterólogo, que, por sua vez, pode ser orgânico ou sintético. Formalmente, o *sling* heterólogo pode ser indicado em pacientes com reconhecida má-qualidade das fâscias autólogas, como naquelas com antecedentes cirúrgicos sobre o sítio doador da aponeurose e nas idosas ou portadoras de outras condições que, reconhecidamente, possam alterar a

resistência do colágeno. A essas indicações, somam-se outras vantagens, tais como o aspecto minimamente invasivo relacionado ao emprego dos *slings* artificiais, a eliminação do sítio doador e das suas possíveis complicações, e o menor tempo necessário para retorno às atividades habituais (40).

De forma oposta, as contra-indicações ao emprego de materiais heterólogos para suporte suburetral incluem antecedentes de reações alérgicas ao material proposto, além de outras restrições relativas, como o uso simultâneo desses materiais em cirurgias que envolvam uretroplastias (fístula uretrovaginal, divertículo uretral) e nas pacientes com antecedentes de irradiação pélvica ou com vaginite atrófica acentuada (40).

Do ponto de vista ideal, o material artificial a ser empregado como *sling* deve ser quimicamente inerte, não tóxico, não alergênico, induzir resposta inflamatória mais leve possível, ser resistente a infecções, não ser carcinogênico, permitir esterilização adequada e ser de fácil fabricação (41).

## **1.2-Emprego do polipropileno no assoalho pélvico**

O polipropileno é um material sintético, inerte, hidrofóbico e não absorvível. *Slings* constituídos desse material têm apresentado, experimentalmente, melhor integração tecidual quando comparados a outros materiais sintéticos (42).

Morgan (1970) descreveu o emprego da tela de Marlex<sup>®</sup>, confeccionada originalmente para herniorrafias, na forma de *sling* suburetral (43). A tela de Marlex<sup>®</sup> é confeccionada com polipropileno monofilamentar de gramatura elevada, o que confere elevada resistência à tensão, a qual é desejável nas herniorrafias. Entretanto, àquela época, a aplicação de tensão sobre o colo vesical, onde a faixa era habitualmente disposta, e as características físicas desse material, determinaram elevado índice de disfunções vesicais e de erosão uretral (44,45). Palma et al. (1992) apresentaram resultados semelhantes com o uso da tela de Marlex<sup>®</sup>, após o qual, o emprego foi abandonado (46).

O primeiro *sling* de polipropileno monofilamentar proposto para uso clínico foi descrito por Ulmsten et al. (1996) e originou o *Tension-free Vaginal Tape* (TVT<sup>®</sup>) (37). Foi considerado minimamente invasivo, pois necessitava apenas do acesso vaginal associado à passagem do material com o auxílio de agulhas e incisões puntiformes suprapúbicas. O mesmo autor publicou o primeiro estudo prospectivo com esse material, no qual descreveu o emprego ambulatorial do TVT<sup>®</sup>, sob anestesia local, em 131 pacientes com incontinência urinária de esforço. Após seguimento de 12 meses, os autores descreveram índice de cura de 91%, sem complicações significativas (47).

Ainda na década de 90, esse material foi proposto, novamente, para confecção de *slings* artesanais, com a incorporação de novos cuidados técnicos, que incluíram emprego de faixas mais estreitas (com cerca de 1 cm de largura), não ancoradas por meio de suturas e dispostas no terço uretral médio, conforme os conceitos descritos por Delancey (1990) e na Teoria Integral da Continência (35,48). Assim, o *sling* determinaria suporte uretral semelhante ao atribuído ao ligamento pubouretral e à fáschia pubocervical (49). Petros (1999), utilizando um faixa de polipropileno multifilamentar denominada *Intravaginal Slingplasty* (IVS<sup>®</sup>), descreveu cura da incontinência em 81% das pacientes após quatro anos do implante desse material (50).

Os *slings* sintéticos de polipropileno, atualmente em uso, podem ser diferenciados, principalmente, pelo trançamento dos filamentos utilizados na sua confecção e tamanho dos poros da tela. Dessa forma, temos telas multifilamentares e monofilamentares, além de telas macroporosas ou microporosas, como apresentado na tabela 1 (51). Considera-se que tais diferenças podem determinar alterações da sua biocompatibilidade e, conseqüentemente, diferente tendência à infecção, erosão uretral e extrusão vaginal (52).

**Tabela 1: Classificação dos tipos de tela de polipropileno**

<b>Tipo de Tela</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>
Tipo I	Monofilamentar e Macroporosa (>75 nm)	Marlex <sup>®</sup> , SAFYRE <sup>®</sup>
Tipo II	Multifilamentar e Microporosa (<10nm)	Gore-Tex <sup>®</sup> , IVS <sup>®</sup>
Tipo III	Multifilamentar com Macro e Microporos	Surgipro <sup>®</sup>
Tipo IV	Poros Submicrônicos	Cellgard <sup>®</sup>

Os *slings* de polipropileno disponibilizados pela indústria, para aplicação na uretra média, tornaram-se cada vez mais empregados no tratamento da incontinência urinária de esforço (53). Estudo europeu mostrou que as chamadas faixas “sem tensão” eram empregadas em 84,9% dos procedimentos de *slings* em portadoras de incontinência urinária de esforço, realizados no continente em 2003 (54).

Entretanto, apesar dos bons resultados iniciais, surgiram vários relatos de complicações envolvendo o uso dessas telas. Ganj et al (2009) estudaram 130 mulheres com prolapso vaginais submetidas a correção com uso de reforço com tela de polipropileno monofilamentar. Em seguimento de 18 meses, não houve recidiva do prolapso, mas 10,2% das pacientes apresentaram extrusão vaginal da malha, 22% dor na região da nádega, 18,1% incontinência urinária *de novo* e 2,4% dispareunia (55). Outro estudo reportou resultados do uso de Apogee<sup>®</sup> (tela de polipropileno monofilamentar usada em correção de prolapso vaginal posterior) e Perigee<sup>®</sup> (tela de polipropileno monofilamentar usada em correção de prolapso vaginal anterior) na correção de prolapso urogenitais. O sucesso apresentado foi de 93% e índice de extrusão vaginal de, apenas 3%, sendo todos os casos com utilização da tela Perigee<sup>®</sup>. Além disso, o estudo também demonstrou melhora nos parâmetros de sexualidade e satisfação das pacientes. Os autores atribuíram esses bons resultados à experiência da equipe cirúrgica e à seleção de casos, privilegiando pacientes mais jovens, sem histerectomia e sem co-morbidades, como diabetes mellitus (56).

Moore et al 2009, por sua vez, estudaram mulheres submetidas a correção de prolapso vaginal utilizando-se telas de polipropileno monofilamentar e identificaram índice de extrusão de até 20%. A conduta nesses casos se baseou no uso de antibióticos orais e estrógenos tópicos. No entanto, até 50% dessas pacientes necessitaram de procedimento cirúrgico para remoção da porção exposta da tela (57).

Ao comparar, prospectivamente, o uso de tela de polipropileno monofilamentar e macroporosa com correção sítio-específica de prolapso vaginal anterior, Sivaslioglu et al (2008) demonstraram superioridade com o uso de telas no que tange ao sucesso anatômico da correção, apresentando índice de 91% versus 72% do grupo sem uso de malha. Além disso, houve melhora significativa dos sintomas miccionais como urgência, freqüência e noctúria em ambos os grupos. No entanto, extrusão de tela ocorreu em 6,9% e retenção urinária e dispareunia só foram observadas no grupo que utilizou tela (58).

Estudos com telas multifilamentares também demonstraram importantes complicações. Baessler et al. (2003) e Glavind e Sander (2004), respectivamente, descreveram taxa de extrusão de 9% e 14% em pacientes que realizaram *Intravaginal Slingplasty* (IVS<sup>®</sup>) (59,60). Siegel et al. (2005), confirmando esses achados, descreveram extrusão vaginal em 17% das pacientes que realizaram *Sling* pubovaginal com IVS<sup>®</sup> (61).

Outros estudos, envolvendo telas de polipropileno monofilamentar no tratamento da IUE, apresentaram menores índices de extrusão vaginal e de erosão uretral que aqueles observados com telas multifilamentares. Esses achados devem, portanto, estar relacionados com características físico-químicas da tela (Tabela 2).

**Tabela 2. Slings de polipropileno monofilamentar: erosão e extrusão**

<b>Autor</b>	<b>Sling</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Erosão (%)</b>	<b>Extrusão (%)</b>
Karran et al. (2003) (62)	TVT®	350	0,3	0,6
Rodriguez e Raz (2003) (63)	Artesanal	301	0	0,3
Kobashi e Govier (2003) (64)	Artesanal	90	0	4,4
Levin et al. (2004) (65)	TVT®	313	0	1,3
Tsivian et al. (2004) (66)	TVT®	200	0,5	2,5
Palma (2005) (67)	Safyre®	126	0	3,1

Considera-se que, enquanto a erosão uretral relaciona-se, freqüentemente, com tensão elevada ou lesão inadvertida da uretra durante o procedimento, a extrusão vaginal decorre de infecção local, por vezes sub-clínica ou de integração defeituosa do *sling* ao hospedeiro (61).

Estudos acerca da integração de telas no reparo de prolapso genitais demonstraram que os fatores locais, como trofismo tecidual, infecção e a técnica cirúrgica, estão diretamente relacionados às taxas de extrusão (68, 69). Além disso, a reação tecidual está relacionada ao peso, estrutura e porosidade das telas (70, 71). Vários fatores técnicos também foram implicados com o risco de extrusão vaginal da tela de polipropileno. Entre eles, podemos citar: via de introdução da tela; tamanho da incisão utilizada; adequado posicionamento e estiramento da malha; histerectomia concomitante; e, até, experiência do cirurgião (72, 73, 74).

Outros tipos de materiais e recobrimentos foram estudados para uso clínico, mas não demonstraram superioridade ao polipropileno Tipo I (75, 76, 77, 78, 79, 80). Govier et al (2005) estudaram telas de poliéster com recobrimento de silicone e demonstraram índices inaceitáveis de complicações quando utilizados como *slings* suburetrais ou malha para sacrocolpopexia (81, 82). Em outro estudo, a utilização de tela combinada, composta de polipropileno e poliglactina, apresentaram índice de extrusão vaginal de 30% e recorrência do prolapso vaginal posterior de 22% (83).

### 1.3- Efeitos Biológicos do Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um poderoso vasodilatador sintetizado por neurônios, células endoteliais, leucócitos e plaquetas, entre outros (84). O NO é sintetizado enzimaticamente através da conversão de L-arginina em L-citrulina (85). Três isoformas distintas de enzimas produtoras de NO foram identificadas em seres humanos e outros organismos: A NO-sintetase neuronal (nNOs) e a NO-sintetase endotelial (eNOs), expressas constitutivamente, e a NO-sintetase induzível (iNOs), regulada pela estimulação de citocinas (86). Esta última produz quantidades que excedem a quantidade de NO produzida pelas outras duas.

Suas propriedades biológicas vêm sendo extensamente estudadas (84, 87, 88, 89). Alguns trabalhos já demonstraram ações para a molécula, tais como: regulação do tônus vasomotor; inibição da agregação plaquetária; inibição da replicação de células musculares lisas; modulação de resposta imune e comunicações neuronais (90, 91, 92). Essas ações parecem estar relacionadas com a propriedade do NO de modular citocinas e fatores de crescimento (93, 94). Engelsman et al (2009) demonstraram, *in vitro*, a capacidade, apresentada por substâncias doadoras de NO, de reduzir um biofilme de bactérias comumente responsáveis por infecção em implantes, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (95).

Seus efeitos sobre a cicatrização envolvem modulação do processo inflamatório, estímulo à angiogênese e à proliferação de células endoteliais. Gifford (2005) demonstrou que um sensor de glicose tipo agulha recoberto por substância doadora de NO reduz de forma significativa a mobilização de células inflamatórias ao redor do implante (96). Hetrick et al (2007) conduziram estudo com fragmentos de silicone recobertos por doadores de óxido nítrico e demonstraram menor infiltrado inflamatório, maior formação vascular e menor deposição colágena ao redor dos fragmentos (97). Além disso, a inibição da síntese de NO prejudica o processo de cicatrização (98). Tais fatos conduzem à

hipótese de que a administração exógena de moléculas doadoras de NO pode ser benéfica ao processo de cicatrização.

S-nitrosoglutathione (GSNO) é um S-nitrosotiol encontrado endogenamente em mamíferos, que age como um carreador de óxido nítrico e possui efeitos biológicos (99, 100, 101, 102). Um hidrogel contendo GSNO já demonstrou aumentar o fluxo sanguíneo local em indivíduos saudáveis (103) e em modelos animais (98). Esses resultados comprovaram o potencial dessa formulação em interagir com tecidos adjacentes ao implante sem efeitos sistêmicos significativos. Recentemente, foi publicado que a aplicação tópica do mesmo gel contendo GSNO, em feridas agudas de modelos animais, levou a uma melhora no processo de cicatrização, representada pela aceleração da contração da ferida e organização do tecido de granulação (104,105).

O uso biológico dos S-nitrosotióis exige sua combinação com matrizes poliméricas que sejam responsáveis por estabelecer o contato com os tecidos adjacentes, mantendo a capacidade de eluição, ou seja, de liberação dessas moléculas. Comumente, utilizam-se polímeros hidrossolúveis, tais como Poli(álcool vinílico)(PVA) e/ou Poli(vinil pirrolidona) (PVP).

Poli(álcool vinílico)(PVA) é um polímero com reconhecido potencial de uso biológico, diante de suas propriedades mecânicas e biocompatibilidade favoráveis (106). Essa substância pode ser apresentada como solução ou filme e, facilmente, recobrir dispositivos para uso médico, tais como stents, biosensores ou telas (107). As combinações de PVA com polímeros como colágeno, ácido hialurônico, gelatina e ácido desoxirribonucléico já foram testadas para usos clínicos (107). Além disso, PVA já foi utilizado pela indústria farmacêutica para confecção de cápsulas e hidrogel, contendo drogas bioativas (108). Dessa forma, essa substância tem propriedades que permitem seu uso como um veículo das moléculas de S-nitrosoglutathione (GSNO).

Poli(vinil pirrolidona) (PVP) é um dos polímeros mais utilizados em Medicina devido à sua solubilidade em água e sua baixa toxicidade (109, 110). Wang et al (2003) descreveu uso do PVP como aplicação tópica na pele,

objetivando difusão transdérmica de drogas (111). Seabra & Oliveira (2004) descreveram a blenda, ou seja, a combinação de PVA/PVP como matriz polimérica para eluição de carreadores de óxido nítrico (112). Seabra et al (2005) já demonstraram capacidade de liberação de GSNO a partir de um filme sólido de polímeros PVA/PVP, incorporado com o carreador de NO (113).

A modulação do processo inflamatório, que essas substâncias demonstraram apresentar em outros estudos, pode ser valiosa na redução das complicações relacionadas ao uso das telas sintéticas e, conseqüentemente, pode melhorar a adaptação das mesmas ao organismo biológico. Não há, até o momento, publicações na literatura científica, que façam referência ao recobrimento de telas de polipropileno com substância carreadora de NO, objetivando melhorar integração das mesmas nos tecidos vaginais e uso clínico na correção da IUE e Prolapsos vaginais. Hetrick et al (2007) recobriram fragmentos de silicone com hidrogel incorporado com GSNO e demonstraram melhor integração tecidual, como descrito anteriormente (97). Dessa forma, justificam-se estudos com o intuito de testar recobrimentos para a tela de polipropileno, usufruindo das propriedades que essas substâncias já evidenciaram ter. No presente estudo, utilizaram-se, com esse intuito, matrizes poliméricas sólidas de eluição compostas de PVA ou de PVA blendado com PVP, incorporado ou não com GSNO.

## ***2- Objetivos***

## **2.1- Objetivo Geral:**

Estudar a resposta tecidual de telas de polipropileno monofilamentar recobertas com matrizes poliméricas eluidoras de GSNO, implantadas no subcutâneo de ratas adultas.

## **2.2- Objetivos Específicos:**

Avaliar as características histológicas da reação inflamatória induzida por telas de polipropileno recobertas com matrizes poliméricas, incorporadas com duas concentrações diferentes de GSNO, quando implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas.

Avaliar, por meio estereológico, a deposição colágena na superfície de implantes de polipropileno, recobertos com matrizes poliméricas, incorporadas com duas concentrações diferentes de GSNO, quando implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas.

## ***3- Materiais e Métodos***

### 3.1- Aprovação pelo Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEAA/UNICAMP), sob protocolo nº 1590-1, de 15 de setembro de 2008 (Anexo 8.1).

### 3.2- Padronização da Técnica de Recobrimento das Telas

Para a confecção das telas a serem utilizadas nos experimentos, foram feitos testes no Instituto de Química da UNICAMP, visando à escolha das substâncias que seriam utilizadas como matriz polimérica e como carreadora de NO. Devido a pesquisas anteriores do Instituto de Química / UNICAMP, optou-se pelo Poli(álcool vinílico)(PVA) e uma blenda de PVA e Poli(vinil pirrolidona) (PVP) como alternativas de veículos de eluição de S-nitrosoglutatona (GSNO) (Figura 1) (113).

As soluções aquosas de GSNO foram preparadas em concentrações de 1 e 10mM. A relação entre a concentração aquosa da GSNO e aquela obtida após reação com a matriz polimérica é apresentada a seguir:

GSNO 1mM = 39,47 micromol GSNO / g de filme (PVA ou PVA/PVP)

GSNO 10mM= 352,6 micromol GSNO/g de filme (PVA ou PVA/PVP)

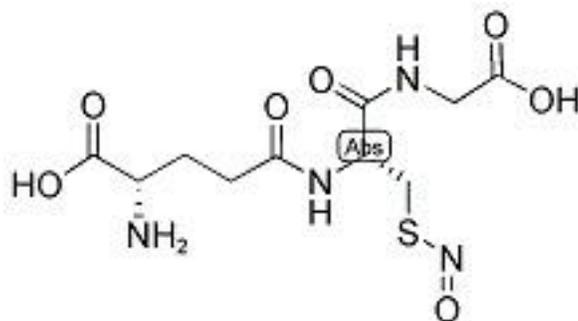


Figura1: Estrutura Molecular da S-Nitrosoglutatona (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S)

A síntese do GSNO foi realizada segundo descrito por Seabra et al. (2004), através da reação de quantidade equimolar de glutathiona reduzida com nitrito de sódio, em meio ácido (103).

Utilizou-se de solução aquosa de PVA a 2,5% m/v (Massa molecular 85000 – 146000 g/mol) para testar qual a melhor maneira de revestir a tela. Para tanto, experimentou-se o método de imersão e o de aspersão. Concluiu-se que este último resultou na distribuição mais adequada do material polimérico à tela, com repartição uniforme e sem a oclusão dos poros da tela como revelado por fotomicroscopia eletrônica de varredura (Figura 2). Assim, o preparo das telas foi padronizado através do método de aspersão da solução polimérica. As etapas do procedimento são as seguintes:

- Preensão da tela em pinça em forma de Y e fixação do conjunto em um agitador mecânico rotativo;
- Aspersão da solução polimérica na tela com nebulizador;
- Rotação horizontal do conjunto no agitador durante 10 min;
- Resfriamento da tela em congelador por 1 h, seguido de retirada e manutenção em temperatura ambiente por 1 h e novo resfriamento por 1 h, visando tornar a matriz polimérica insolúvel;
- Liofilização da tela por, no mínimo, 24 h sob temperaturas inferiores a 80°C negativos.

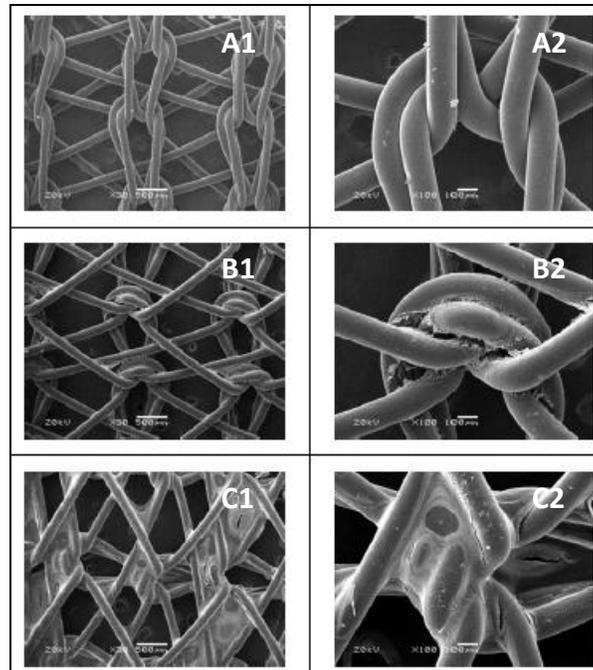


Figura 2: Fotomicrografias de varredura eletrônica de telas de PP: A- Sem recobrimento; B: Recoberta com técnica de aspersão; C: Recoberta com técnica de imersão. (Aumento A1/B1/C1: 30x , A2/B2/C2: 100x)

### 3.3- Estudo *in vitro* da difusão da GSNO

Foi realizado estudo *in vitro* para avaliar a difusão da GSNO das telas em solução tampão fosfato. Telas recobertas com PVA + GSNO 1mM foram imersas em solução tampão de fosfato, pH 7,4 a 37 °C. A eluição de GSNO a partir das telas foi quantificada em intervalos de tempo de 2,5, 5, 10, 15, 20 e 30 min através da dosagem de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) por quimiluminescência. Foi observado que a liberação de quase a totalidade da GSNO ocorreu nos primeiros 5 min (Figura 3). Considerando-se que o interstício tecidual é um meio de solubilidade semelhante ao descrito anteriormente, este dado permite considerar que a GSNO elui dos fragmentos de tela implantados, o que permitiria sua ação nos tecidos adjacentes.

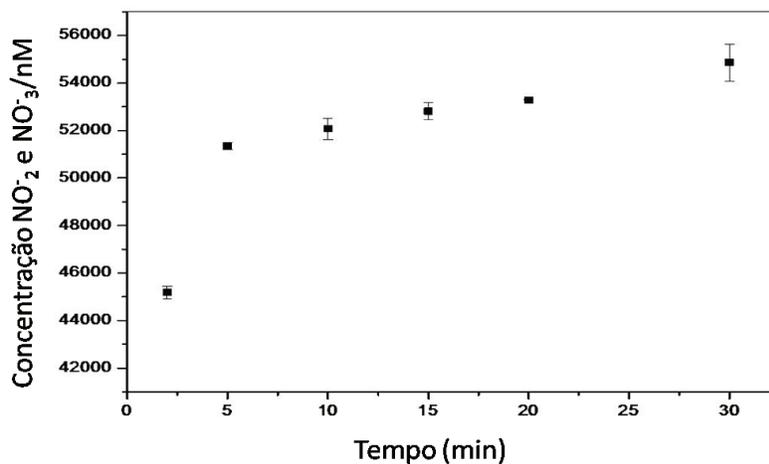


Figura 3: Concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nM) em solução tampão fosfato em função do tempo (min). Note a intensa liberação molecular até 5 minutos.

### 3.4- Composição dos Grupos

Cada animal recebeu quatro fragmentos de tela e foram divididos segundo a matriz polimérica usada e a data de eutanásia, como apresentado a seguir:

Dez animais receberam telas sem recobrimento e telas recobertas com PVA, PVA+GSNO1mM e PVA+GSNO10mM. Cinco ratas foram eutanasiadas 48 horas após o procedimento e cinco após 21 dias da cirurgia.

Dez animais receberam telas sem recobrimento e telas recobertas com PVA/PVP, PVA/PVP+GSNO1mM e PVA/PVP+GSNO10mM. Cinco ratas foram eutanasiadas 48 horas após o procedimento e cinco após 21 dias da cirurgia.

A disposição dos fragmentos de tela no abdome das ratas pode ser visto na figura 4.

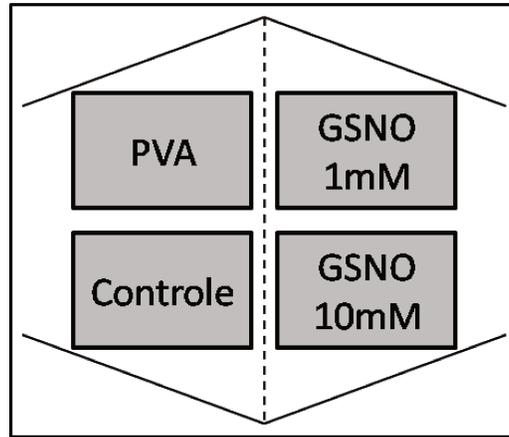


Figura 4: Disposição dos fragmentos de tela no abdome da rata

### 3.5- Procedimento cirúrgico

O estudo foi realizado com 20 ratas adultas da linhagem Wistar, com idade média de 180 dias, adquiridas no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Unicamp. Os animais permaneceram em quarentena inicialmente, durante a qual receberam os cuidados necessários no Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas, a fim de se excluir doenças próprias desta linhagem. Em seguida, foram transferidos para o Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da UNICAMP, onde foram alojados em gaiolas contendo cinco animais cada, sob condições semelhantes de alimentação, temperatura, umidade e luz.

#### *Técnica para o implante das telas*

- a) Jejum pré-operatório, com restrição alimentar a alimentos sólidos, nas 4 horas que antecedem o procedimento;
- b) Anestesia com Pentobarbital Sódico 3% (Hypnol<sup>®</sup>), administrado através de punção da veia caudal com *scalp* 23 G, em dose correspondente a 0,15mg/g de peso. Manutenção do nível anestésico com administração complementar de 0,05 a 0,10 mg/g de peso, segundo a necessidade;

- c) 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;
- d) Realizadas duas incisões medianas, uma próxima a sínfise púbica e a outra próxima ao processo xifóide. Realizada a dissecação do tecido subcutâneo até exposição da fáscia da musculatura abdominal;
- e) Realizada fixação dos fragmentos de tela de 10 mm por 10 mm sobre a fáscia, paralelamente à linha alba, com ponto único de fio de polipropileno 5-0 de modo a mantê-los fixos e prover meio de identificação do local do implante (figura 5). Em seguida, foram suturadas incisões da pele com pontos separados, utilizando-se fio de seda 5-0.
- f) Após o despertar, os animais foram transferidos para a gaiola de recuperação anestésica. A analgesia pós-operatória, quando necessária, foi realizada com solução de dipirona intramuscular, na dose de 15 mg/kg.

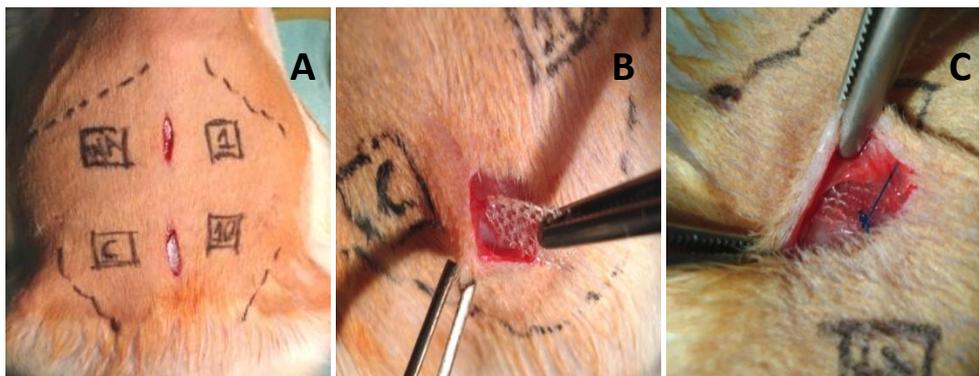


Figura 5: Fotografias do procedimento cirúrgico. A: Incisões medianas; B: Introdução do fragmento de tela; C: Fragmento fixado com fio polipropileno.

### 3.6- Eutanásia dos animais, coleta e preparo das amostras teciduais

Durante o período de observação não houve morte de nenhum animal e não foi observada nenhuma reação sistêmica ou local no abdome das ratas, como a formação de abscessos, deiscência das suturas ou extrusão das telas, que denotasse toxicidade local significativa.

Após 48 horas dos procedimentos, dez ratas foram eutanasiadas com dose letal de Pentobarbital Sódico 3% (Hypnol<sup>®</sup>) e o mesmo ocorreu após 21 dias com as ratas restantes. Após a eutanásia, foi realizada a retirada em bloco da parede abdominal, de maneira a preservar as relações anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio. Na análise macroscópica, realizada durante o procedimento, não se evidenciou nenhum sinal de eritema, necrose, edema e coleções. De cada rata foram retirados quatro fragmentos da parede abdominal de aproximadamente 15 x 15 mm, correspondendo à área em que estavam os quatro fragmentos de tela descritos acima.

As amostras de tecido tiveram suas extremidades presas com alfinetes, em placas de material rígido, impedindo retrações e dobras durante a fixação e desidratação do material. 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% e nessa solução mantidas por mais 48 horas.

A seguir, cada fragmento foi seccionado em retângulos menores (15mm x 2mm) e depositados em caixetas plásticas apropriadas, identificadas com a especificação do fragmento de tela e do animal, para inclusão em parafina.

Os blocos de parafina produzidos foram utilizados para confecção de lâminas com 5 µm de espessura, que foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosirius Red. Os blocos e lâminas foram confeccionados no Laboratório de Patologia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas.

### **3.7- Avaliação do Infiltrado inflamatório Agudo**

A avaliação microscópica foi realizada empregando-se um Microscópio Zeiss Primo Star<sup>®</sup>, com a aquisição das imagens por meio de uma câmera Zeiss

AxioCam Icc 1<sup>®</sup>. As imagens eram processadas e armazenadas com o auxílio do Software AxioVision V 4.8.0.0 (Carl Zeiss Imaging Solutions<sup>®</sup>).

Foram avaliadas três variáveis: presença de infiltrado inflamatório agudo, edema intersticial e presença de vasos neoformados (angiogênese) ao redor do local do implante das telas.

Cada uma dessas variáveis foi avaliada por meio da graduação em quatro categorias: ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). Consideraram-se, para essa avaliação, critérios diferentes para cada variável.

Para o estudo do edema foi padronizado aumento de 40x, sendo a área de interesse definida entre o implante e os tecidos circunvizinhos, conforme exemplificado na Figura 6.

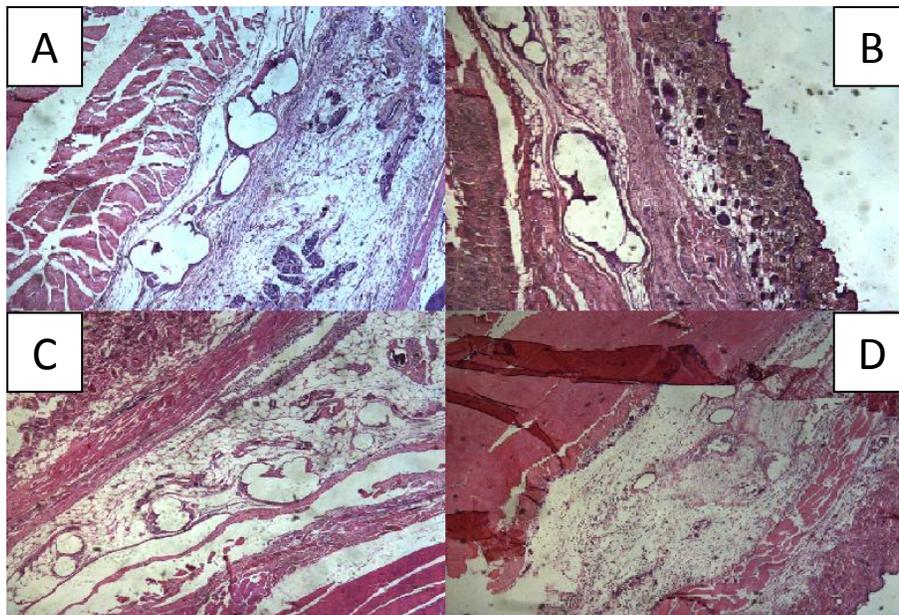


Figura 6: Avaliação do edema tecidual. (A) Ausente. (B) Leve. (C) Moderado. (D) Intenso. (HE, 40x)

O infiltrado inflamatório foi avaliado com aumento de 100x e classificado como leve (categoria 1), moderado (categoria 2) ou intenso (categoria 3) quando ocupava menos de 25%, cerca de 50%, ou mais que 50% do campo estudado, respectivamente (Figura 7).

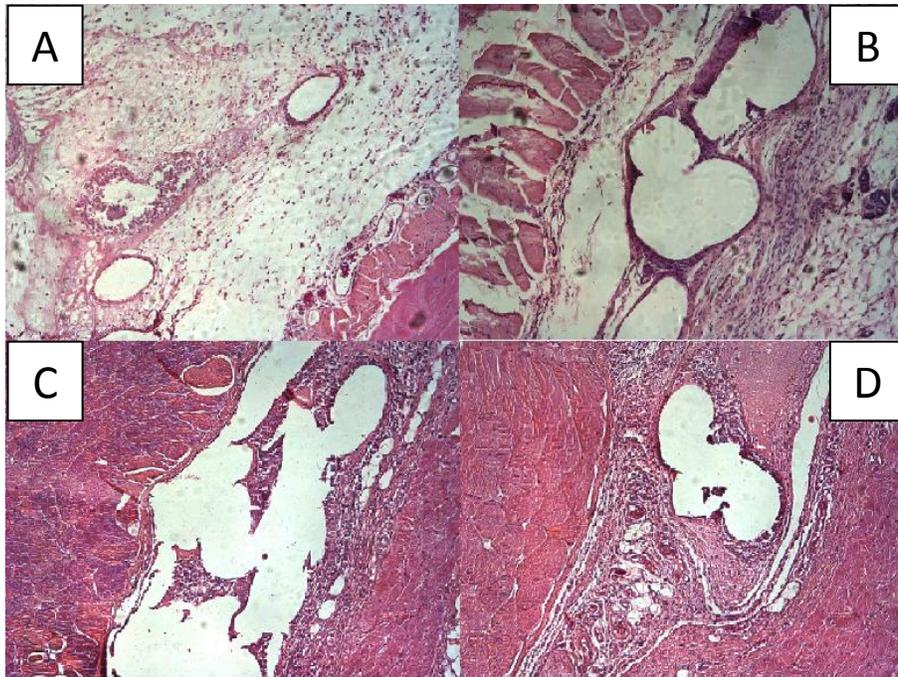


Figura 7: Avaliação do infiltrado inflamatório. (A) Ausente. (B) Leve. (C) Moderado. (D) Intenso. (HE, 100x)

O estudo da angiogênese foi realizado nas lâminas coradas com HE e sob aumento de 400x. Em cada campo estudado, foram contados o número de vasos neoformados e definidas as seguintes categorias: ausência de vasos identificáveis no campo (Categoria 0); até dois vasos identificados (Categoria 1); entre 3 e 6 vasos (Categoria 2); mais que 6 vasos (Categoria 3) (Figura 8).

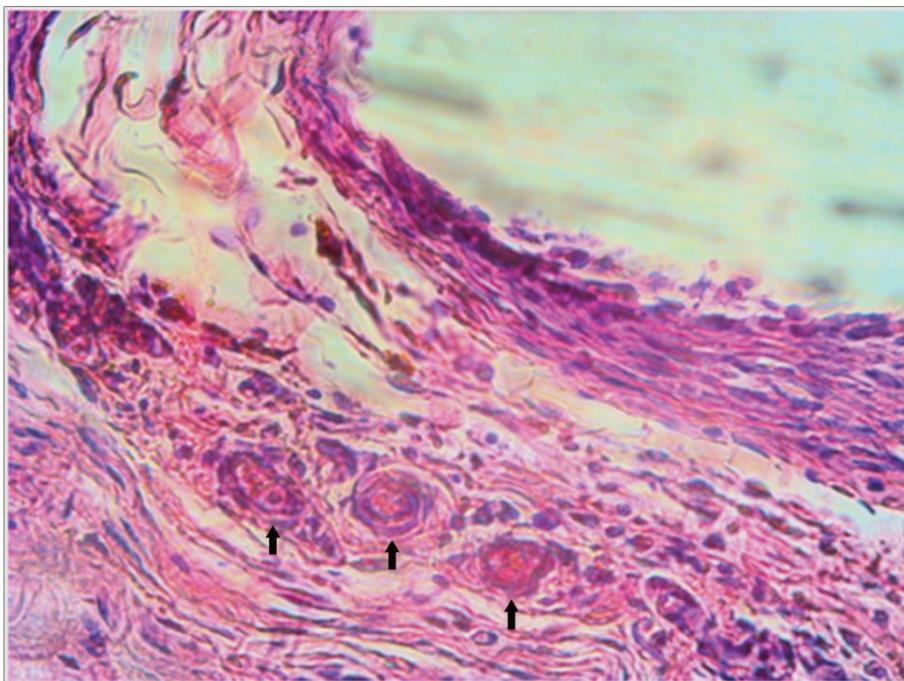


Figura 8: Avaliação da angiogênese. As setas identificam vasos neoformados (HE, 400x).

Todas as lâminas foram observadas pelo mesmo pesquisador. Para tanto, inicialmente, todas as lâminas foram numeradas, sequencialmente, por uma funcionária do NMCE, para que o pesquisador não tivesse informações sobre qual rata, fragmento ou qual a data da eutanásia que estava sendo analisada. Ao final da avaliação, a funcionária do NMCE entregou ao pesquisador uma lista que relacionava os números das lâminas com sua identificação inicial (animal, fragmento e tempo para eutanásia), para que fosse realizada a análise estatística.

Todos os dados foram tabulados em planilhas Microsoft Excel 2007<sup>®</sup>.

### **3.8- Avaliação das Fibras Colágenas**

A avaliação das fibras colágenas foi realizada apenas nas ratas eutanasiadas após 21 dias, uma vez que, durante o processo de cicatrização, a deposição colágena torna-se significativa após o período de cinco a sete dias.

Para a quantificação das fibras colágenas na superfície do implante, optou-se pela técnica estereológica. Essa técnica permite determinar com precisão a quantidade de certa estrutura em um espécime tridimensional, a partir de cortes histológicos bidimensionais. Para tanto, o preparo das lâminas seguiu técnica já descrita anteriormente e foi empregada a coloração com o Picrosirius Red. Essa coloração tem a característica de corar em vermelho as fibras colágenas do tecido estudado. Montes & Junqueira (1991) já apresentaram as vantagens de se utilizar essa coloração no estudo das fibras colágenas (114).

Para se proceder a avaliação estereológica, um importante conceito se refere à isotropia dos cortes histológicos. Uma estrutura é considerada isotrópica quando, ao ser analisada por meio de um corte histológico, não é possível diferenciar qual a sua orientação espacial (115,116). Exemplos característicos desse tipo de estrutura são o fígado e a glândula tiróide. Por outro lado, para o estudo de estruturas anisotrópicas, tais como a pele, há duas opções metodológicas, visando manter a confiabilidade da técnica de estereologia. A primeira é a realização de cortes perpendiculares entre si (Tipo Orientador), a qual garante que qualquer parte da estrutura terá a mesma probabilidade de ser amostrada. Outra possibilidade é realizar cortes longitudinais planos em um eixo axial fixo, mas arbitrário (Tipo Linear) (Figura 9).

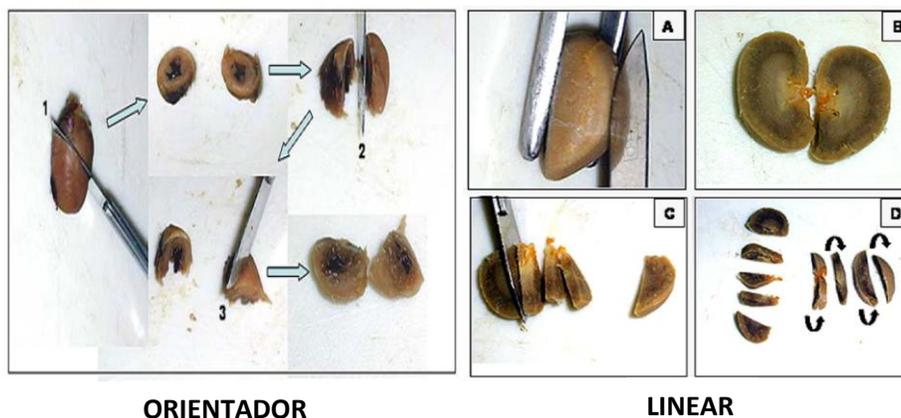


Figura 9: Tipos de corte propostos para estruturas anisotrópicas durante o método estereológico (116)

A avaliação das estruturas através desse método é realizada por meio de Sistemas-Teste, que são um conjunto de linhas (retas ou curvas) e pontos. Esse conjunto forma uma grade, que é superposta à imagem morfológica a ser estudada, para que as estruturas em questão possam ser contadas (115). A seguir são apresentados alguns exemplos de sistemas-teste:

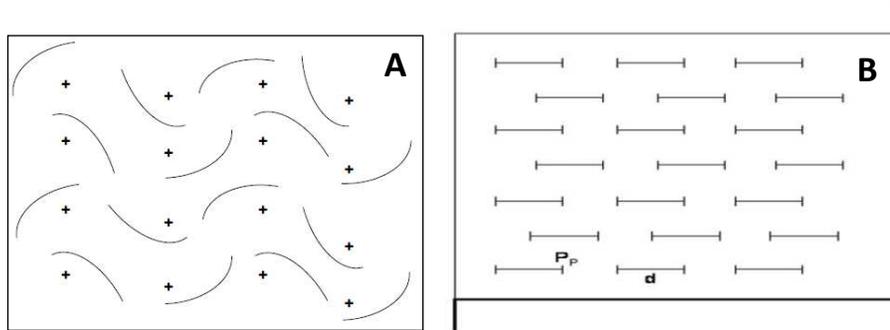


Figura 10: Exemplos de Sistemas-Teste utilizados em Estereologia. (a) Sistema de Arcos Ciclóides. Usado para cortes tipo Linear; (B) Sistema M-42. Usado para cortes tipo orientador.

No presente estudo, foram utilizados cortes lineares e, portanto, tornou-se imperioso o uso da grade de arcos ciclóides para a contagem das estruturas, pois esse sistema-teste apresenta características que compensam os cortes não uniformes de estruturas anisotrópicas, graças aos princípios geométricos da figura formada pelos arcos.

Todas as lâminas foram numeradas, seqüencialmente, por uma funcionária do NMCE, para que o pesquisador não tivesse qualquer informação sobre qual rata, fragmento ou data da eutanásia que estava sendo analisada. Na avaliação das lâminas, inicialmente, era feita a varredura sob aumento de 40x. Quando era identificado o local de implante da tela, sob aumento de 100x, era realizada a captura das imagens dos campos microscópicos correspondentes às regiões ao redor da tela implantada. As imagens eram armazenadas no formato de arquivos JPEG e analisadas no Software Image J 1.40g<sup>®</sup>. Era realizada a sobreposição digital da grade de arcos ciclóides aos fotomicrogramas, como

exemplificado na Figura 11. A contagem das estruturas que tocavam as extremidades dos arcos era realizada e os dados armazenados em planilha do Software Microsoft Excel 2007<sup>®</sup>. A seguir, a densidade volumétrica (Vv) das fibras colágenas em cada campo analisado era calculada, utilizando-se a fórmula a seguir:

$Vv = Pp/Pt \times 100\%$ , onde: Vv é a densidade volumétrica; Pp é o número de pontos da estrutura em estudo que tocam as extremidades dos arcos e Pt é o número total de pontos-teste (a grade utilizada apresenta 70 pontos).

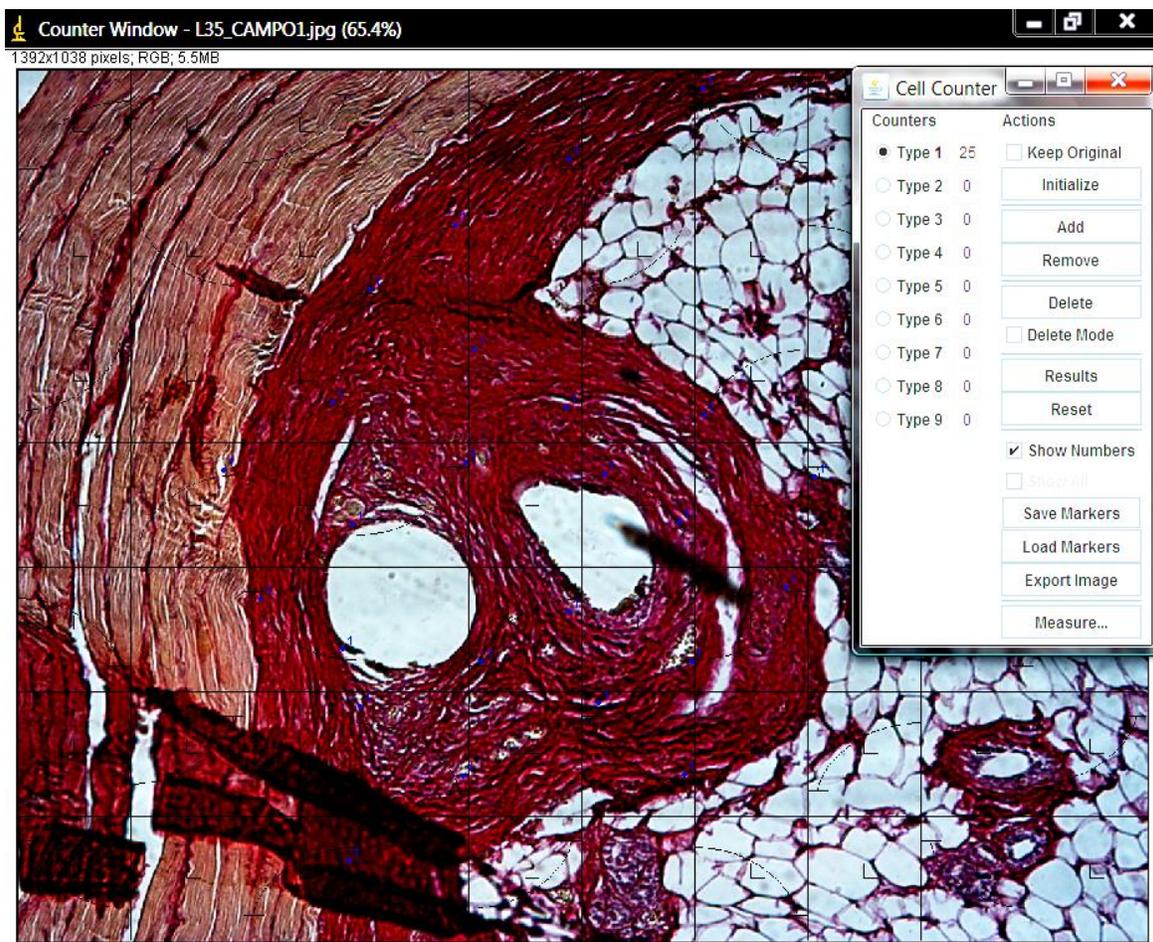


Figura 11: Exemplo de avaliação estereológica de fotomicrografia com a grade de arcos ciclóides. Note, em azul, os pontos nos quais há o cruzamento entre os feixes de fibras colágenas e as extremidades dos arcos. Também pode ser observado, acima e à direita, o contador indicando 25 pontos de intersecção com a estrutura (Pp)

### 3.9- Análise Estatística

O objetivo foi testar a diferença entre os tipos de recobrimento, eventuais efeitos atribuíveis às matrizes poliméricas empregadas e a influência do tempo decorrido do implante.

Para as comparações envolvendo as variáveis infiltrado inflamatório, edema e angiogênese, foi empregado o teste exato de Fisher. A comparação entre os tempos de eutanásia (2 e 21 dias) foi realizada utilizando-se o teste ANOVA. O nível de significância foi 5%.

Na análise estereológica da deposição colágena, para o cálculo do número de campos a serem observados em cada animal, utilizou-se equação proposta por Jephcot & Hally (1970), válida para a quantificação de fibras colágenas (117):

$EPR = \sqrt{\frac{(1-Vv)}{n}}$ ; EPR: Erro padrão relativo, Vv: Densidade de volume da estrutura em análise; n: número de pontos a serem contados.

Assim, para EPR de 0,05 (nível de significância de 5%) e Vv, estimado em estudo piloto anteriormente, de 35%, temos:

$0,05 = \sqrt{\frac{(1-0,35)}{n}}$ ; n= 260 pontos da estruturas que deverão ser contados.

Como a estimativa é que 35% do total pontos contados sejam de estrutura (Vv), então o total de pontos será:  $n_{total} = n_{calculado} / Vv$ , ou  $n_{total} = 260/0,35$ , portanto:  $n_{total} \sim 743$  pontos.

Como cada grade tem 70 pontos, cerca de 10 campos deveriam ser analisados em cada animal. No presente estudo, avaliamos 238 campos, em 10 animais eutanasiados aos 21 dias. A média foi, portanto, de 23,8 campos / animal.

Para análise dos resultados obtidos na avaliação das fibras colágenas, optou-se por testes não-paramétricos devido à rejeição da hipótese de

normalidade. A avaliação das amostras pareadas foi realizada com teste de Wilcoxon e a comparação entre todas as populações foi realizada com Teste de Friedman.

## ***4. Resultados***

Não houve óbito entre os animais. A partir de cada animal, eutanasiado no 2º ou 21º dias de pós-operatório, confeccionaram-se quatro lâminas, sendo cada uma delas representativa de um fragmento testado. As lâminas possuíam, aproximadamente, quatro cortes do fragmento. Para avaliação das variáveis de processo inflamatório agudo, selecionaram-se cinco campos mais representativos em cada lâmina. Na avaliação das fibras colágenas, selecionaram-se tantos campos quantos foram necessários para representar toda a região ao redor das telas implantadas.

Dessa forma, o total de campos analisados em cada uma das variáveis do processo inflamatório agudo nas ratas eutanasiadas aos dois dias foi 68. Para os animais eutanasiados aos 21 dias, esse valor foi de 188 campos, enquanto na avaliação das fibras colágenas, o total foi 238.

Como, durante a avaliação das variáveis do processo inflamatório, algumas lâminas apresentaram apenas um campo avaliado devido às dificuldades técnicas, enquanto outras contaram com 5 campos, optou-se por iniciar o estudo dos resultados, avaliando o impacto de se analisar um ou cinco campos em cada lâmina no resultado final encontrado. Para tanto, aplicou-se teste de Fischer para medir a distribuição das notas atribuídas às lâminas com apenas um versus cinco campos avaliados. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,919$ ). Dessa maneira, pode-se inferir que a avaliação de apenas um campo em cada lâmina é equivalente à avaliação de cinco, pois esta última se mostra homogênea ao longo do estudo. Entretanto, vale informar que o tamanho de amostra foi considerado pequeno, o que reduz a confiança no poder do teste.

A seguir, encontram-se os resultados da avaliação do infiltrado inflamatório, edema e angiogênese nos animais eutanasiados aos dois e vinte e um dias, utilizando-se teste exato de Fisher. Nos apêndices 9.1 e 9.2 encontram-se as tabelas com os dados das avaliações das ratas eutanasiadas aos 2 e 21 dias, respectivamente.

#### 4.1- Análise das Variáveis do Processo Inflamatório

Ao se analisar a variável infiltrado inflamatório, observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, como está apresentado na Figura 12. Quando foi realizada a comparação exclusiva entre os veículos PVA e blenda de PVA/PVP, observou-se diferença significativa com maior intensidade no primeiro, independentemente do tempo de eutanásia ( $p= 0,0276$ ). Por outro lado, quando utilizamos o teste ANOVA para comparar o conjunto dos resultados obtidos aos 2 dias com aqueles obtidos aos 21 dias, observou-se que este último apresentou maior infiltrado inflamatório, embora isso tenha ocorrido apenas no subgrupo que utilizou a blenda de PVA/PVP como veículo ( $p= 0,0474$ ).

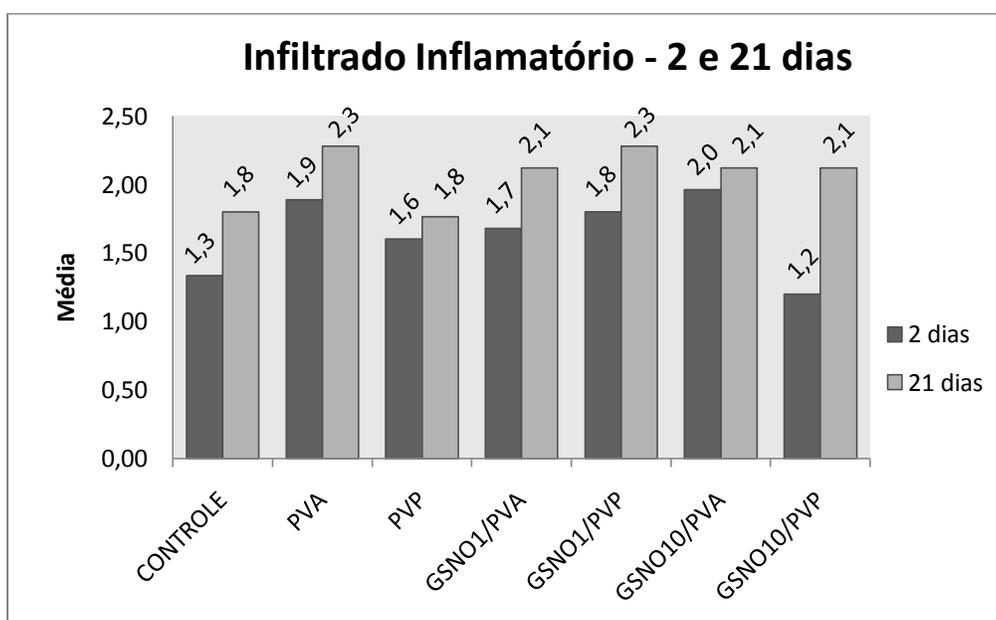


Figura 12: Média das notas atribuídas à infiltrado inflamatório aos 2 ( $p= 0,1022$ ) e 21 dias ( $p= 0,1141$ ).

Após avaliação da variável edema, observou-se que, aos 21 dias, houve diferença significativa entre os tipos de tratamento, embora nessa primeira abordagem estatística não fosse possível identificar, exatamente, qual tratamento havia sido responsável por isso (Figura 13). Quando foram comparados os tempos

de eutanásia, o edema aos dois dias mostrou-se maior do que aos 21 dias, alcançando diferença significativa para o subgrupo que utilizou o PVA como veículo ( $p= 0,0064$ ).

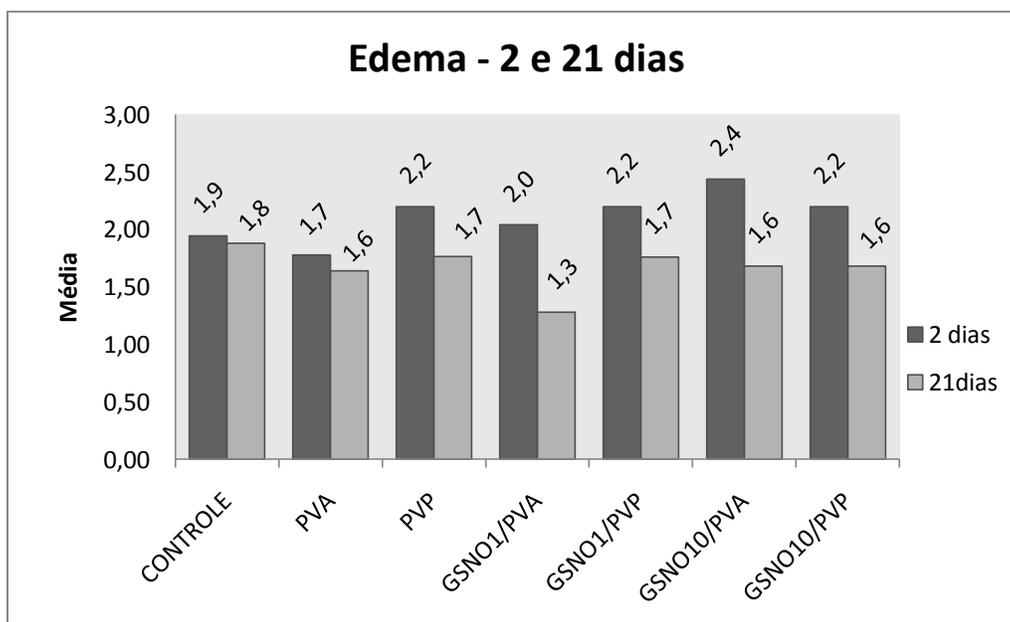


Figura 13: Média das notas atribuídas ao edema aos dois ( $p= 0, 7438$ ) e 21 dias ( $p= 0,0328$ )

A angiogênese também apresentou diferença significativa quando foram comparados os diversos tipos de tratamento nas ratas eutanasiadas aos 21 dias (Figura 14). No entanto, esse teste não foi capaz de localizar o tipo de tratamento responsável por essa diferença. Na comparação entre os tempos de eutanásia, não se demonstrou diferença significativa entre dois e 21 dias ( $p= 0,4647$ ).

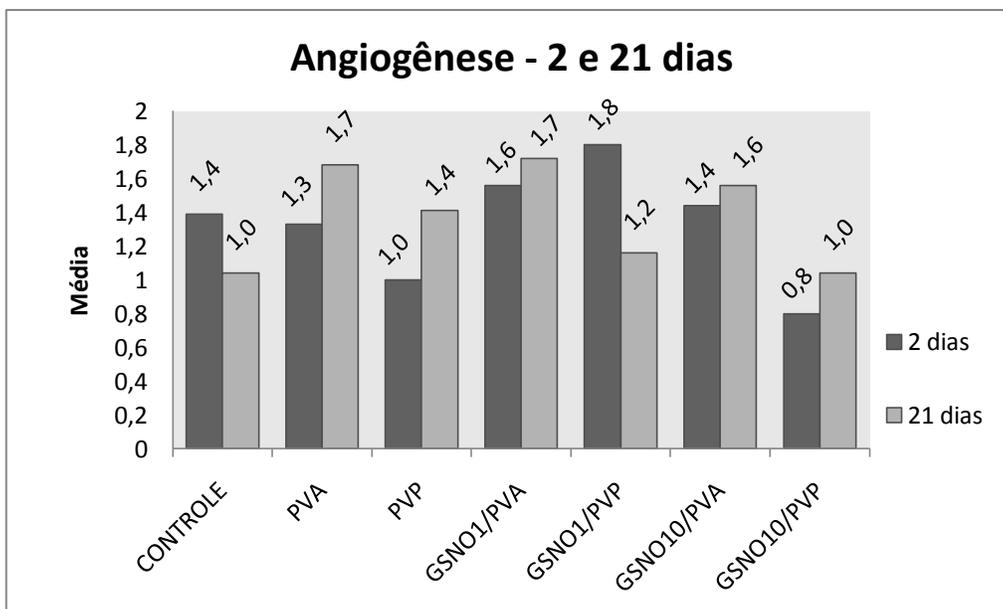


Figura 14: Média das notas atribuídas à angiogênese aos dois ( $p=0,3021$ ) e 21 dias ( $p=0,0292$ )

Em resumo, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos nas variáveis edema e angiogênese no grupo eutanasiado aos 21 dias. Além disso, houve maior infiltrado inflamatório e menor edema aos 21 dias quando comparado aos dois dias. Para detalhar qual a diferença encontrada entre os diversos tipos de tratamento, optou-se por dividir o nível de significância aceitado pelo número de testes que foram realizados. O nível de significância corrigido foi, portanto,  $0,05/6 = 0,0083$ , visto que foram realizados 6 testes para cada variável medida. Na tabela 3 é apresentado o resultado das comparações entre os tratamentos, considerando-se o nível de significância corrigido.

**Tabela 3: Comparações entre os tratamentos após 21 dias  
(nível de significância corrigido – p=0,0083)**

	<b>Angiogênese (p-valor)</b>	<b>Edema (p-valor)</b>	<b>Infiltrado Inflamatório (p-valor)</b>
<b>PVA</b>	<b>0.0027</b>	0.1532	0.0128
<b>PVP</b>	0.4856	0.0999	0.1762
<b>GSNO1/PVA</b>	<b>0.0031</b>	<b>0.0039</b>	0.1993
<b>GSNO1/PVP</b>	0.7932	0.8063	0.2291
<b>GSNO10/PVA</b>	0.0613	0.2647	0.1063
<b>GSNO10/PVP</b>	0.7060	0.0660	0.1993

Na tabela 3, observa-se que a variável infiltrado inflamatório não obteve nenhum p-valor inferior a 0.0083. Entretanto, as variáveis angiogênese e edema, obtiveram 2 p-valores inferiores ao nível de significância. Essas diferenças surgiram nas telas revestidas com GSNO 1 mM usando PVA como veículo e com o PVA puro (este apenas na variável angiogênese). Portanto, o uso do recobrimento de telas de polipropileno com PVA+GSNO 1mM demonstrou, após 21 dias do procedimento, menor edema e maior formação vascular em torno da tela. O PVA, isoladamente, também gerou maior angiogênese.

#### **4.2- Análise Estereológica da Densidade Volumétrica de Fibras Colágenas**

Foram analisados 288 campos, oriundos de quatro fragmentos implantados em cada uma das dez ratas eutanasiadas aos 21 dias. A coloração com Picosirius Red proporcionou adequada visibilização dos feixes de fibras colágenas formados ao redor do implante, como demonstrado anteriormente na Figura 11.

Quando foi analisada a Densidade Volumétrica (Vv) média das fibras colágena, observou-se que, novamente, os maiores valores são atribuídos aos fragmentos de PVA + GSNO1mM. No entanto, não houve diferença significativa. Outro detalhe que pode ser destacado é que o menor valor analisado está, exatamente, nos fragmentos sem recobrimento (controle), levando-nos a pensar que o recobrimento, seja devido à matriz polimérica, seja devido à GSNO, deve ter

exercido alguma influência no desenvolvimento de reação fibroblástica e formação de fibras colágenas (Figura 15). O apêndice 9.3 apresenta tabela com dados detalhados do estudo estereológico.

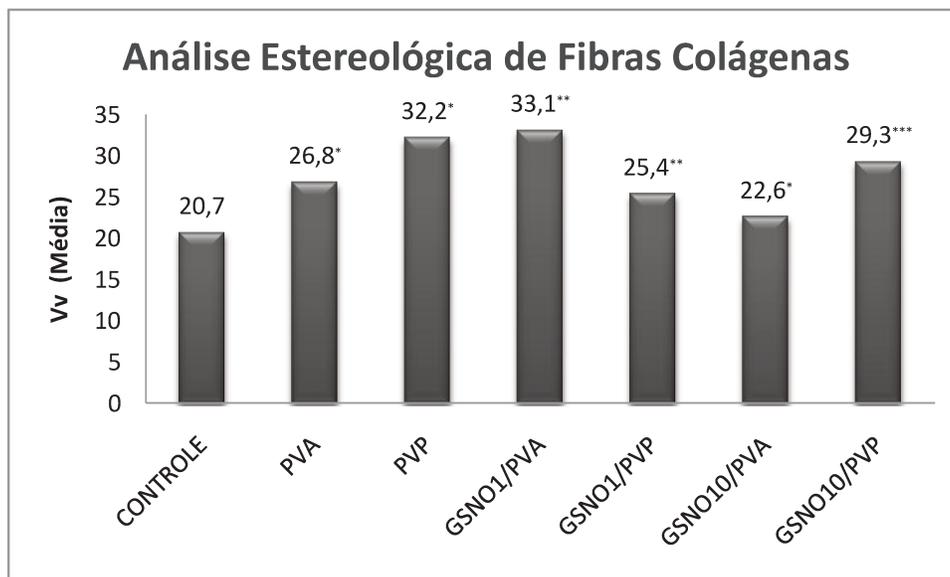


Figura 15: Média da Densidade Volumétrica (Vv) de Fibras Colágenas (21 dias)

\* p=0,25 / \*\* p= 0,34 / \*\*\* p= 0,40

## ***5. Discussão***

## **5.1- Considerações sobre biocompatibilidade e reparação tecidual**

Segundo Williams (2003), biocompatibilidade é a capacidade de um determinado implante realizar sua função com o grau desejado de incorporação ao hospedeiro, sem provocar efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis ao mesmo (118).

Consideraram-se, para o planejamento e execução dessa pesquisa, que o aumento da biocompatibilidade da tela de polipropileno seria alcançado quando, na interface tecidual, houvesse redução da intensidade do processo inflamatório agudo (infiltrado celular e edema) e aumento da angiogênese e da deposição de fibras colágenas.

A resposta a corpo estranho é uma cascata fisiológica, desencadeada pela adesão de proteínas ao implante e, conseqüentemente, recrutamento de células inflamatórias (119,120). Neutrófilos modulam a resposta do hospedeiro nos primeiros minutos ou horas, enquanto os macrófagos mantêm sua resposta durante dias. Essas células são capazes de fagocitar eficientemente bactérias e células mortas. No entanto, não conseguem digerir implantes macroscópicos. Dessa forma, observa-se um infiltrado inflamatório crônica, na qual a fusão dos macrófagos cria as células gigantes de corpo estranho (121).

As células gigantes de corpo estranho se mantêm permanentemente na interface do implante com o tecido hospedeiro e secretam citocinas que estimulam fibroblastos a depositar uma camada avascular densa de colágeno ao redor do implante, formando uma cápsula que, permanentemente, o isola em relação às adjacências (120).

As fases de reparação tecidual podem ser classificadas em: fase precoce ou de hemostasia e inflamação; fase intermediária, ou de proliferação; e fase final, na qual ocorre a maturação do colágeno (122). Na integração das telas sintéticas pode-se considerar a ocorrência de processo semelhante.

A reparação local após o implante de uma tela sintética se inicia com as plaquetas, que interrompem o sangramento e desencadeiam a resposta

imunológica. Nessa fase há liberação de histamina e de prostaglandinas, que aumentam a permeabilidade capilar e permitem a migração de células inflamatórias. Durante as primeiras vinte e quatro horas, observa-se o início da resposta inflamatória, com a presença dos neutrófilos, macrófagos e plasmócitos no local. Essas células têm a função de remover o tecido necrótico e impedir proliferação bacteriana no local. Simultaneamente, há produção de fatores de crescimento tecidual e fatores quimiotáticos para fibroblastos. A fase de proliferação se inicia 24 horas após o implante e caracteriza-se por granulação, angiogênese, epitelização (no caso das feridas em contato com o meio externo) e síntese de colágeno. No tecido de granulação, formam-se novos capilares, que fornecem os nutrientes locais. Nessa fase, inicia-se a formação da matriz colágena local, que servirá de suporte para o crescimento do tecido conjuntivo e será responsável, também, por sua força tênsil. Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese, deposição e remodelação dessa matriz. Na fase de maturação, há redução da concentração do colágeno por redução do estímulo de sua síntese. Nessa fase há substituição do colágeno tipo III pelo tipo I (50).

O tecido conjuntivo contém elementos fibrosos (colágeno e fibras elásticas) e a matriz viscoelástica de proteoglicanos. A relação das fibras com os componentes da matriz determina as propriedades físicas do tecido. Ulmsten e col. (1998) relataram a importância das fibras colágenas do tipo I e III na força e tensão dos tecidos do assoalho pélvico feminino (52).

Com base nessas informações, pode-se inferir que, para qualquer implante, a duração de cada etapa poderá variar em função de diversos fatores, tais como: as condições do sistema imune do hospedeiro; grau de contaminação bacteriana local; e biocompatibilidade do material implantado. Verificou-se, também, que a resolução completa da resposta inflamatória, representada pela reconstituição do tecido nativo, poderá, eventualmente, não ser possível, em virtude da manutenção de fatores de agressão relacionados às propriedades físico-químicas do material implantado. Dessa forma, o que é denominado

integração é o resultado final da interação entre o implante e o hospedeiro, o qual é, habitualmente, representado por graus variados de fibrose.

Para demonstrar a fase inicial da resposta inflamatória, com a presença do infiltrado inflamatório agudo e edema, e a fase tardia, com angiogênese e formação colágena, no presente estudo, optou-se pela eutanásia aos 2 e 21 dias.

A graduação da intensidade da resposta inflamatória corresponde a uma das dificuldades dos estudos anatomopatológicos. Hunt & Williams (1995) discutiram criticamente os métodos de quantificação da reação do hospedeiro a biomateriais (123). As avaliações qualitativas e semi-quantitativas devem ser reservadas a situações nas quais há dificuldades técnicas na quantificação de estruturas. Além disso, quando se trata de comparação entre diferentes materiais ou tratamentos, o erro inerente ao observador se repetirá ao longo do estudo. Outra possibilidade levantada pelos autores é o uso de técnica de processamento e análise de imagens, com objetivo de tornar mais ágil e rigorosa a quantificação proposta. No entanto, Hunt & Williams lembram que o manuseio de imagens não substitui a técnica adequada de preparo e obtenção da amostra e captação de imagens. Além disso, muitos erros relacionados à automação do processo de análise podem existir e não serem identificados. Portanto, para avaliação da incorporação das telas em tecidos biológicos, vários autores têm utilizado avaliação da infiltrado inflamatório ao redor da tela e aferição da angiogênese e da formação colágena no sítio do implante (124, 125, 126, 127, 42).

Riccetto et al (2008) compararam quatro tipos de telas usadas na correção de incontinência urinária (TVT<sup>®</sup>, SPARC<sup>®</sup>, IVS<sup>®</sup> e *Sling Plus*<sup>®</sup>) e, para tanto, implantou fragmentos de telas no subcutâneos de ratas e avaliou o infiltrado inflamatório de maneira semi-quantitativa e a formação colágena com método estereológico (42). Thiel et al. (2005) utilizaram modelo semelhante para estudar as reações do hospedeiro após implantes subcutâneos de fragmentos de polipropileno monofilamentar, matriz colágena preparada com submucosa intestinal suína, silicone e prótese de copolímero policaprolactona e ácido polilático (129). Yildirim et al. (2005), também se utilizando de metodologia similar,

estudaram aspectos histológicos da integração de telas sintéticas e da fásia lata cadavérica implantadas no abdome de coelhas (70). Almeida et al (2007) compararam TVT<sup>®</sup>, Marlex<sup>®</sup> e SIS<sup>®</sup>, e, para tanto, implantaram fragmentos próximos ao colo vesical de ratas ooforectomizadas. Nesse último estudo, as análises da infiltração inflamatória e da deposição colágena foram semi-quantitativas, categorizando os achados em quatro grupos (<25%, 25-50%, 50-75% e > 75%) (87). Nessas pesquisas não foram descritas limitações da análise proposta, decorrentes do modelo experimental empregado. No presente estudo, também se fez a opção pela análise semi-quantitativa das variáveis da reação inflamatória e avaliação quantitativa (estereologia) da deposição colágena.

A observação e quantificação da resposta inflamatória e quantitativa da formação fibroblástica mostraram-se adequadamente realizáveis por um mesmo pesquisador, utilizando técnica padronizada e sem identificação da origem do fragmento analisado. As maiores dificuldades surgiram durante a seleção dos campos que seriam analisados pelo pesquisador. Para tanto, alguns cuidados foram importantes: avaliação em campos de menor aumento para seleção de regiões mais favoráveis quanto à clareza de identificação de estruturas e seleção de campos longitudinalmente no corte a partir de um campo central de melhor qualidade.

## **5.2- Considerações sobre o modelo experimental**

Considerou-se que a ausência ou pequena quantidade de tecido adiposo e o contato direto entre o tecido epitelial da pele e a fásia da musculatura abdominal, tornariam a parede abdominal da rata particularmente vantajosa para o estudo proposto, pois o futuro uso clínico dos materiais testados terão como objetivo a interposição entre um tecido de natureza epitelial (mucosa vaginal) e outro de natureza conjuntiva, representado pela fásia pubocervical ou retovaginal.

Modelo experimental semelhante ao que foi proposto pelo presente estudo tem sido empregado para avaliar a integração de enxertos e próteses. A opção

pelo implante das próteses em subcutâneo de ratas é comumente observada na literatura (125, 126, 127, 128).

Além disso, modelos que reproduzem a vagina humana são pouco acessíveis. Riccetto et al. (2003) propuseram um modelo para treinamento da técnica de *sling* em ovelhas da raça Santa Inês. Por intermédio de um questionário aplicado a urologistas e ginecologistas, observaram boa correlação de vários aspectos da anatomia vaginal, uretral e dos parâmetros endoscópicos vesicais daquele modelo em relação à anatomia feminina (129). Entretanto, a infraestrutura necessária para manutenção de animais de grande porte, por tempo prolongado, limita o emprego desse modelo em estudos semelhantes ao presente.

Dessa maneira, o uso de ratas mostrou-se bastante adequado para o estudo proposto. Isso pode ser dito, pois o manuseio e cuidado desses animais são mais simples e já são comumente realizados pelos profissionais do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da UNICAMP. Toda condição de bioterismo do NMCE privilegia o uso desses animais, já que o acondicionamento em gaiolas, a temperatura do ambiente, as dietas e, até os cuidados veterinários eventualmente necessários, são voltados para o cuidado de ratos. Além disso, o uso de fêmeas se faz necessário, visto que as mesmas dispõem de maior área abdominal para realização dos implantes devido à anatomia do aparelho urogenital.

### **5.3- Considerações sobre óxido nítrico e reação tecidual**

O NO é uma das moléculas mais versáteis nos tecidos dos mamíferos e as suas possibilidades terapêuticas são muitas. Entretanto, para o pleno domínio dessas potencialidades, análises mais refinadas de suas ações biológicas ainda são necessárias (130, 131, 132).

Recentemente, polímeros que liberam NO lentamente se mostraram úteis como recobrimentos de biosensores, a fim de torná-los mais biocompatíveis (133).

Esses polímeros também reduziram a adesão de plaquetas e bactérias aos sensores testados (124,134). Além disso, em outros estudos esta molécula foi capaz de promover angiogênese, reduzir a resposta celular inflamatória e acelerar a reepitelização (135, 136, 137). O NO também parece ter papel na deposição colágena, variando seu efeito biológico de acordo com suas concentrações teciduais (138). Já é sabido que as sínteses do colágeno e do óxido nítrico compartilham o mesmo aminoácido como substrato, a L- arginina (139). Dessa maneira, a inibição da enzima NO sintetase induzível (iNOS), comprovadamente, aumenta a deposição de colágeno (140, 141). A partir desse conhecimento, pode-se propor que, se a função da iNOS for variável com a dose do NO exógeno, conseqüentemente, pode-se observar maior ou menor deposição colágena na área testada.

A influência positiva do NO sobre o processo de reparo tecidual já foi sugerida, entretanto, dúvidas sobre sua real influência ainda persistem, sobretudo devido ao aspecto da grande variedade de ações e inter-relações do NO com células e outros sinalizadores químicos, tais como as metaloproteinases (137, 142, 143, 144).

No presente estudo, quando se analisou ratas eutanasiadas aos 2 dias, não foi observada diferença significativa entre os tipos de recobrimento em nenhuma das variáveis pesquisadas. Uma hipótese para justificar esse resultado é que, como houve equivalência entre a avaliação de cinco ou apenas um campo em cada lâmina, o número total de notas para cada tratamento é igual ao número de ratas operadas e não cinco vezes maior como, inicialmente, era esperado.

Estudo com desenho semelhante também não foi capaz de identificar diferença no infiltrado inflamatório ao redor de fragmentos com ou sem recobrimento de doadores de NO em fase precoce do processo (menos que uma semana) (97). Outra possível justificativa para esse fenômeno é que o infiltrado inflamatório precoce represente, na verdade, a resposta ao trauma cirúrgico e não ao implante propriamente dito (145).

Por outro lado, quando se analisam as lâminas obtidas a partir das ratas eutanasiadas após 21 dias do procedimento cirúrgico, observa-se que telas de polipropileno recobertas pelo GSNO, na concentração de 1mM associado ao PVA como veículo, apresentou menor edema tecidual e maior angiogênese quando comparado aos demais tratamentos. Esse achado indica que o óxido nítrico pode ter um papel de modulação nesse processo cicatricial e, conseqüentemente, a melhor compreensão dos seus efeitos biológicos poderá proporcionar o desenvolvimento de materiais para uso clínico no futuro.

Embora a liberação da GSNO ocorra em alguns minutos após o implante, seu efeito pode ser notado vários dias após o procedimento. Isso pode se dever ao fato que o NO seja responsável pela inibição de citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina 6 (IL-6) e Proteína quimiotáxica de macrófago (93). Dessa maneira, o NO seria responsável por inativar alguns disparadores do processo inflamatório, ainda no seu início. Além disso, o NO parece ser capaz de estimular a proteína sintetase de NO induzível (iNOS), expressa em neutrófilos, através da mediação da Interleucina 8 (IL-8), o que perpetuaria a produção da molécula nos tecidos envolvidos (92). Chu e Prasad (1999) sugeriram, ainda, que o mecanismo de ação do NO está relacionado com modulação de outras citocinas, sobretudo o Fator de Crescimento Tumoral Beta (TGF- $\beta$ ) (146). Essa modulação é dose-dependente e pode influenciar a angiogênese, a resposta celular inflamatória e deposição de colágeno (97).

No presente estudo também se identificou maior angiogênese entre os fragmentos recobertos apenas com PVA. Uma possível explicação para esse fato seria as alterações de superfícies provocadas pelo recobrimento como foi apresentado na figura 2. Wu et al (2008), em artigo de revisão sobre o assunto, confirmam a importância das características da superfície do implante em todos os aspectos relacionados à sua biocompatibilidade (89).

Outro dado importante foi a identificação de maior infiltrado inflamatório e menor edema nas ratas eutanasiadas aos 21 dias quando comparadas àquelas de 2 dias. Uma possibilidade para explicar esse achado é que, durante a avaliação,

não houve uma diferenciação entre o tipo de infiltrado inflamatório que estava sendo avaliada. Dessa forma, enquanto na avaliação de dois dias, observava-se maior infiltrado linfoplasmocitário, rico em neutrófilos, macrófagos e plasmócitos, na avaliação tardia, via-se a presença de células gigantes e histiócitos em grande quantidade, caracterizando uma reação biológica ao corpo estranho e corroborando os achados descritos na literatura quanto ao tipo celular encontrado em cada fase (126,127).

Por outro lado, cabe destacar que, em comparação específica das matrizes poliméricas, o PVA demonstrou maior infiltrado inflamatório que a blenda PVA/PVP nos dois tempos de eutanásia. Soma-se a isso, que o achado de maior infiltrado inflamatório aos 21 dias em comparação com 2 dias deu-se apenas no grupo com blenda PVA/PVP como matriz polimérica. Dessa forma, pode-se sugerir que o PVA aumentou a reação inflamatória do hospedeiro e “uniformizou” as notas atribuídas aos dois e vinte e um dias. Ainda corroborando com essa sugestão, os achados de maior edema aos dois dias em relação a vinte e um dias ocorreram no grupo que usou matriz polimérica PVA, apontando para uma resposta inflamatória global mais acentuada com essa matriz.

Apesar desses achados com o PVA, a sua combinação com GSNO 1mM foi capaz de reduzir o edema ao redor do implante, quando comparado aos outros recobrimentos. Assim, reforça-se a expectativa que a GSNO tenha papel na modulação das variáveis da reação inflamatória.

Por outro lado, a ausência de diferença entre os achados obtidos com o emprego da concentração de 10 mM de GSNO, em relação ao controle, sugere que o melhor efeito biológico ocorre em torno de uma determinada concentração, a qual, se extrapolada, levaria a efeitos indesejáveis, resultantes do excesso de óxido nítrico. Essa concentração ideal ainda deve ser estabelecida em outros estudos.

#### **5.4- Considerações sobre estereologia e deposição colágena**

A Estereologia é uma ciência que tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas, a partir de cortes bidimensionais. A maior parte dos estudos estereológicos obtém dados diretamente da microscopia óptica ou da microscopia eletrônica. De forma contrária às técnicas morfométricas, nas quais as estruturas anatômicas são medidas com escalas métricas conhecidas, o método estereológico baseia-se em princípios geométricos e estatísticos (147, 148).

Assim, nos estudos estereológicos nem sempre se busca determinar as dimensões das estruturas em unidades absolutas, mas sim as dimensões relativas ao todo que está sendo analisado. Dessa forma, no presente estudo, buscou-se determinar a concentração relativa de feixes de fibras colágenas em torno do enxerto, em padrões percentuais, o que se denominou densidade volumétrica de fibras colágenas. Outra vantagem dessa forma de análise foi eliminar eventuais influências da técnica anatomopatológica, pois independente do tamanho do fragmento analisado, a densidade volumétrica apresentaria menor variabilidade que medidas absolutas.

Para a eficácia do método estereológico, o preparo das lâminas deve oferecer ao pesquisador a melhor coloração para a estrutura em estudo, a fim de que esta possa ser plenamente reconhecida. No presente estudo, utilizou-se o Picrosirius Red para coloração das fibras colágenas. Essa escolha foi motivada pela ótima exposição das fibras colágenas por meio dessa coloração e pelo emprego bem-sucedido do mesmo corante em estudos prévios, com metodologia semelhante (42, 51; 128).

No que se refere ao tipo de corte, optou-se por realizar cortes lineares e utilizar o sistema-teste de arcos ciclóides. Dessa maneira, os fragmentos também poderiam ser usados para avaliação histológica por meio da hematoxilina e eosina.

Outra questão importante quando se opta pelo método estereológico é considerar o efeito da compressão e encolhimento durante o processamento da amostra até a confecção das lâminas histológicas(115). Existem fórmulas matemáticas usadas para contrabalançar esses efeitos e demonstrar o verdadeiro valor absoluto da variável observada. No entanto, como nessa pesquisa foi utilizado apenas comparação de valores entre fragmentos, o efeito do processamento acometeu igualmente toda a amostra e pôde ser desconsiderada.

No presente estudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto densidade volumétrica de fibras colágenas após 21 dias do procedimento, embora os maiores valores absolutos tenham sido encontrados justamente no grupo de fragmentos PVA + GSNO 1 mM e os menores nos fragmentos de controle.

Quando se analisa o cálculo do número de campos necessários descrito no item Materiais e Métodos, observa-se que, embora a média de campos avaliados por animal tenha sido de 23,8, cada animal possuía 4 fragmentos de tela. Dessa forma, a média de campos analisados por fragmento foi de 5,95, enquanto o preconizado pela equação de erro padrão relativo foi, aproximadamente, 10 campos. Considera-se, assim, que o aumento no tamanho da amostra e, eventualmente, mudanças nas concentrações da substância doadora de S-Nitrosoglutathione poderiam resultar em achados diferentes dos apresentados, quanto à integração tecidual das telas com esse recobrimento.

### **5.5- Outras considerações**

O estudo apresentado acima demonstra indícios que o recobrimento de telas de polipropileno com substâncias doadoras de óxido nítrico poderá modular o processo de integração das mesmas ao organismo hospedeiro. Ao se utilizar de método semi-quantitativo para avaliação da reação inflamatória foi possível observar diferenças significativas quando se utilizou recobrimentos à tela, se comparada às telas sem recobrimento. No entanto, cumpre observar que algumas

dessas alterações também podem ser atribuídas à matriz polimérica, sobretudo o Poli (álcool vinílico). Dessa maneira, futuras modificações nas concentrações do GSNO ou alterações nas substâncias-veículo poderão melhorar a compreensão acerca do real efeito da molécula de NO, exogenamente administrada, no processo de reação tecidual ao corpo estranho.

Além disso, futuramente, pode se propor o refinamento dos métodos de avaliação, através da caracterização e quantificação de células inflamatórias específicas, com o apoio de programas de processamento e análise de imagens histológicas. Pode-se planejar também o uso da microscopia de polarização a fim de alcançar melhor determinação das fibras colágenas, quanto ao seu número e seu tipo. Outra proposta válida seria apurar a quantificação dos vasos, utilizando-se de técnicas imunohistoquímicas, que permitam a individualização das células endoteliais recém-formadas.

No campo da biologia molecular, o estudo dos efeitos biológicos do NO aguarda pesquisas que definam melhor quais citocinas e outros mediadores celulares estão envolvidos nesse processo.

Os efeitos tardios da administração de NO exógena, mesmo considerando que sua liberação tecidual ocorre em minutos, ainda carecem de melhor explicação científica. Ainda nessa linha de raciocínio, Riccio et al (2009) testaram *in vitro* gel incorporado com S-nitrosotióis, que tem a propriedade de lenta liberação da molécula (102). Os efeitos biológicos dessa composição ainda não foram testados.

## ***6. Conclusões***

O recobrimento com PVA e PVA contendo GSNO modifica a reação tecidual às telas de PP monofilamentar implantadas no subcutâneo de ratas adultas, das seguintes formas:

- a- O recobrimento com PVA contendo GSNO na concentração de 1 mM resulta, após 21 dias, em redução do edema na superfície do implante,.
- b- O recobrimento com PVA isolado ou contendo GSNO na concentração de 1 mM associa-se, após 21 dias, com angiogênese significativa.
- c- Não há diferenças significativas da deposição colágena ao se recobrir as telas de PP monofilamentar com polímeros eluidores de GSNO.

## ***7. Referências Bibliográficas***

- 1- Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2002; 21:167-78.
- 2- Ahmadi B, Alimohammadian M, Golestan B, Mahjubi B, Janani L, Mirzaei R. The hidden epidemic of urinary incontinence in women: a population-based study with emphasis on preventive strategies. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
- 3- Melville JL, Katon W, Delaney K, Newton K. Urinary incontinence in US women a population-based study. *Arch Intern Med*. 2005; 165:537–42.
- 4- 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. p.661-79.
- 5- Fritel X, Varnoux N, Zins M, Breart G, Ringa V. Symptomatic pelvic organ prolapse at midlife, quality of life, and risk factors. *Obstet Gynecol*. 2009;113(3):609-16.
- 6- 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.
- 7- 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: 2038-49.

- 8- Sampaio F, Riccetto CLZ. Anatomia Cirúrgica da Pelve Feminina. In: Palma P, Neto Júnior NR. Uroginecologia Ilustrada. 1.ed. São Paulo: Roca Ltda; 2005. p.3-10.
- 9- Petros P, Riccetto CLZ. Aplicações Clínicas da Teoria Integral da Continência. In: Palma P, Neto Júnior NR. Uroginecologia Ilustrada. 1.<sup>ed</sup>. São Paulo: Roca Ltda; 2005. p.11-20.
- 10- Goldman L, Ausiello D, et al. Incontinência urinária. In: Cecil Textbook of Medicine. 22.ed. Elsevier; 2004. p.127-28.
- 11- Birch C, Fynes M. The role of synthetic and biological prostheses in reconstructive pelvic floor surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002; 14:527–35.
- 12- 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; 27:3–12.
- 13- 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: 544-51.
- 14- Whiteside JL, Weber AM, Meyn LA, Walters MD. Risk factors for prolapse recurrence after vaginal repair. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1533–38.
- 15- Borrell Palanca A, Chicote Perez F, Queipo Zaragoza JA, Beltran Meseguer JF, Esteve Claramunt J, Pastor Sempere F. Cystocele repair with a polypropylene mesh;our experience. *Arch Esp. Urol*. 2004; 57:391-96.

16- Shek KL, Dietz HP, Rane A, Balakrishnan S. Transobturator mesh for cystocele repair: a short- to medium-term follow-up using 3D/4D ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 32: 82–86

17- Kapoor DS, Nemcova M, Pantazis K, Brockman P, Bombieri L, Freeman RM. Reoperation rate for traditional anterior vaginal repair: analysis of 207 cases with a median 4-year follow-up. *Int Urogynecol J*. 2010; 21:27–31.

18- Lunardelli JL, Auge AP, Lemos NL, Carramão Sda S, de Oliveira AL, Duarte E, et al. Polypropylene mesh vs. site-specific repair in the treatment of anterior vaginal wall prolapse: preliminary results of a randomized clinical trial. *Rev Col Bras Cir*. 2009; 36(3):210-6.

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: 83-8.

20- Kahn MA, Stanton SL. Posterior colporrhaphy: its effects on bowel and sexual function. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104(1): 82-6.

21- Maher CF, Murray CJ, Carey MP, Dwyer PL, Ugoni AM. Iliococcygeus or sacrospinous fixation for vaginal vault prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 98: 40-4.

22- 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.

- 23- Sand PK, Koduri S, Lobel RW, Winkler HA, Tomezsko J, Culligan PJ, Goldberg R. Prospective randomized trial of polyglactin 910 mesh to prevent recurrence of cystoceles and rectoceles. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:1357–64.
- 24- de Tayrac R, Gervaise A, Chauveaud A, Fernandez H. Tension-free polypropylene mesh for vaginal repair of anterior vaginal wall prolapse. *J Reprod Med* 2005, 50:75–80.
- 25- de Tayrac R, Picone O, Chauveaud-Lambling A, Fernández H. A two-year anatomical and functional assessment of transvaginal rectocele repair using a polypropylene mesh; *J Urogynecol.* 2005, 17:100-105.
- 26- Murphy M, for the Society of Gynecologic Surgeons Systematic Review Group. Clinical practice guidelines on vaginal graft from the Society of Gynecologic Surgeons. *Obstet Gynecol.* 2008;112:1123–30.
- 27- Maher C; Baessler K. Surgical management of anterior vaginal wall prolapse: an evidencebased literature review. *J Urogynecol* 2006; 17: 195-201.
- 28- Ballanger P. Surgery for genitourinary prolapses:prosthesis or no prosthesis? *Ann Urol* 2005; 5: 132-36.
- 29- Cody J, Stearns S, Wyness L, McCormack K, Wallace S,et al. Systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of tension-free vaginal tape for treatment of urinary stress incontinence. *Health Technology Assessment.* 2003; 7(21):iii, 1-189.
- 30- Julian TM. The efficacy of Marlex mesh in the repair of severe, recurrent vaginal prolapse of the anterior midvaginal wall. *Am J Obstet Gynecol* 1996,175:1472–75.

- 31- Lapitan MC, Cody JD, Grant A. Open retropubic colposuspension for urinary incontinence in women: a short version Cochrane review. *Neurourol Urodyn*. 2009; 28(6):472-80.
- 32- Giordano D. Twentieth Congress Franc de Chir, 1907, Paris. *Anais Paris*, 1907, p.506.
- 33- Aldrige AH. Transplantation of fascia for the relief of urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 1942; 44:398-411.
- 34- Mcguire EJ, Lytton B. Pubovaginal *sling* procedure for stress incontinence. *J Urol*. 1978;119(1):82-4.
- 35- Petros P, Ulmsten U. An Integral Theory of female urinary incontinence. *Acta Obstet et Gynecol Scand* 1990; 69(suppl 153):7-31.
- 36- Ulmsten U, Petros P. Intravaginal *sling*plasty (IVS): an ambulatory surgical procedure for treatment of female urinary incontinence. *Scand J Urol Nephrol* 1995; 29(1):75-82.
- 37- Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varghos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1996; 7(2):81-6.
- 38- Delorme E. La bandelette trans-obturatrice: un procédé mini-invasif pour traiter l'incontinence urinaire d'effort de la femme. *Prog Urol* 2001; 11(6):1306-13.
- 39- Bezerra CA, Bruschini H, Cody DJ. Traditional suburethral *sling* operations for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 20(3):CD001754.

40- Appell RA, Dmochowski RR, Gormley EA, Karram MM, Lightner DJ, Staskin DR et al. Female Stress Urinary Incontinence Guideline Update. 2009. Panel and Consultants (2009). American Urological Association. 2009, cap. 1, 45p.

41- Boulanger L, Boukerrou M, Rubod C, Fruchart A, Courol RJ, Devos P, et al. Development of an animal model to study meshes used in genital prolapsed surgery. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2008; 136: 254-59.

42- Riccetto CLZ, Miyaoka R, Fraga R, Barbosa R, Dambros M, Teixeira A, Palma PCR. Impact of the structure of polypropylene meshes in local tissue reaction: in vivo stereological study. Int Urogynecol J 2008; 19:1117–23.

43- Morgan JE. A *sling* operation, using Marlex polypropylene mesh, for treatment of recurrent stress urinary incontinence. Am J Obstet Gynecol 1970; 106:369-77.

44- Morgan JE, Farrow GA, Stewart FE. The Marlex *sling* operation for the treatment of recurrent stress urinary incontinence: a 16-year review. Am J Obstet Gynecol. 1985 15;151(2):224-6.

45- Drutz HP, Buckspan M, Flax S, Mackie L. Clinical and urodynamic reevaluation of combined abdominovaginal Marlex *sling* operations for recurrent stress urinary incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1990; 1:70-3.

46- Palma PCR, Ikari O, D'ancona CAL, Netto NRJr. Alça pubovaginal sintética no tratamento da incontinência urinária de esforço. J Bras Urol 1992; 18(4): 202-4.

47- Ulmsten U, Falconer C, Johnson P, Jomaa M, Lanner L, Nilsson CG, Olsson I. A multicenter study of tension-free vaginal tape (TVT) for surgical treatment of stress urinary incontinence. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 1998; 9(4):210-13.

48- Delancey J. Anatomy and physiology of urinary continence. Clin Obst Gynec 1990; 33:298-302.

49- Petros P. The intravaginal *sling*plasty operation, a minimally invasive technique for cure of urinary incontinence in the female. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1996; 36: 453-61.

50- Petros P. Medium-term follow-up of the intravaginal *sling*plasty operation indicates minimal deterioration of urinary continence with time. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1999; 39:354-7.

51- Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. Hernia 1997; 1:15–21.

52- Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral *sling* materials. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2005; 6: 56-9.

53- Palma PCR, Riccetto CLZ, Dambros M, Thiel M, Fraga R, Netto NRJr: Safyre: a readjustable minimally invasive *sling* for female urinary stress incontinence. Int Braz J Urol 2003; 29(4):353-9.

54- European Markets for Urological Devices apud Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral *sling* materials. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2005; 6: 56-9.

55- Ganj FA, Ibeanu OA, Bedestani A, Nolan TE, Chesson RR. Complications of transvaginal monofilament polypropylene mesh in pelvic organ prolapse repair. Int Urogynecol J. 2009; 20:919–25.

56- Gauruder-Burmester A, Koutouzidou P, Rohne J, Gronewold M, Tunn R. Follow-up after polypropylene mesh repair of anterior and posterior compartments in patients with recurrent prolapse. *Int Urogynecol J*. 2007; 18:1059–64.

57- Moore RD, Miklos JR. Vaginal mesh kits for pelvic organ prolapse, friend or foe: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal*. 2009; 1(9):163-89.

58-Sivaslioglu AA, Unlubilgin E, Dolen I. A randomized comparison of polypropylene mesh surgery with site-specific surgery in the treatment of cystocele. *Int Urogynecol J*. 2008; 19:467–71.

59- Baessler K, Hewson A, Tunn R, Quatawneh A, Maher C. Intravaginal *Sling* distress. *Neurol Urodyn* 2003; 22:408.

60- Glavind K, Sander P. Erosion, defective healing and extrusion after tension-free urethropexy for the treatment of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2004; 15:179-83.

61- Siegel AL, Kim M, Goldstein M, Levey S, Ilbeigi P. High incidence of vaginal mesh extrusion using the intravaginal *Slingplasty Sling*. *J Urol* 2005; 174(4, part 1 of 2):1308-11.

62- Karram MM, Segal JL, Vassallo BJ, Kleeman SD. Complications and untoward effects of the tension-free vaginal tape procedure. *Obstet Gynecol* 2003; 101(5 Pt 1):929-32.

63- Rodriguez LV, Raz S. Prospective analysis of patients treated with a distal urethral polypropylene *sling* for symptoms of stress urinary incontinence: Surgical

outcome and satisfaction determined by patient driven questionnaires. J Urol 2003; 170:857-63.

64- Kobashi KC, Govier FE. Management of vaginal erosion of polypropylene mesh *slings*. J Urol 2003; 169:2242-3.

65- Levin I, Groutz A, Gold R, Pazner D, Lessing JB, Gordon D. Surgical complications and medium-term outcome results of tension-free vaginal tape: a prospective study of 313 consecutive patients. Neurourol Urodyn 2004; 23:7-9.

66- Tsivian A, Kessler O, Mogutin B, Rosenthal J, Korczak D, Levin S, Sidi AA. Tape related complications of the tension-free vaginal tape procedure. J Urol 2004; 171:762-4.

67- Palma PCR, Dambros M, Riccetto CLZ, Thiel M, Netto NRJr. The Ibero-American experience with a re-adjustable minimally invasive *sling*. BJU Int 2005; 95(3):341-5.

68- Cosson M. Risk of infection and prostheses: time out or a red flag? J Gynecol Obstet Biol Reprod 2004, 33:559–60.

69- Versi E, Harvey MA, Cardozo L, Brincat M, Studd JW. Urogenital prolapse and atrophy at menopause: a prevalence study. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2001; 12:107–10.

70- 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, 174:2037–40.

71- 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; 51:1364-75.

72- Achtari C, Hiscock R, O'Reilly BA, Schierlitz L, Dwyer PL. Risk factors for mesh erosion after transvaginal surgery using polypropylene (Atrium) or composite polypropylene/polyglactin 910 (Vypro II) mesh. *Int Urogynecol J*. 2005;16:389–94.

73- Visco AG, Weidner AC, Barber MD, Myers ER, Cundiff GW, Bump RC, Addison WA. Vaginal mesh erosion after abdominal sacral colpopexy. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184:297–302.

74- Deffieux X, de Tayrac R, Huel C. Vaginal mesh erosion after transvaginal cystocele repair using Gynemesh or Gynemesh-Soft in 138 women:a comparative study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysnfunct*. 2007;18:73–9.

75- Chin YK, Stanton SL. A follow-up of silastic *sling* for genuine stress incontinence. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102:143-7.

76- Fianu S, Soderberg G. Absorbable polyglactin mesh for retropubic *sling* operations in female urinary stress incontinence. *Gynecol Obstet Invest* 1983; 16(1):45-50.

77- Horbach NS, Blanco JS, Ostergard DR. A suburethral *sling* procedure with polytetrafluoroethylene for the treatment of genuine stress incontinence in patients with low urethral closure pressure. *Obstet Gynecol* 1988; 71:648-52.

78- Korda A, Peat B, Hunter P. Silastic *slings* for female incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1990; 1:66-9.

79- Sener S, Imperato JP, Blum MD, Ignatoff JM, Soper TG, Winchester DP, Meiselman M. Technique and complications of reconstruction of the pelvic floor with polyglactin mesh. *Surg Gynecol Obstet* 1989;168(6):475-80.

80- Weinberger MW, Ostergard DR. Long-term clinical and urodynamic evaluation of the polytetrafluoroethylene suburethral *sling* for treatment of genuine stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 1995; 86:92-6.

81- Govier FE, Kobashi KC, Kuznetsov DD, Comiter C, Jones P, Dakil SE, James R Jr. Complications of transvaginal silicone-coated polyester synthetic mesh *sling*. *Urology*. 2005;66:741–45.

82- Govier FE, Kobashi KC, Kozlowski PM, Kuznetsov DD, Begley SJ, McGonigle KF, Muntz HG. High complication rate identified in sacrocolpopexy patients attributed to silicone mesh. *Urology*.2005;65:1099–03.

83- Robles J, Rioja J, Saiz A, Brugarolas X, Posell D, Zudaire LL et al. Anterior compartment prolapse repair with a hybrid biosynthetic mesh implant technique. *Int Urogynecol J*. 2007; 18:1191–96.

84- Ignarro, L.J. *Nitric Oxide, Biology and Pathobiology*; Academic Press: San Diego, CA, (2000).

85- Hyduke DR, Liao JC. Analysis of nitric oxide donor effectiveness in resistance vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:2390-9.

86- Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: An update. *Nitric Oxide* 2006: 15(4):265-79.

87- Almeida SHM, Rodrigues MAF, Gregório E, Crespício J, Moreira HA. Influence of *sling* material on inflammation and collagen deposit in an animal model. Intern. J Urol. 2007; 14:1040–43.

88- Belik J., Nadine H., Pan J., Behrends S. Soluble guanylate cyclase-dependent relaxation is reduced in the adult rat bronchial smooth muscle. Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2007; 292:699-703.

89- Wu Y, Meyerhoff ME. Nitric Oxide-Releasing/Generating Polymers for the Development of Implantable Chemical Sensors with Enhanced Biocompatibility . *Talanta*. 2008 15; 75(3): 642–50.

90- Moncada S, Radomski MW, Palmer RMJ. Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol* 1988; 37:2495–501.

91- Lipton SA, Choi YB, Pan AH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626–32.

92- Aslan M, Freeman BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res*. 2002;26:107–18.

93- Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. Nitric oxide and wound repair: Role of cytokines? *Nitric Oxide* 2002;7:1–10.

94- Chu SJ, Li MH, Hsu CW, Tsai SH, Lin SH, Huang KL. Influence of hyperbaric oxygen on tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide production in endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007;20(6):684-90.

- 95- Engelsman AF, Krom BP, Busscher HJ, van Damb GM, Ploeg RJ, van der Mei HC. Antimicrobial effects of an NO-releasing poly(ethylene vinylacetate) coating on soft-tissue implants in vitro and in a murine model. *Acta Biomaterialia* 2009; 5:1905–10.
- 96- Gifford R, Batchelor MM, Lee Y, Gokulrangan G, Meyerhoff ME, Wilson GS. Mediation of in vivo glucose sensor inflammatory response via nitric oxide release. *J Biomed Mater Res* 2005;75 A:755–66.
- 97- Hetrick EM, Prichard HL, Klitzman B, Schoenfisch MH. Reduced foreign body response at nitric oxide-releasing subcutaneous implants. *Biomaterials*. 2007; 28(31): 4571–80.
- 98- Seabra AB, Pankotai E, Feher M, Somlai A, Kiss L, Biro L, et al. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Dermatol*. 2007; 156: 814-18.
- 99- Zhang Y and Hogg N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport, *Free Rad. Biol Med*, 2005; 38: 831-38.
- 100- Krieger MH, Santos KFR, Shishido SM, Oliveira MG , Franchini KG, Spadari-Bratfish RC, et al. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*; 2006,14: 12-20 .
- 101- Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JBC, Oliveira MG, et al. S-nitrosation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1 and protein kinase B/Akt a novel mechanism of insulin resistance; *Diabetes* 2005, 54: 959-67.

- 102- Riccio DA, Dobmeier KP, Hetrick EM, Privett BJ, Paul HS, Schoenfisch MH. Nitric oxide-releasing S-nitrosothiol-modified xerogels. *Biomaterials* 2009; 30:4494–4502.
- 103- Seabra AB, Fitzpatrick A, Paul J, De Oliveira MG and Weller R. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin, *Br J Dermatol*, 2004; 151: 977-83.
- 104- Amadeu TP, Seabra AB, de Oliveira MG, Costa AMA. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *J Eur Acad Derm Vener* 2007; 21:629–37.
- 105- Amadeu TP, Seabra AB, Oliveira MG and Monte-Alto-Costa A. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase, *J Surg Res*, 2008; 149: 84-93.
- 106- Seal BL, Otero TC, Panitch A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Mater Sci Eng* 2001;34:147–230.
- 107- Cascone MG, Sim B, Downes S. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials*. 1995;16:569–74.
- 108- Giusti P, Lazzeri L, Barbani N, et al. Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and collagen as new bioartificial materials. Part I. Physical and morphological characterisation. *J Mater Sci Mater Med* 1993;4:538–42.
- 109- Higa OZ, Rogero SO, Machado LDB, Mathor MB, Lugao AB. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. *Radiat Phys Chem* 1999; 55:705–7.

- 110- Lopes CMA, Felisberti MI. Mechanical behavior and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidone)-gelatin IPN hydrogels. *Biomaterials* 2003;24:1279–84.
- 111- Wang Q, Hikima T, Tojo K. Skin penetration enhancement by synergistic of supersaturated dissolution and chemical enhancers. *J Chem Eng Jpn* 2003;36:92–7.
- 112- Seabra AB, Oliveira MG. Poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) blended films for local nitric oxide release. *Biomaterials* 2004; 25:3773–82.
- 113- Seabra AB, Da Rocha LL, Eberlin MN, Oliveira MG. Solid films of blended poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl pyrrolidone) for topical S-nitrosoglutathione and nitric oxide release. *J Pharm Sci* 2005;94:994–1003.
- 114- Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 86, Supl. III: 1-11. 1991.*
- 115- Mandarim-de-Lacerda CA. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. *Braz J Morphol Sci* 1999; 16: 131-9.
- 116- Mandarim-de-lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Ciênc; 2003 75(4):469-86.*
- 117- Jephcott JJ, Hally AD. The effects of tissue mass and functional demand on compensatory growth of the avian salt gland. *J Anat.* 1970, 106(Pt 2): 405.
- 118- Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Medical device technology* 2003;14(8):10-3.

119- Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Controlled Release* 2002;78:211–8.

120- Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed. Eng* 2004;6:41–75.

121- Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater* 2006;1:R1–R9.

122- Hanson D, Langemo D, Thompson P, Anderson J, Hunter S. Understanding wound fluid and the phases of healing. *Adv Skin Wound Care* 2005;18(7):360-2.

123- Hunt JA, Williams DF. Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials* 1995;16:167-70.

124- Hetrick EM, Schoenfisch MH. Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials* 2007;28:1948–56.

125- Krause HG, Galloway SJ, Khoo SK, Lourie R, Goh JTW. Biocompatible properties of surgical mesh using an animal model. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2006; 46: 42–5.

126- Bogusiewicz M, Wrobel A, Jankiewicz K, Adamiak A, Skorupski P, Tomaszewski J, Rechberger T. Collagen deposition around polypropylene tapes implanted in the rectus fascia of female rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 124:106–9.

127- Biondo-Simões MLP, Westphal VL, de Paula JB, Borsato KS, Noronha L. Collagen synthesis after the implantation of polypropylene nets in the abdominal wall of young and old rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2005; 20 (4): 300-4.

128- Thiel M, Palma PCR, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto NRJr. A stereological analysis of fibrosis and inflammatory reaction induced by four different synthetic *slings*. BJU Int 2005; 95:833-7.

129- Riccetto CLZ, Thiel M, Palma PCR, Wroclaswski E, Fernandes R, Netto NRJr. Modelo experimental para treinamento de *sling* minimamente invasivos em ovelhas. Int Braz J Urol 2003; 29 (suppl special): 323.

130- Han G, Zippin JH, Friedman A. From bench to bedside: the therapeutic potential of nitric oxide in dermatology. J Drugs Dermatol 2009; 8(6): 586-94.

131- Flora Filho R, Zilberstein B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções; Rev Ass Med Brasil 2000; 46(3): 265-71.

132- Santiago CM, Fernandes CH, Nogueira MS, Veiga EV, Cárnio EC. Utilização do óxido nítrico como terapêutica: implicações para a enfermagem. Rev Latino-am enfermagem 2000; 8(6): 76-82.

133- Frost MC, Reynolds MM, Meyerhoff ME. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. Biomaterials 2005;26:1685–93.

134- Mowery KA, Schoenfisch MH, Saavedra JE, Keefer LK, Meyerhoff ME. Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release. Biomaterials 2000;21:9–21.

135- Cooke JP. NO and angiogenesis. Atherosclerosis Supplements 2003;4:53–60.

136- Dulak J, Jozkowicz A. Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:123–32.

137- Amadeu TP, Costa AMA. Nitric oxide synthesis inhibition alters rat cutaneous wound healing. *J Cutan Pathol*. 2006; 33: 465-73.

138- Shukla A, Rasik AM, Shankar R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. *Mol Cell Biochem* 1999;200:27–33.

139- Hesse M., Cheever A.W., Jankovic D., Wynn T.A. NOS- 2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am. J. Pathol*. 2000; 157: 945–55.

140- Wynn T.A. Fibrotic disease and the T(H)1 / T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol*. 2004; 4:583–94.

141- Lousada S, Flórido M, Appelberg R. Regulation of granuloma fibrosis by nitric oxide during *Mycobacterium avium* experimental infection. *Int. J. Exp. Pathol*. 2006; 87:307–15.

142- Bauer JA. Hydroxocobalamins as biologically compatible donors of nitric oxide implicated in the acceleration of wound healing. *Medical Hypotheses* 1998a; 51: 65-7.

143- Bauer JA, Weisun R, Smith DJ; Evaluation of linear polyethyleneimine/nitric oxide adduct on wound repair: therapy versus toxicity; *Wound repair and regeneration* 1998b; 6(6): 569-77.

144- Masters KSB, Leibivich SJ, Belem P, West JL, Poole-Warren LA. Effects of nitric oxide releasing poly(vinyl alcohol)hydrogel dressings on dermal wound healing in diabetic mice. *Wound repair and regeneration* 2002;10(5): 286-94.

145- Sahlin H, Contreras R, Gaskill DF, Bjursten LM, Frangos JA. Anti-inflammatory properties of micropatterned titanium coatings. *J Biomed Mater Res* 2006;77A:43–9.

146- Chu AJ, Prasad JK. Up-regulation by human recombinant transforming growth factor  $\beta - 1$  of collagen production in cultured dermal fibroblasts is mediated by the inhibition of nitric oxide signaling. *J Am Coll Surg* 1999;188:271–80.

147- Jensen EBV. *Local stereology*. Singapore New Jersey London Hong Kong: World Scientific, 1998. 247p.

148- Weibel ER. 1979. *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*. London: Academic Press, 415 p.

## ***8. Anexo***

## 8.1- Parecer do Comitê de Ética



UNICAMP



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

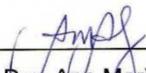
#### CERTIFICADO

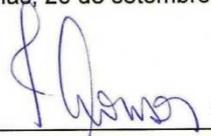
Certificamos que o Protocolo nº 1590-1, sobre "Efeitos do recobrimento de telas de polipropileno monofilamentar com polímeros incorporados com substância doadora de óxido nítrico na integração tecidual quando implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Cássio Luiz Zanettini Riccetto / Alessandro Corrêa Prudente dos Santos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1590-1, entitled " \_\_\_\_\_ ", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEEA – 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/>

## ***9. Apêndices***

**9 1- Tabelas de avaliação das variáveis do processo inflamatório nas ratas eutanasiadas aos 2 dias**

<b>Infiltrado inflamatório após 2 dias (p= 0,1022)</b>							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	IC95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10	1,33	0,49	1	0,22	1	2
PVA	5	1,89	0,78	2	0,36	1	2
PVP	5	1,60	0,55	2	0,36	1	2
GSNO1/PVA	5	1,68	0,41	1,80	0,36	1,60	2,00
GSNO1/PVP	5	1,80	0,45	2	0,39	2,00	2,00
GSNO10/PVA	5	1,96	0,36	2	0,31	2,00	2,00
GSNO10/PVP	5	1,20	0,45	1	0,39	1,00	1,00

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

<b>Edema após 2 dias (p= 0, 7438)</b>							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	IC95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10	1,94	0,73	2	0,34	1,25	2
PVA	5	1,78	0,67	2	0,44	1	2
PVP	5	2,20	0,45	2	0,39	2	2
GSNO1/PVA	5	2,04	0,64	2	0,56	2	2
GSNO1/PVP	5	2,20	0,45	2	0,39	2	2
GSNO10/PVA	5	2,44	0,52	2,20	0,45	2	3
GSNO10/PVP	5	2,20	0,84	2	0,73	2	3

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

<b>Angiogênese após 2 dias (p= 0, 3021)</b>							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	IC95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10	1,39	0,61	1	0,28	1	2
PVA	5	1,33	0,71	1	0,46	1	2
PVP	5	1	0,71	1	0,62	1	1
GSNO1/PVA	5	1,56	0,55	1,60	0,49	1	2
GSNO1/PVP	5	1,80	0,84	2	0,73	1	2
GSNO10/PVA	5	1,44	0,88	1	0,77	1	1,20
GSNO10/PVP	5	0,80	0,45	1	0,39	1	1

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

**9.2- Tabelas de avaliação das variáveis do processo inflamatório nas ratas eutanasiadas aos 21 dias**

<b>Infiltrado inflamatório após 21 dias (p= 0, 1141)</b>							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	IC 95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10,00	1,80	0,76	2,00	0,21	1,00	2,00
PVA	5,00	2,28	0,54	2,00	0,21	2,00	3,00
PVP	5,00	1,76	0,56	2,00	0,27	1,00	2,00
GSNO1/PVA	5,00	2,12	0,33	2,2	0,29	2	2,4
GSNO1/PVP	5,00	2,28	0,61	2,4	0,53	2	2,6
GSNO10/PVA	5,00	2,12	0,52	2,2	0,45	1,8	2,6
GSNO10/PVP	5,00	2,12	0,23	2,2	0,20	2	2,2

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

<b>Edema após 21 dias (p= 0, 03281)</b>							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	IC 95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10,00	1,88	0,85	2,00	0,24	1,00	2,75
PVA	5,00	1,64	0,70	2,00	0,27	1,00	2,00
PVP	5,00	1,76	0,56	2,00	0,27	1,00	2,00
GSNO1/PVA	5,00	1,28	0,50	0,89	0,44	1,40	1,60
GSNO1/PVP	5,00	1,76	0,59	1,40	0,52	1,60	2,00
GSNO10/PVA	5,00	1,68	0,72	1,40	0,63	1,40	2,20
GSNO10/PVP	5,00	1,68	0,33	1,60	0,29	1,40	1,80

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

<b>Angiogênese após 21 dias (p= 0, 02923)</b>							
	N	MÉDIA	SD	MEDIANA	IC95%	Q25%	Q75%
CONTROLE	10,00	1,04	0,83	1,00	0,23	0,00	2,00
PVA	5,00	1,68	0,63	2,00	0,25	1,00	2,00
PVP	5,00	1,41	0,87	2,00	0,41	1,00	2,00
GSNO1/PVA	5,00	1,72	0,44	1,60	0,38	1,60	1,80
GSNO1/PVP	5,00	1,16	0,83	1,60	0,73	0,60	1,60
GSNO10/PVA	5,00	1,56	0,52	1,60	0,45	1,40	1,80
GSNO10/PVP	5,00	1,04	0,48	0,80	0,42	0,80	1,20

N= número de campos / DP: Desvio Padrão / IC 95%: Intervalo de confiança de 95% / Q= quartil

### 9.3- Avaliação das fibras colágenas nas ratas eutanasiadas aos 21 dias

Fibras Colágenas após 21 dias							
	N	MÉDIA	DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO	p valor
CONTROLE	4	20,7	4,5	19,6	17	26,6	
PVA	3	26,79	7,5	27,1	17,1	34,3	0,25
PVP	3	32,2	10,1	30,2	23,3	43,1	0,25
GSNO1/PVA	4	33,1	5,9	31,6	28,2	41	0,34
GSNO1/PVP	4	25,4	11,3	22,5	15	41,4	0,34
GSNO10/PVA	3	22,6	3,8	21,8	19,3	26,7	0,25
GSNO10/PVP	4	29,3	10,4	26,2	20,5	44,3	0,40

N= número de animais / MÉDIA: Média DP: Desvio Padrão