



RODRIGO TEIXEIRA SINISCALCHI

**“EFEITOS BIOMECÂNICOS E HISTOLÓGICOS DO
RECOBRIMENTO DE TELA DE POLIPROPILENO COM GEL
PURIFICADO DE COLÁGENO: ESTUDO EXPERIMENTAL”**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

RODRIGO TEIXEIRA SINISCALCHI

**EFEITOS BIOMECÂNICOS E HISTOLÓGICOS DO
RECOBRIMENTO DE TELA DE POLIPROPILENO COM GEL
PURIFICADO DE COLÁGENO: ESTUDO EXPERIMENTAL**

Orientador: Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto

Coorientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno **Rodrigo Teixeira Siniscalchi** e orientada pelo **Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto**.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP
Bibliotecário: Maristella Soares Dos Santos – Crb8/8402

Si65e Siniscalchi, Rodrigo Teixeira, 1971-
Efeitos biomecânicos e histológicos do recobrimento de
tela de polipropileno com gel purificado de colágeno :
estudo experimental / Rodrigo Teixeira Siniscalchi. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Cássio Luís Zanettini Riccetto.
Coorientador : Benedicto de Campos Vidal.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Malhas cirúrgicas. 2. Colágeno. 3.
Biocompatibilidade. I. Riccetto, Cássio Luís Zanettini. II.
Vidal, Benedicto de Campos, 1930-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Biomechanical and histologic effects of coating a polypropylene mesh with a purified collagen gel: experimental study.

Palavras-chave em inglês:

Surgical mesh
Collagen
Biocompatibility

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Cássio Luís Zanettini Riccetto [Orientador]
João Luiz Amaro
Fábio Lorenzetti
Leonardo Oliveira Reis
Luiz Carlos Maciel

Data da defesa: 18-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: RODRIGO TEIXEIRA SINISCALCHI

Orientador: Prof. Dr. Cássio Luis Zanetini Riccetto

Coorientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

Membros:

1. PROF(A). DR(A). CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICCETTO



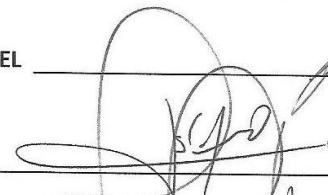
2. PROF(A). DR(A). LEONARDO OLIVEIRA REIS



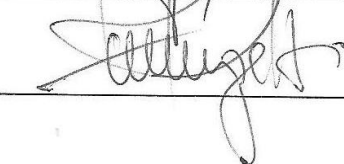
3. PROF(A). DR(A). LUIZ CARLOS MACIEL



4. PROF(A). DR(A). JOÃO LUIZ AMARO



5. PROF(A). DR(A). FÁBIO LORENZETTI



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

Data: 18/12/2012

Dedico este trabalho...

A meu pai, Roberto Rezende Siniscalchi (in memorian), "Homem que com seu jeito finito de ser Deus, revelava-me Deus com seu jeito infinito de ser homem"

A minha mãe Lêda exemplo de garra e determinação

Aos meus irmãos pelo apoio e incentivo

A minha esposa Nilbia por todo amor e perseverança em construir uma historia ao meu lado

Aos nossos filhos Maria Clara e Bernardo, luz e motivação de nossas vidas.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, um ícone, pela disponibilização de seus conhecimentos, lições de vida e obstinação.

Ao Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Riccetto, idealizador deste trabalho, exemplo de inteligência e capacidade profissional, sua liderança e dinamismo impulsionaram o desenvolvimento científico, técnico de todos que tem o privilégio de conviver ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Palma que sempre generoso e compartilhador, acolhe e incentiva a promoção dos mais jovens.

Ao amigo Prof. Dr. Luiz Carlos Maciel que pelo seu exemplo me ensinou as dificuldades e os deleites de ser urologista e pesquisador.

A Dra. Marli Melo, patologista da Faculdade de Medicina de Itajubá pela paciência e didática no compartilhamento da análise das lâminas.

Ao Dr. Sérgio Visoni Vargas, pelo exemplo, incentivo e amizade.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp pelo companheirismo e ajuda dedicada durante toda a fase inicial deste projeto.

A FAPESP (Fundação de Amparo a pesquisa do Estado pelo São Paulo) pela disponibilização de recursos para a execução desse projeto de pesquisa (processo 2010-01757-0).

Epígrafe

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem; mas o homem sábio é um criador de valores que não existem, e que ele faz existir.”

Albert Einstein

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xiii
Lista de Figuras	xv
Resumo	xvii
Summary	xx
1. Introdução	23
1.1. PROLAPSOS DOS ÓRGÃOS PÉLVICOS (POP) E O ENVELHECIMENTO FEMININO	23
1.2. PRINCÍPIOS DO USO DE IMPLANTES NA CIRURGIA PÉLVICA RECONSTRUTIVA.....	27
1.3. COLÁGENO E A INTEGRAÇÃO DE IMPLANTES.....	30
1.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GEL DE COLÁGENO PURIFICADO.....	32
2. Objetivos.....	35
2.1.OBJETIVOS	35
3. Material e Métodos	37
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	37
3.2. MATERIAL	37
3.3. AMOSTRA	40
3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	40
3.5. COLETA DOS ESPÉCIMES	42
3.5.1. Preparo das amostras para o estudo biomecânico.....	43
3.5.2. Preparo das amostras para o estudo histológico	44
3.6. AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA	45
3.7. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	51
3.7.1. Análise Anatomopatológica	51
3.7.2. Análise das Propriedades Ópticas Anisotrópicas	53

4. Resultados.....	61
4.1. ESTUDO BIOMECÂNICO.....	61
4.2. ESTUDO HISTOLÓGICO	65
4.2.1. Estudo Anatomopatológico	65
4.2.2. Estudo da birrefringência (anisotropia)	79
5. Discussão	93
5.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ESTUDOS BIOMECÂNICOS.....	93
5.2. ASPECTOS GERAIS DA INTEGRAÇÃO DOS IMPLANTES	100
5.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE COLÁGENO MICROFIBRILAR ESTABILIZADO COM GLUTARALDEÍDO.....	104
5.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE OS RESULTADOS OBSERVADOS COM O GEL DE COLÁGENO PURIFICADO	105
5.5. CONSIDERAÇÕES SOBRE TELAS DE POLIPROPILENO REVESTIDAS (TELAS BIOSINTÉTICAS).....	107
5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
6. Conclusões	116
7. Referências Bibliográficas	117
8. Anexos.....	132
8.1. ANEXO 1 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	132
8.2. ANEXO 2 - RELATÓRIO TÉCNICO DE ESTERELIZAÇÃO.....	133
8.3. ANEXO 3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES REALIZADOS COM AS TELAS ANTES DO IMPLANTE.....	134
8.4. ANEXO 4 - VALORES BRUTOS MEDIDOS DE CARGA MÁXIMA (N) NOS TEMPOS	135
8.5. ANEXO 5 - ESTUDO HISTOLÓGICO(ANATOMOPATOLÓGICO) – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA.....	136
8.6. ANEXO 6 - MEDIDAS DE BIRREFRINGÊNCIA – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA (PIXEL)	137
8.7. ANEXO 7 - DESCRIÇÃO E AVALIAÇÃO DO APOIO.....	149

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

a.C.	Antes de Cristo
Ag	Prata
AN	Analizador
EUA	Estados Unidos da América
CEEA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
HE	Hematoxilina-Eosina
IB	Instituto de Biologia
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
J	Joules
KGy	Kilo gray
N	Newtons
NaCl	Solução de Cloreto de Sódio a 0,9%
N/m	Newtons por metro
mm	Milímetros
MUE	Máquina Universal de Ensaio
p	Valor de p = Índice de significância

PLP	Tela de Polipropileno
PLP + C	Tela de Polipropileno com Colágeno
PO	Pós Operatório
POL	Polarizador
POP	Prolapso dos Órgãos Pélvicos
PVC	Poli Cloreto de Vinila
RO	Retardo Óptico
Sen	Seno
T	Transmitância
TVT	<i>Tension-free Vaginal Tape</i>
μm	Micrômetros

Lista de Figuras

	Páginas
Figura: 1 Telas de Polipropileno tipo I implantadas	38
Figura: 2 Microscopia das telas	39
Figura: 3 Implante das Telas	41
Figura: 4 Retirada dos <i>specimes</i>	43
Figura: 5 Sistema de ancoragem	46
Figura: 6 Teste de Tração	47
Figura: 7 Gráfico: Teste de Tração	48
Figura: 8 Microscópio de Polarização	57
Figura: 9 Esquema representativo - Birrefringência	57
Figura: 10 Teste de Tração das Telas antes do implante	62
Figura: 11 Representação gráfica da amostra – Carga Máxima (N)	64
Figura: 12 Intensidade da reação inflamatória aguda	68
Figura: 13 Histologia HE - Infiltrado neutrofílico – 07 dias	69
Figura: 14 Intensidade da reação inflamatória crônica – 07 dias (PLP)	70
Figura: 15 Histologia HE - infiltrado inflamatório crônico – 07 dias (PLP)	70
Figura: 16 Histologia HE - infiltrado inflamatório crônico – 07 dias (PLP + C)	71
Figura: 17 Micrografia do implante – 07 dias	72
Figura: 18 Intensidade da formação de tecido de granulação	73

Figura: 19	Histologia HE - Tecido de granulação – 07 dias (PLP)	73
Figura: 20	Histologia HE - Tecido de granulação – 07 dias (PLP + C)	74
Figura: 21	Histologia HE - Célula Gigante – 07 dias	75
Figura: 22	Intensidade da reação do tipo corpo estranho	75
Figura: 23	Histologia HE - Reação Corpo estranho – 07 dias (PLP)	76
Figura: 24	Célula epitelióide	77
Figura: 25	Intensidade da reação granulomatosa	78
Figura: 26	Histologia HE - Formação de granuloma – 07 dias	79
Figura: 27	Distribuição e direção das fibras colágenas - Histologia Prata (Ag)	80
Figura: 28	Colágeno complexado a tela (PLP + C) - Histologia Masson	81
Figura: 29	Colágeno complexado a tela e colágeno neo-formado	82
Figura: 30	Empacotamento das fibras colágenas – Histologia Ag	83
Figura: 31	Birrefringência das fibras colágenas – 07 dias	85
Figura: 32	Histograma – Densidade de Brilho 07 dias	86
Figura: 33	Histograma – Densidade de Brilho 14 dias	87
Figura: 34	Birrefringência das fibras colágenas – 90 dias	88
Figura: 35	Histograma – Densidade de Brilho 90 dias	89
Figura: 36	Histograma – Densidade de Brilho 180 dias	90

Resumo

Introdução: O material sintético (tela) mais utilizado atualmente no tratamento da Incontinência Urinária de Esforço (IUE) e dos prolapsos da parede vaginal, também conhecidos como Prolapsos dos Orgãos Pélvicos (POP) é o polipropileno monofilamentar, com índices de cura de até 90%. Porém, as complicações relacionadas à integração tecidual desses implantes são relativamente prevalentes. O colágeno, por ser um material biologicamente compatível, pouco imunogênico e com propriedades moduladoras do processo inflamatório, pode ser utilizado como um importante agente cicatrizante e, nesse sentido, poderia melhorar a integração das telas. **Objetivo:** Estudar os efeitos biomecânicos e histológicos do recobrimento de tela de polipropileno monofilamentar com gel purificado de colágeno, implantadas no tecido subcutâneo de ratas. **Material e Métodos:** Vinte ratas foram utilizadas para o estudo histológico e outras 20 para o estudo biomecânico. De um lado da parede abdominal do animal foi implantado um fragmento tela de polipropileno monofilamentar macroporosa medindo 20 x 10 mm, habitualmente utilizada no tratamento da IUE e dos POP (Grupo I), denominada PLP (tela de polipropileno) e do outro lado foi implantada uma tela com as mesmas dimensões recoberta com gel purificado de colágeno (Grupo II), denominada PLP+C (tela de polipropileno recoberta com o gel purificado de colágeno). De acordo com o

tempo de eutanásia (7, 30, 90 ou 180 dias) após o implante os animais de cada grupo foram divididos em quatro subgrupos contendo cinco animais cada. Foi então realizada excisão em bloco da parede abdominal para as análises. O estudo biomecânico foi realizado em um tensiômetro de precisão, no qual a tela era tracionada em sentido uniaxial até que se desprendesse da interface tecidual. Para quantificar a aderência do material, em cada grupo, foi analisada a carga máxima necessária para este desprendimento. No estudo histológico foram analisadas as características relativas à inflamação aguda e crônica além do tecido de granulação, formação de granuloma e reação de corpo estranho em lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), utilizando-se de método semiquantitativo. A organização supramolecular da deposição colágena em torno das telas foi estudada através de microscopia de polarização (birrefringência). **Resultados:** No estudo biomecânico observou-se que a aderência das telas de polipropileno aos tecidos circunvizinhos aumentou significativamente após o recobrimento com o gel purificado de colágeno, como demonstrado na análise dos valores encontrados para a Carga Máxima no 7º ($p=0,0016$), 14º ($p=0,0039$), 90º ($p=0,0009$) e 180º ($p=0,0029$) dias após o implante. Considerou-se nessa pesquisa, que o aumento da biocompatibilidade da tela de polipropileno seria alcançado quando, na interface tecidual, houvesse redução da intensidade do processo inflamatório. Verificou-se que a resposta inflamatória crônica e aguda (neutrofílica), assim como a formação de tecido de granulação foi menos intensa, respectivamente $p=0,004$, $p<0,001$ e $p=0,001$ nas telas recobertas com o colágeno na fase inicial (7º e 14º dias) e ausente, assim como nas telas não recobertas na fase tardia (90º e 180º dias). A

inflamação granulomatosa foi observada de forma menos significativa aos sete dias após o implante nos animais do grupo II ($p=0,029$) e em ambos os grupos, de maneira similar, diminuiu ao longo do tempo não mostrando diferença significativa. A reação de corpo estranho foi menos intensa na fase inicial no grupo II ($p<0,001$) e semelhante entre os grupos na fase tardia. Nas análises de birrefringência foi observado no período inicial (sete dias) uma maior densidade média de brilho (transmitância) a favor das telas não recobertas ($p=0,000$), porém nos outros períodos analisados a densidade média de brilho foi maior nas tela do grupo II (PLP+C), 14 dias ($p=0,000$), 90 dias ($p=0,000$) e em 180 dias ($p=0,000$). **Conclusão:** O recobrimento das telas de polipropileno com o gel purificado de colágeno aumentou sua aderência aos tecidos, quando implantadas na interface da parede abdominal de ratas adultas, tanto precocemente quanto tardiamente; promoveu uma resposta inflamatória menos intensa e duradoura e na fase tardia do implante desencadeou maior organização e empacotamento das fibras de colágeno. Estes dados inferem que a tela recoberta com o gel purificado de colágeno quando locada em seu leito de implante terá, provavelmente, menor mobilidade e também uma melhor adaptação e integração ao corpo do hospedeiro resultando em menor chance de complicações.

Summary

Introduction: The synthetic material most currently used in the treatment of stress urinary incontinence (SUI) and vaginal wall prolapse, also known as pelvic organ prolapse (POP) is the monofilament polypropylene mesh (PLP). However, complications related to tissue integration of these implants are relatively prevalent. Collagen is the main structural protein of mammals, which modulates inflammatory process, and can be used as an important healing agent and, accordingly, could improve the integration of the meshes. **Objetives:** To study the biomechanical and histological effects of PLP, coated with purified collagen gel, implanted in the subcutaneous tissue of adult rats. **Methods:** Twenty rats were used for histological study and other 20 for the biomechanical study. At one side of the abdominal wall, PLP fragment measuring 20x10 mm was implanted (Group I), and in the other side a mesh fragment with the same dimensions coated with purified collagen gel PLP+C) was implanted (Group II). According to the time of euthanasia (7, 30, 90 or 180 days) after implantation the animals from each group were divided into four subgroups of five animals each. The biomechanical study was performed with a precision tension meter with in bloc fresh abdominal wall sample containing the mesh. The mesh was pulled up in uniaxial direction until complete detachment of the tissue interface and the maximum load required for the detachment was analyzed in each group. In the

histological study, it was examined characteristics of the acute and chronic inflammatory reaction, granulation tissue, granuloma formation, and foreign body reaction on slides stained with hematoxylin-eosin. The supramolecular organization of the collagen deposition around the meshes was studied with polarizing microscopy (birefringence analysis). **Results:** In biomechanical study it was observed that the adhesion of PLP to surrounding tissues increased significantly after coating with purified collagen gel, as shown in the analysis of the maximum load at the 7th ($p=0.0016$), 14th ($p=0.0039$), 90th ($p=0.0009$) and 180th ($p=0.0029$) days after implantation. It was considered in this research, that increased biocompatibility of PLP would be achieved when, in tissue interface, there was a reduction of the intensity of the inflammatory process. It was found that the acute and chronic inflammatory response, as well as the formation of granulation tissue were less intense, respectively $p=0.004$, $p<0.001$ and $p=0.001$ for PLP+C in the initial phase (7th and 14th days) and missing, as well as on the meshes not covered in late phase (90th and 180th days). Granulomatous inflammation was less significant seven days after implantation in animals of Group II ($p=0.029$) and in both groups, similarly, decreased over time showing no significant difference. The foreign body reaction was less intense in the initial phase in Group II ($p<0.001$) and similar between the groups in the late phase. In the birefringence analyses, it was noted a greater average density of brightness (transmittance) in PLP ($p=0.000$) in the initial period (seven days), but in other periods it was greater for PLP+C [14 days ($p=0.000$); 90 days ($p=0.000$) and 180 days ($p=0.000$)]. **Conclusions:** Coating of polypropylene meshes with purified collagen gel increased their adhesion to the tissues, when implanted in

the subcutaneous of the abdominal wall of adult rats and promoted a less intense and lasting inflammatory response and, in the late stage of the implant, triggered greater organization and packaging of collagen fibers. Based on that, one can suppose that mesh coated with purified collagen gel can fix better to the host tissues preventing its displacing, and can elicit fewer integration defects, resulting in less chance of complications.

1. Introdução

1.1. Prolapsos dos Orgãos Pélvicos (POP) e o envelhecimento feminino

O aumento da expectativa de vida da população em geral e das mulheres em particular é uma realidade. No nosso país a esperança de vida do sexo feminino já ultrapassa os 85 anos (1). O envelhecimento é um processo natural, sequencial, individual, acumulativo, irreversível, universal, não patológico, de deterioração do organismo que ao longo do tempo impõe ao indivíduo alterações diversas e produz efeitos estruturais e comportamentais que repercutem no contexto biopsicossocial e na qualidade de vida da pessoa. As alterações ocorrem em nível celular, tecidual, orgânico e nos sistemas. Cada compartimento sofre alterações naturais a seu próprio tempo como resultado de agressões intrínsecas e extrínsecas. Na população feminina o envelhecimento dos tecidos leva a um aumento da probabilidade de aparecimento de vários tipos de prolapso dos órgãos pélvicos (1,2).

A prevalência do prolapso pélvico entre mulheres acima de 60 anos é 25%, e a probabilidade de ser atendida em uma unidade hospitalar em

decorrência desta doença é de 2/1000 ao ano. O risco de desenvolver o prolapso pélvico aumenta 10% a cada década de vida. A necessidade de tratamento cirúrgico para esta doença é de 11,1%, e a chance de uma segunda intervenção cirúrgica em decorrência de falha na primeira é de 30% (3,4,5). No Brasil, o ponto máximo de ocorrer prolapso é entre 60 a 69 anos de idade, aumentando o risco conforme o avanço da idade (1).

De 1980 a 2025, na América Latina e Caribe, estima-se que a população com 60 anos de idade dobre de tamanho, e que triplique em mais da metade destes países antes do ano de 2025 (6). Este rápido e acentuado envelhecimento da população terá um impacto significativo nas necessidades sociais, econômicas e na atenção à saúde. As necessidades de atenção à saúde serão aquelas relacionadas às doenças crônicas degenerativas e suas sequelas, assim como outras queixas tais como as relacionadas à incontinência urinária e prolapso pélvicos (3,4,5).

Define-se como prolapso de órgãos pélvicos ou distopia genital como a protrusão permanente de qualquer estrutura do segmento vaginal ou órgão pélvico de seu local habitual, abrangendo as paredes vaginais. Os defeitos das estruturas de sustentação podem ser classificados de acordo com sua localização anatômica em anormalidades da parede vaginal anterior (cistocele), defeitos apicais (prolapso uterino e ou da cúpula vaginal e a enterocele); e anormalidades de parede posterior (retoceles e roturas perineais) (7).

O conceito e a história de prolapso genital surgiram em torno de 1500 a.C. relatados no papiro de Ebers e depois por Hipócrates quando o

mesmo descreveu seu tratamento clínico com o uso de pessários de suporte e também propôs o tratamento cirúrgico em 400 a.C (8).

A manutenção do equilíbrio entre os órgãos pélvicos é mantida pela ação do aparelho de suspensão (ligamentos pubovesicuterinos, uterossacros e cardinais) e do aparelho de sustentação (diafragma pélvico, diafragma urogenital e fáscia endopélvica). Assim, desequilíbrios entre as forças que tendem a manter tais órgãos em suas posições normais contra as forças que tendem a expeli-los para o meio exterior contribuem para as distopias genitais (9).

Sua etiologia é multifatorial e desconhecida. Fatores como gestações múltiplas, idade avançada, menopausa (contribuindo com a diminuição dos níveis de estrogênio), ação da gravidade, doenças associadas como as pulmonares, miopatias e neuromiopatias, obesidade, rotura perineal, enfraquecimento dos ligamentos e defeitos qualitativos do colágeno contribuem para o aparecimento de algum grau de prolapso. De todos estes fatores, a paridade é considerada o fator mais comum, principalmente por via vaginal quando comparado à cesárea (3,10).

Estudos prévios demonstraram que a quantidade e qualidade do colágeno presente no tecido de suporte aos órgãos pélvicos de mulheres com prolapso são menores do que naquelas que não apresentam a doença (5,11,12). Também foi demonstrada a relação entre alterações da quantidade e qualidade do colágeno em mulheres com síndrome de Ehlers-Danlos e

Síndrome de Marfans, as quais apresentam maior incidência de prolapsos pélvicos (13,14).

Os quadros clínicos são variados, desde assintomáticos nas fases iniciais, até comprometimento das atividades diárias e sexuais das pacientes. A maioria inclui sensação de peso, disúria, polaciúria, retenção urinária, dispareunia, infecção urinária de repetição, obstipação intestinal. O prolapso genital, além do impacto psicológico, social e econômico que acarreta, proporciona elevados custos de saúde e uma má qualidade de vida nas mulheres, gerando uma sensação de incapacitação (15).

Na atualidade, o prolapso genital feminino é uma das queixas mais comuns em consultas ginecológicas, além de ser também uma das maiores indicações cirúrgicas. O tratamento primordial e mais utilizado é a cirurgia, seja por via abdominal ou vaginal, tanto por laparotomia quanto laparoscopia (16).

Atualmente, vários procedimentos cirúrgicos vêm sendo propostos para correção das distopias genitais, porém mesmo com o avanço sobre novas técnicas e conhecimento sobre a anatomia pélvica, os resultados continuam insatisfatórios e o risco de uma recidiva chega a ser de 22% a 92%, principalmente quando o local é a parede vaginal anterior (17). Esses resultados são associados às técnicas tradicionais que se utilizam de suturas e tecido nativo, que habitualmente apresenta suas propriedades de sustentação comprometidas. Com o uso das telas existe expectativa de melhora dos resultados em longo prazo. A vantagem da maior força e durabilidade, fácil disponibilidade e versatilidade, comparada com os autoenxertos, tal como

bainha do reto abdominal ou fásia lata, tem sido balanceada contra o aumento do risco de infecção e erosão (16).

O polipropileno monofilamentar é o material sintético mais utilizado atualmente no tratamento dos prolapso dos órgãos pélvicos (POP). O sucesso do procedimento depende da interação tela-tecido, que é influenciado pelas propriedades biomecânicas deste material e pelas condições tróficas do tecido nativo. Portanto, é imperioso que sejam desenvolvidas e implantadas ações com o objetivo de diminuir a incidência e a recidiva dessa condição (18).

1.2. Princípios do uso de implantes na cirurgia pélvica reconstrutiva

Desde a introdução do procedimento *tension-free vaginal tape* (TVT) em 1998, materiais sintéticos têm sido cada vez mais empregados nas cirurgias reconstrutivas urológicas e ginecológicas. Há grande experiência no uso dos *slings* no tratamento da incontinência urinária de esforço em mulheres e, recentemente, vem se desenvolvendo o uso de telas para o tratamento dos prolapso vaginais (19).

O emprego de próteses permite maior padronização dos procedimentos e diminuição do tempo cirúrgico e de recuperação pós-operatória, possibilitando retorno mais precoce da paciente às suas atividades habituais. No presente, as implicações do emprego de próteses para reconstrução do assoalho pélvico ainda não se encontram definitivamente estabelecidas, particularmente suas interações em longo prazo com a bexiga e o reto, bem como suas possíveis consequências sobre a função sexual (16).

Assim, seu emprego é reservado às pacientes com prolapso acentuados e com significativo comprometimento tecidual, nos quais qualquer técnica baseada exclusivamente em suturas das estruturas lesadas resulta em elevados índices de recidiva. Estima-se que 10% de todos os procedimentos cirúrgicos ginecológicos visam à terapêutica do prolapso genital, sendo que a incidência de recidiva varia de 1% a 43% após as técnicas tradicionais de correção dos prolapso (18).

Em cirurgia pélvica reconstrutiva a tela sintética é usada com a intenção de consolidar e complementar a técnica cirúrgica insuficiente tendo também como propósitos substituir um tecido deficiente e participar da formação de um novo tecido de suporte (20).

Grande variedade de biomateriais tem sido empregada na reconstrução do assoalho pélvico e as próteses sintéticas mais utilizadas, atualmente, no tratamento dos POP são as de polipropileno. O advento do uso de telas sintéticas expandiu as opções para tratamento dos prolapso dos órgãos pélvicos. Foram observadas diferenças clínicas significativas entre as telas de polipropileno monofilamentar e multifilamentar. Tais diferenças podem relacionar-se às características da tela, incluindo o tipo de trançamento dos filamentos e tamanho dos poros (21). Considera-se que tais diferenças podem determinar alterações da sua biocompatibilidade e, conseqüentemente, da tendência à infecção, erosão e extrusão vaginal (22). As telas sintéticas mais utilizadas no momento são as Tipo I (de Amid) - Telas macroporosas com poros maiores que 75µm – diâmetro necessário para a passagem de macrófagos e fibroblastos, bem como a angiogênese e deposição de fibras colágenas (23).

Estudos concluíram que o uso da tela tipo I para o tratamento do prolapso vaginal é altamente efetivo e relativamente seguro. Permitem a redução da duração do ato cirúrgico, sem o risco de transmissão de doenças dos enxertos biológicos e apresentam resultados anatômicos de cura em até 90% dos casos (24,25,26).

A tela ideal impede a aderência bacteriana e permite que os macrófagos entrem no interstício. Quatro características da tela que integradas trazem melhores resultados: polipropileno, elasticidade, macroporos e monofilamentos (27,28). Ao escolher uma tela inadequada é possível esperar maior morbidade (29).

Porém, deve-se atentar a tais contrapontos, principalmente em relação aos efeitos indesejáveis das telas. A literatura demonstra claramente maior risco de complicações locais da cirurgia tais como a erosão da uretra e/ou tecidos vizinhos, extrusão/exposição da tela na parede vaginal, dispareunia, infecção da prótese, dor, sangramento vaginal, seromas, fístulas, retração cicatricial e a própria recidiva (29,30,31).

Como existe a possibilidade de complicações relacionadas ao uso de telas no tratamento das distopias genitais levando a necessidade de remoção das mesmas justifica-se o desenvolvimento de estratégias que possibilitem reduzir estes eventos na parede vaginal.

Com o objetivo de obter melhores resultados cirúrgicos foram publicados estudos iniciais, onde estão desenvolvendo telas revestidas, as chamadas telas híbridas, seja com colágeno, titânio, pericárdio bovino,

submucosa intestinal suína (32,33,34,35,36). Estas surgem como uma opção no arsenal terapêutico das distopias genitais.

Testes iniciais em cultura de fibroblastos mostraram que estas células reconhecem e aderem-se às fibras de colágeno obtido de material heterólogo (colágeno tipo I obtido de tendão bovino/suíno). Tais qualidades suportam a hipótese de que um gel purificado de colágeno tipo I possa ser usado como um arcabouço junto à tela de polipropileno. A matrix de colágeno processada a partir de tendão de animais tem sido empregada no tratamento de algumas doenças, tais como lesões ortopédicas, lesões axonais, incontinência urinária de esforço e também prolapsos genitais (34,35,37,38,39).

A composição do colágeno tipo I e sua supraorganização estrutural a torna qualificada para favorecer a adesividade plaquetária e hemostasia primária local. As plaquetas aderidas liberam fator de crescimento para fibroblastos e fatores estimulantes da angiogênese (40,41,42). Dessa forma, é possível postular que o revestimento de telas sintéticas o gel purificado de colágeno tipo I aprimore as reações proliferativas do reparo tecidual e, assim, contribua para sua adaptação biológica e funcional.

1.3. Colágeno e a integração de implantes

O colágeno é a principal proteína estrutural da matriz extracelular dos animais, representando uma alternativa atraente de implante biológico (43).

Sob a microscopia óptica, a porção colagênica da matriz extracelular é formada por numerosos feixes de filamentos, denominados fibrilas. As fibrilas

de colágeno são constituídas por moléculas de tropocolágeno, agregadas segundo um arranjo supramolecular helicoidal característico (44).

As moléculas de tropocolágeno são constituídas por três cadeias polipeptídicas, entre as quais ocorrem ligações cruzadas intermoleculares de natureza covalente, responsáveis pela estabilidade bioquímica da molécula (45).

Diferenças entre as cadeias polipeptídicas caracterizam pelo menos cinco moléculas de colágeno identificadas, que são classificadas de I a V, de acordo com as cadeias que as compõem (44). As ligações intermoleculares concentram-se nas extremidades não helicoidais das moléculas de tropocolágeno, também denominadas, de acordo com sua composição bioquímica, de regiões telopeptídicas ou porções carboxi e amino terminais (46).

Nas diferentes espécies de mamíferos ocorreram, durante a evolução, algumas variações na quantidade e na sequência dos aminoácidos da cadeia polipeptídica do colágeno. No entanto, a composição essencial e o arranjo supramolecular característicos desta proteína fibrosa foram preservados, contribuindo para o baixo potencial imunogênico e permitindo sua utilização como xenoenxerto (47).

Os primeiros estudos sobre a antigenicidade do colágeno foram conduzidos por Davison e cols. (48). Os principais determinantes antigênicos tipo-específicos e espécie-específicos do colágeno localizam-se nas porções telopeptídicas amino terminal e carboxi terminal da proteína, em especial na

cadeia alfa 2 (49). A remoção seletiva destas regiões através da solubilização em pepsina, apesar de reduzir o potencial antigênico de forma significativa, resulta na diminuição da estabilidade molecular, uma vez que as ligações intermoleculares naturais concentram-se nestas regiões (43). Assim, a introdução artificial de ligações intermoleculares tem a finalidade de prolongar a sobrevivência do enxerto, diminuindo a resposta imune celular do hospedeiro (47). O glutaraldeído representa, até o momento, a substância mais utilizada com esta finalidade (50).

Outras formas de purificação do colágeno foram desenvolvidas, visando evitar possíveis efeitos citotóxicos atribuídos ao glutaraldeído, como o empregado no colágeno utilizado no presente experimento, baseado na refrigeração de tendões bovinos dissecados imersos em solução aquosa de ácido clorídrico e pepsina, seguida de reconstituição pela adição de solução de NaCl a 0,9% e estabilização através de diálise prolongada em água destilada. O objetivo deste procedimento foi obter um gel de colágeno com características que visavam facilitar sua adesão à tela.

1.4. Considerações sobre o gel de colágeno purificado

O colágeno utilizado neste estudo foi produzido no Laboratório de Biologia dos Colágenos I e II e Morfometria do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal (40).

O preparado é composto de colágeno do tipo I obtido de tendões bovinos, constituído por duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2, tratado através de técnica de alta purificação com a finalidade de eliminarem-se as porções imunogênicas telopeptídicas, de acordo com o pedido de patente, Protocolo número: 018100044206 (40,51,52).

O processo de solubilização do preparado de colágeno consiste na refrigeração por período de 24 horas, dos tendões dissecados imersos em solução aquosa, contendo 0,01% de ácido clorídrico e 1mg de pepsina por grama de tecido. O colágeno obtido é então reconstituído pela adição de solução de NaCl 0,9 % até a concentração final de 5%. A seguir, esta solução é estabilizada através de diálise prolongada em água destilada, por período de cinco a sete dias.

A esterilização do colágeno foi realizada através do método de irradiação com raios gama na dose 25 kGy, com o objetivo de preservar a estabilidade estrutural das moléculas (47).

Embora o glutaraldeído seja frequentemente usado como estabilizador de colágeno, estudos têm advertido sobre a possibilidade de efeitos de citotóxicos produzidos por concentrações crescentes desta substância durante preparação (53).

A obtenção do gel de colágeno, utilizado neste estudo, baseou-se no princípio da autoagregação espontânea das macromoléculas, que garante uma organização supramolecular característica, quando fragmentos da molécula original são submetidos a determinadas condições físico-químicas. Com relação ao colágeno, tentativas de fibrilogênese ordenada, a partir da molécula

solubilizada, foram descritas previamente, porém, sem a obtenção de uma estrutura semelhante à original. Com base neste princípio, um método pioneiro que usa diálise prolongada com água destilada foi descrito para obter moléculas com um arranjo supramolecular semelhante ao do colágeno em tendões. Neste processo, as moléculas de água formariam pontes de hidrogênio com as moléculas de colágeno, facilitando o movimento das fibrilas e a reorganização de uma estrutura helicoidal semelhante à estrutura fibrilar do tendão. O autor verificou, também, que a interrupção precoce da diálise resultava em feixes de fibras com diâmetro e orientação irregulares. Este mesmo demonstrou, objetivamente, que a elasticidade é diretamente proporcional ao tempo de diálise do colágeno, sendo máxima após cinco a sete dias. Verificou, ainda, que a viscosidade diminui na proporção inversa ao período de diálise. Foi considerado que, a baixa viscosidade permite a manutenção da estrutura fibrilar ordenada e a elevada elasticidade do material contribui para impedir sua fragmentação e migração à distância, além de propiciar o preenchimento uniforme da estrutura a ser recoberta (40).

No presente experimento, objetiva-se observar as alterações histológicas (anatomopatológicas e propriedades anisotrópicas) e biomecânicas decorrentes da interação das telas recobertas pelo gel de colágeno com características reológicas com o leito de implante, evidenciando a evolução local, resposta inflamatória, absorção e aderência do material durante o período estudado.

2. Objetivos

2.1. Objetivos

- Avaliar a adesividade das telas de polipropileno recobertas por colágeno, implantadas na parede abdominal de ratas adultas, aos tecidos circunvizinhos por meio de testes biomecânicos.
- Estudar as características da reação inflamatória induzida por telas de polipropileno recobertas por colágeno, implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas.
- Avaliar a organização supramolecular do colágeno neoformado em torno das telas de polipropileno recobertas por colágeno implantadas no tecido subcutâneo de ratas adultas, através de microscopia de polarização (propriedades anisotrópicas - birrefringência).

3. Material e Métodos

3.1. Aspectos Éticos

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas-(NMCE-UNICAMP) após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa-IB-UNICAMP) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas conforme protocolo 1972-1 (Anexo 1) estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2. Material

As telas utilizadas neste estudo, eram constituídas de polipropileno monofilamentar tipo I – com gramatura original de 85 g/m², foram doadas pela PROMEDON (Córdoba- Argentina) e assim denominadas (Figura 1):

Grupo I ou PLP - Tela de polipropileno monofilamentar de 20 mm x 10 mm, com peso médio de 0,033 gramas (medidas previamente em balança de precisão – GEHAKA BG 440, São Paulo, Brasil)

Grupo II ou PLP + C - Tela de polipropileno monofilamentar também medindo 20X10 mm e recoberta com gel de colágeno. Pesando, em média 0,034 gramas, apresentando, portando, um aumento de peso não significativo de peso em relação à PLP.

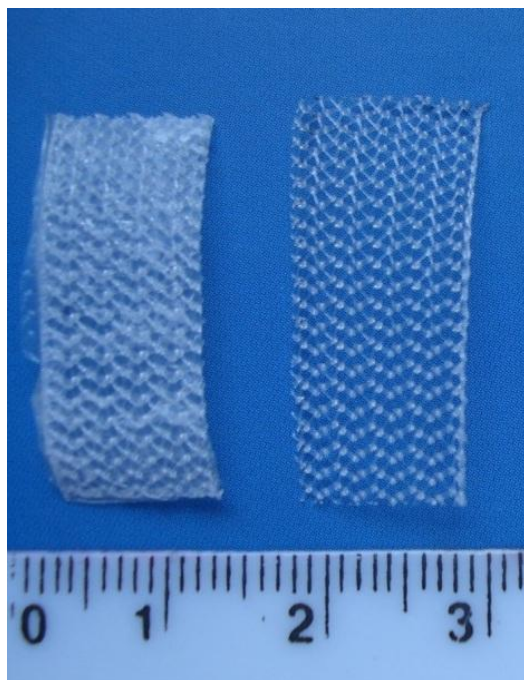


Figura 1. Telas de polipropileno monofilamentar tipo I com o revestimento de colágeno (PLP+C) e “in natura” (PLP) - visão macroscópica - Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2.

As telas foram preparadas no Laboratório de Biologia do Colágeno tipo I e II e Laboratório de Anisotropias Ópticas de Biopolímero do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

Como descrito anteriormente o gel de colágeno utilizado para o recobrimento das telas neste estudo era proveniente de tendão bovino tratado

através de técnica de alta purificação. A tela de polipropileno (PLP) foi embebida em gel de colágeno Tipo I de forma que suas duas faces fossem cobertas e este complexo foi posto a secar (Figura 2).

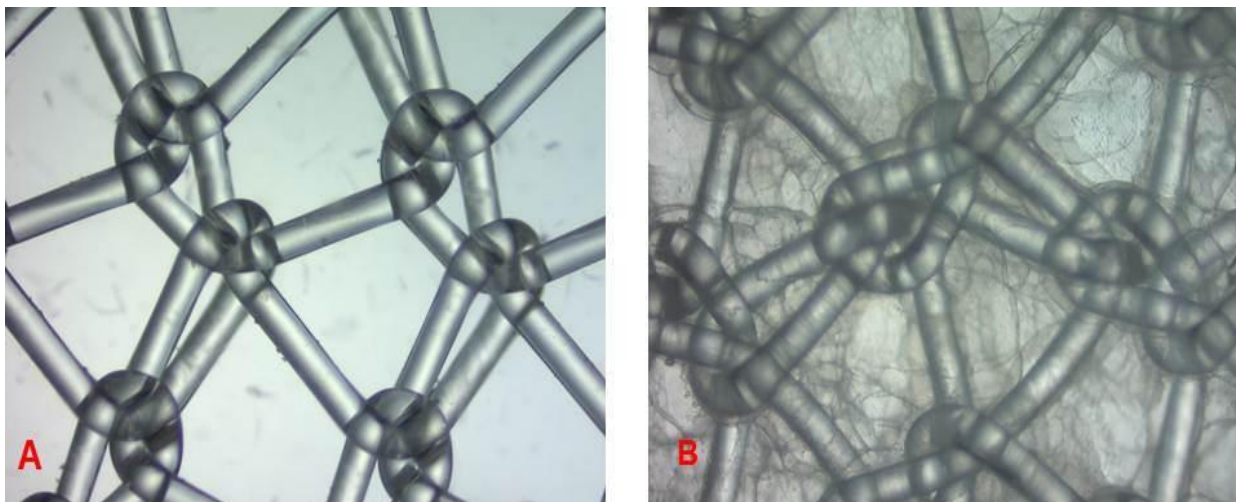


Figura 2. Tela de polipropileno: A – Sem Revestimento (PLP) e B- Revestida com colágeno (PLP+C). Microscopia óptica, 4 X 0,65 - “Primo Star” (Carl Zeiss)

Todo o material a ser implantando foi acondicionado em envelopes plásticos individuais, próprios de esterilização que foi realizada através do método de irradiação com raios gama na dose de 25 kGy, (Companhia Brasileira de Esterilização – Relatório Técnico 0092.09 – Anexo 2) com o objetivo de preservar a estabilidade estrutural das moléculas (51). Nenhuma forma de antibioticoprofilaxia foi utilizada.

3.3. Amostra

A amostra foi composta por 40 ratas fêmeas da raça Wistar, sendo 20 delas destinadas para o estudo histológico e as outras 20 para o estudo biomecânico. Os animais foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - Unicamp) com peso entre variando entre 240 gramas e 305 gramas, e com 12 semanas de idade, período este em que os animais já são considerados adultos (54).

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 espécie. Em seguida, foram transferidos para o Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Universidade Estadual de Campinas, onde foram alojados em gaiolas contendo cinco animais cada sob condições semelhantes de alimentação, temperatura, umidade e luz.

3.4. Procedimento Cirúrgico

- 1º) Jejum pré-operatório com restrição alimentar a sólidos por quatro horas antes da cirurgia;
- 2º) Anestesia com Pentobarbital Sódico 3% (Hypnol®), administrado através de punção da veia caudal com *scalp* 23G, em dose correspondente a 0,15

mg/g de peso. Manutenção do nível anestésico com administração complementar de 0,05 a 0,10 mg/g de peso, segundo a necessidade;

- 3º) 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;
- 4º) Realizada incisão transversa, de 2 cm na região inferior do abdome, com divulsão cuidadosa do subcutâneo, até exposição da fáscia da musculatura abdominal com atenção especial a preservação da linha Alba;
- 5º) As telas foram implantadas de forma padronizada em cada lado da parede abdominal do animal: As telas do Grupo I (PLP) o lado esquerdo da parede abdominal e as telas do Grupo II (PLP+C) do lado direito, ficando separadas pela linha alba na interface entre a hipoderme e a fáscia anterior da musculatura abdominal (Figura 3). Nenhuma forma de fixação das telas foi empregada. A seguir, a incisão foi suturada por planos, com pontos separados de fio absorvível (Dexon II® - Ácido poliglicólico + policaprolato - Davis-Geck©) 2-0 (dois zero).



Figura 3. *Implante das telas - Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2;*

6º) Após o despertar, os animais foram transferidos para a gaiola de recuperação anestésica. A analgesia pós-operatória foi realizada com Paracetamol 100 mg/kg por via oral a cada quatro horas, durante 12 horas (55).

3.5. Coleta dos espécimes

Os 40 animais foram divididos em quatro subgrupos, cada qual com dez animais, de acordo com o tempo decorrido até a eutanásia, conforme descrito a seguir:

Subgrupo 1: 10 ratas eutanasiadas 07 dias após o implante das telas.

Subgrupo 2: 10 ratas eutanasiadas 14 dias após o implante das telas.

Subgrupo 3: 10 ratas eutanasiadas 90 dias após o implante das telas.

Subgrupo 4: 10 ratas eutanasiadas 180 dias após o implante das telas.

Ressalta-se que em cada subgrupo cinco ratas eram destinadas para o estudo histológico e as cinco restantes para o estudo biomecânico. As ratas foram eutanasiadas com dose letal de Pentobarbital Sódico 3% (Hypnol®) administrado através de punção da veia caudal com *scalp* 23G e posicionadas em decúbito dorsal horizontal seguida de tricotomia abdominal e demarcação da área a ser removida com molde especialmente desenhado que permitia a retirada simétrica das amostras (20 mm X 50 mm). A seguir, foi realizada incisão mediana, separando os lados direito e esquerdo do abdome, com a retirada em bloco da parede abdominal, de maneira a preservar as relações

anatômicas entre epiderme, derme, tecido subcutâneo, musculatura abdominal e peritônio, contendo os respectivos implantes. Na análise macroscópica, realizada durante o procedimento, não se evidenciou nenhum sinal de eritema, necrose, edema e coleções (Figura 4).

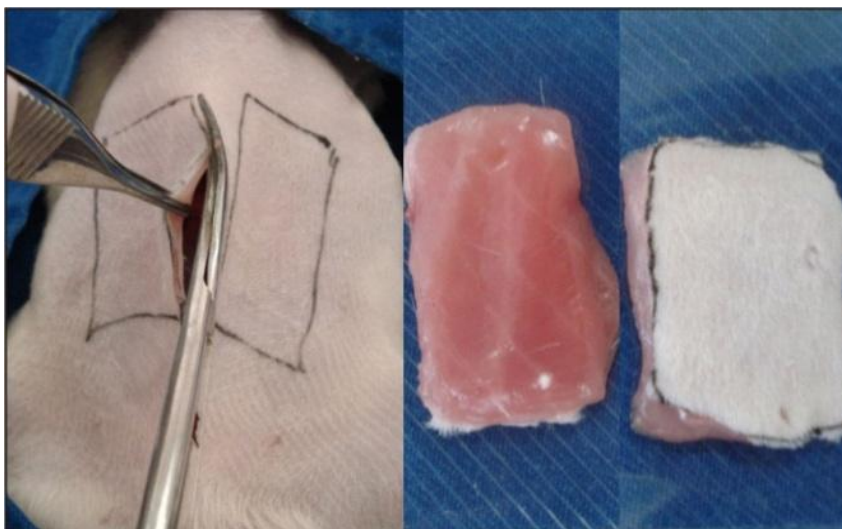


Figura 4. Retirada dos espécimes. Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2;

3.5.1. Preparo das amostras para o estudo biomecânico

A avaliação da resistência tênsil foi realizada no fragmento isolado da parede abdominal das 20 ratas destinadas para este fim, cinco em cada subgrupo. Os testes foram realizados imediatamente após a eutanásia dos animais e coleta dos blocos, sem necessidade de conservação.

3.5.2. Preparo das amostras para o estudo histológico

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 em sistema de vácuo, com o objetivo de remover o ar que porventura estivesse ocupando o tecido, visando melhorar as condições para a avaliação histológica. 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. Cada caixeta foi identificada com a especificação do tipo de material (Grupo I - Tela sem gel - PLP e Grupo II - Tela com gel de colágeno - PLP+C) e do tempo de eutanásia (7, 30, 90 ou 180 dias).

Os blocos de parafina produzidos foram utilizados para confecção de lâminas. Os cortes histológicos foram realizados com 5µm de espessura para possibilitar a adequada análise histológica e avaliação das propriedades anisotrópicas. Em cada lâmina foram dispostas quatro peças do material, cada qual composto por pele, tecido subcutâneo, tela de polipropileno, fâscia abdominal, musculatura abdominal e peritônio parietal, assim em cada lâmina

quatro cortes foram analisados. Um conjunto de composto de 40 lâminas (dois de cada animal sendo, respectivamente PLP e PLP+C totalizando dez de cada subgrupo: 7, 14, 90 e 180 dias) foi corado com Hematoxilina-Eosina (HE). A preparação dos blocos, confecção das lâminas e coloração com HE foi realizada no Laboratório de Biomateriais do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas. Três outros conjuntos também composto de 40 lâminas cada, foram enviados ao Laboratório de Biologia do Colágeno tipo I e II e Laboratório de Anisotropias Ópticas de Biopolímero do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a análise da birrefringência tecidual sendo um corado com nitrato de prata, outro com tricômico de Masson e o terceiro analisado sem coloração.

3.6. Avaliação Biomecânica

Os blocos (parede abdominal dos animais), denominados, na Física, “corpo de prova”, foram preparados em bancada mantendo-se 2 mm da extremidade proximal das telas expostas para fixação na presilha superior do tensiômetro (Máquina Universal de Ensaio – LLOYD Instruments, modelo TA 500, Bognor Regis, Reino Unido), especialmente destinado a testes de cargas em tecidos suaves (56). A porção distal da parede abdominal, livre da tela (contendo apenas os tecidos do animal), foi fixada na presilha inferior do tensiômetro para realização do estudo biomecânico. O sistema de ancoragem adotado foram presilhas metálicas com formato sinusoidal na sua face interna,

associado as ranhuras no seu interior, que permitiu fixação adequada ao sistema, evitando o desprendimento do corpo de prova durante os testes (Figura 5) (57).

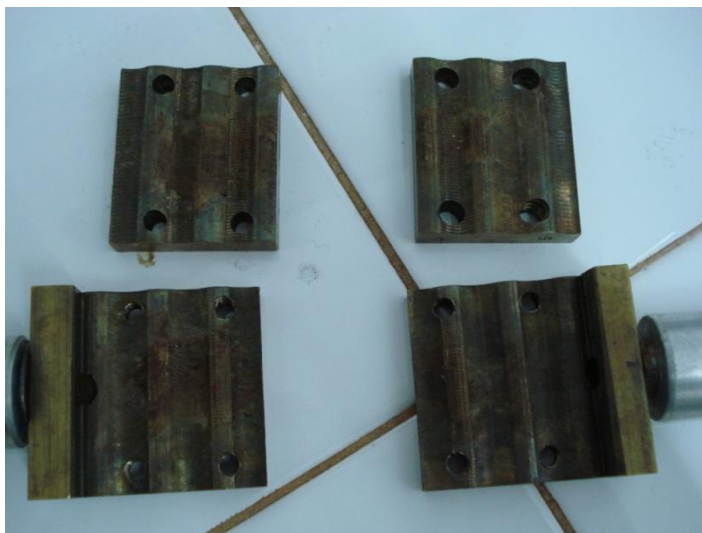


Figura 5. Sistema de ancoragem (presilhas) utilizado nos ensaios biomecânicos. Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2

A fixação do corpo de prova às presilhas metálicas foi feita através de parafusos. Cada presilha possuía 04 parafusos dispostos nos cantos. Os parafusos foram ajustados com um torque médio de 2,5 N.mm (torquímetro de estalo tipo AVT 100, marca Bristol). Foi utilizado um paquímetro digital, marca Digimess, de 150 mm, com precisão de 0,05 mm para medir o comprimento do corpo de prova. O comprimento inicial médio adotado foi de 25 mm, considerado aquele medido entre as presilhas.

A Máquina Universal de Ensaio (MUE) utilizada neste experimento possui célula de carga de 500 N e resolução de 0,01% (Figura 6).

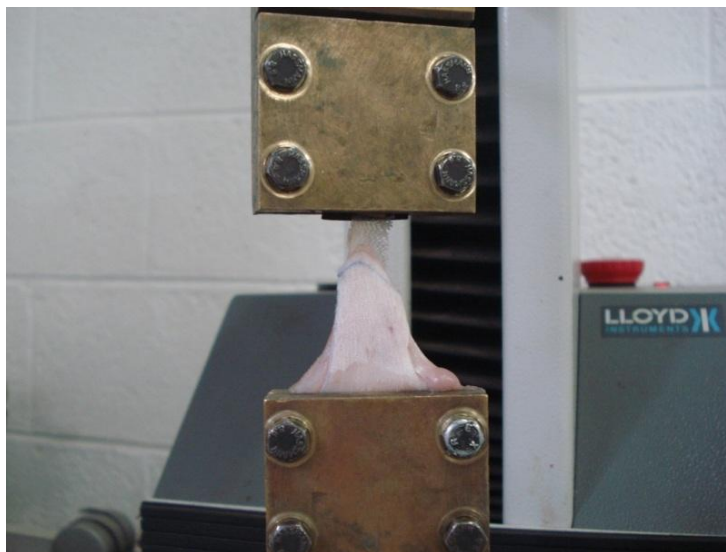


Figura 6. *Teste de Tração: Tensiômetro LLOYD TA 500, com corpo de prova (bloco) fixado as presilhas - Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2.*

O sistema está acoplado a um computador Pentium Pro®, com 64 MB de memória RAM. A aquisição automática dos dados foi realizada utilizando o “software” Nexygen 3.0. Este “software” gera arquivos no formato texto (.txt) que são exportados para o programa Excel do pacote Office da Microsoft® (Excel 2003). Este programa realiza, também, a conversão das mensurações para arquivo do tipo planilha de dados (.xls).

Os corpos de prova foram, então, submetidos ao teste de tração, no qual, após o tensiômetro ser acionado, a presilha superior, onde estava fixada a tela, deslocava-se no sentido cranial com força crescente (N) e velocidade constante (2 mm/seg) até que a mesma se desprendesse da interface tecidual.

Cada teste resultava em um gráfico (Figura 7) que, automaticamente extraia os resultados das seguintes variáveis para o estudo

comparativo pareado: carga máxima (N); deflexão até a carga máxima (mm); trabalho até a carga máxima (J); consistência do material (N/m); carga no desprendimento da tela (N); deflexão até o desprendimento da tela (mm); trabalho até o desprendimento da tela (J).

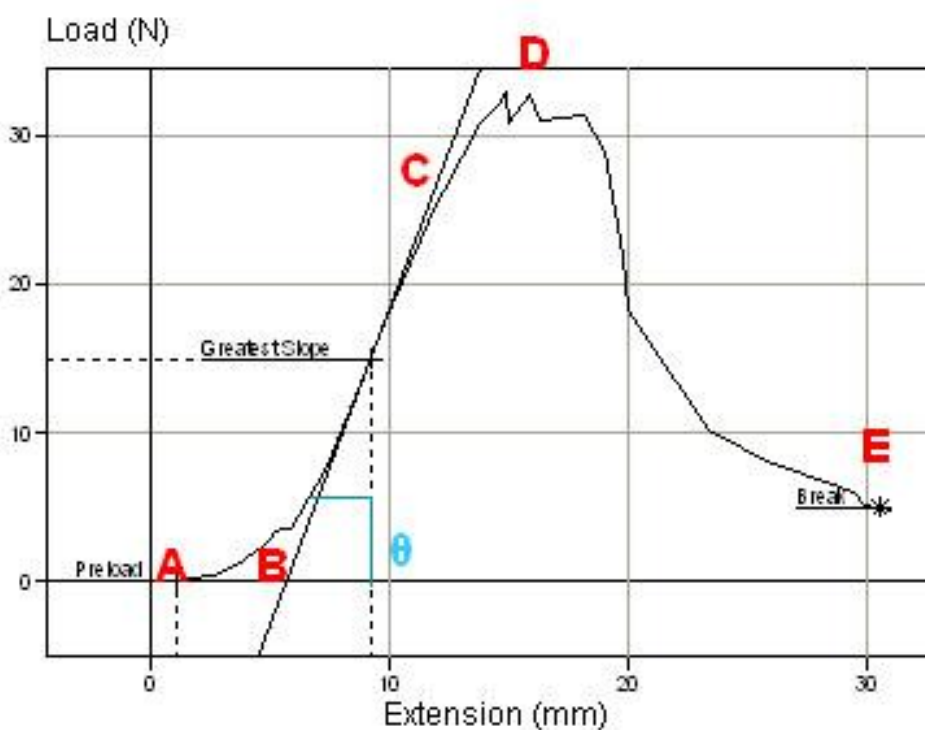


Figura 7. Gráfico característico: Carga “versus” Deslocamento, resultante de cada teste.

A-B: Região de assentamento

B-C: Aumento linear de carga

C-D: Região de encruamento (aumento não linear de carga)

D: Pico de Carga

E: Ruptura (desprendimento da tela da interface tecidual)

Ponto E, no eixo Y: Carga no momento do desprendimento da tela.

No gráfico, as variáveis empregadas são representadas da seguinte forma:

Carga máxima: Ponto D (pico de carga)

Carga na ruptura: Ponto E, no eixo Y

Deflexão até a carga máxima: Extensão A-D, no eixo X

Deflexão até o desprendimento da tela (ou deflexão total): Extensão A-E, no eixo X

Trabalho até a carga máxima: Área sob a curva A-D

Trabalho até o desprendimento da tela (trabalho total): Área sob a curva A-E

Consistência do material (ou módulo de elasticidade): Tangente do ângulo θ

Em testes de tração observa-se comportamento comum entre as diferentes curvas Força “*versus*” Deslocamento, geradas pela resposta mecânica dos espécimes. “No começo da curva, há uma região horizontal (A–B) denominada “região de assentamento” na qual o espécime não é completamente responsivo à carga. Uma vez que o corpo de prova é engrenado, gerando resistência à tração, inicia-se seu estiramento, originando uma região quase linear (B–C) com o aumento da carga aplicada. A consistência do material (ou módulo de elasticidade) é determinada calculando-se a tangente do ângulo “ θ ” da inclinação originada desta região linear. Posteriormente, observa-se a transição do comportamento linear para não linear (C–D), denominada “região de encruamento”, que representa a alteração do padrão de resistência do material, resultante da “fratura” de seus

componentes, quando deformado a frio. Finalmente encontra-se o pico de carga (D), que é o ponto, no qual ocorre o dano significativo e irreversível do material. O deslocamento (estiramento) do ponto A para o ponto D representa a extensão (ou deflexão) até o pico de carga. O material só é parcialmente danificado até o pico de carga, porém, sua resistência diminui com o dano sofrido. Deste ponto em diante, a força necessária para a ruptura, ou quebra, do material (no caso, o desprendimento da tela da interface tecidual), gradativamente diminui, até quando a separação completa ocorre no ponto E. O trabalho, ou energia liberada até a carga máxima, é calculado pela área sob a curva A-D e o trabalho até o desprendimento da tela da interface tecidual, ou trabalho total, é representado pela área sob a curva A-E.

No presente estudo estamos lidando com um corpo de prova (parede abdominal da rata) híbrido, constituído de tela de material sintético e tecidos vivos que podem apresentar características variáveis, então optamos por analisar somente a variável carga máxima para determinar a aderência da tela aos tecidos circunvizinhos.

Metodologia Estatística

Análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis contínuas.

Para comparação das medidas entre tipos de recobrimento e tempos foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos. O teste de Tukey foi empregado para as comparações múltiplas. Apresentação gráfica através de *box-plot*.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

3.7. Avaliação Histológica

3.7.1. Análise Anatomopatológica

A avaliação microscópica foi realizada empregando-se um Microscópio Zeiss Primo Star® (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) com a aquisição das imagens por meio de uma câmera Zeiss AxioCam Icc 1®. As imagens eram processadas e armazenadas com o auxílio do Software AxioVision V 4.8.0.0 (Carl Zeiss Imaging Solutions®).

O estudo microscópico tinha por objetivo avaliar a presença de: infiltrado inflamatório agudo (neutrófilico), crônico e granulomatoso. As amostras também foram analisadas quanto à presença de formação de tecido de granulação e reação de corpo estranho. O processo inflamatório foi classificado, semi-quantitativamente quanto à sua intensidade, em: ausente; leve; moderado ou intenso. Essa classificação foi realizada considerando-se os critérios a seguir (21,58):

- (0) Ausente: mínima reação observada, até no máximo 5% da área do corte.
- (1) Leve: a reação encontrada envolvia entre 5% e 25% do corte.
- (2) Moderada: comprometimento de 25% a 70% do corte.
- (3) Intensa: área do corte comprometida superior a 70%.

Os parâmetros adotados nesta análise de acordo com Kumar et al. , foram (59):

1. Inflamação aguda: Presença de grupamentos de neutrófilos (supuração).

- 2. Inflamação crônica:** Presença de macrófagos, linfócitos e histiócitos.
- 3. Tecido de granulação:** Proliferação fibroblástica jovem e neoformação vascular, excluindo-se o infiltrado linfomonocitário.
- 4. Inflamação granulomatosa:** Presença de grupamentos de células epitelióides circundadas por linfócitos e com células gigantes.
- 5. Reação de corpo estranho:** Baseada na formação de granulomas e presença de células gigantes do tipo corpo estranho.

Todas as lâminas foram observadas pelo mesmo pesquisador, um médico patologista experiente e também analisadas interobservadores. A fim de classificar as nuances entre os grupos (com e sem colágeno), todas as lâminas tiveram os seus quatro cortes avaliados em sua totalidade. Para tanto, inicialmente, todas as lâminas foram numeradas, sequencialmente, por uma funcionária do NMCE, para que o pesquisador não tivesse informações sobre qual rata, grupo e data da eutanásia que estava sendo analisada. Ao final da avaliação, a funcionária do NMCE entregou aos pesquisadores uma lista que relacionava os números das lâminas com sua identificação inicial (animal, tipo de tela e tempo de eutanásia), para que fosse realizada a análise estatística.

Todos os dados foram tabulados em planilhas Microsoft Excel 2010®.

Metodologia estatística:

Para descrever o perfil da amostra segundo as variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas ordinais

(inflamação aguda, inflamação crônica, tecido de granulação, reação de corpo estranho e formação de granuloma), com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), em cada grupo (com e sem colágeno) e em cada tempo de avaliação.

Para comparar as medidas longitudinais entre as situações PLP (sem colágeno) e PLP+C (com colágeno) e os tempos sete dias (n=5), 14 dias (n=5), 90 dias (n=5) e 180 dias (n=5) foi utilizada a análise de variância para medidas repetidas (*ANOVA for repeated measures*), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey para comparar os quatro tempos em cada situação, e o teste de perfil por contrastes para analisar as duas situações, em cada tempo. As variáveis foram transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição Normal e por serem consideradas em escala ordinal (ausente, leve, moderada e intensa).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

3.7.2. Análise das Propriedades Ópticas Anisotrópicas

Os tecidos podem ser visualizados macroscopicamente e microscopicamente porque interagem com a luz. Isto decorre da capacidade de absorção e refração da onda luminosa. Esta propriedade de absorção e a refração que os tecidos apresentam criam situações conhecidas como anisotropias, as quais possibilitam estudos de características físico-químicas,

celulares e teciduais, através da microscopia de luz polarizada com ou sem o auxílio de colorações específicas (42,60,61,62,63).

De acordo com Houaiss 2009, anisotropia (do grego: *An* = negação, *isso* = igual; *tropos* = direção) é definida como a característica peculiar de uma substância em que uma ou mais de suas propriedades dependem da direção em que são observadas num determinado meio, ou seja, é a característica que essa substância possui em que certa propriedade física varia com a direção (64).

A microscopia de polarização é um método que traz informações importantes sobre a ultraestrutura e a organização molecular de células e tecidos, e que, quando quantificada (birrefringência) atinge níveis elevados de precisão, permitindo a determinação estatística exata da ordem molecular e da direção da vibração e de variações no estado de agregação molecular. A determinação das anisotropias ópticas (birrefringência e dicroísmo) em preparados biológicos permite interpretações das propriedades físico-químicas e características funcionais das estruturas em estudo (40,41,65,66,67). Com isso, a birrefringência é um método acurado para detectar e medir a ordem molecular e o arranjo das fibras colágenas (65).

A análise de propriedades ópticas anisotrópicas das estruturas baseadas em colágeno é um excelente método para determinação da ordem molecular nos estudos de estrutura e função da matriz extracelular (41,42,68,69).

As fibras colágenas têm uma organização planar, em forma de ondas. Por isso a microscopia de luz polarizada é, geralmente, o método mais

apropriado para descrever e interpretar a organização supramolecular deste tipo de estrutura (65).

A microscopia de polarização, como o nome já demonstra, é um método de microscopia que utiliza polarizadores, localizados um acima das objetivas (chamado de analisador) e outro imediatamente abaixo do condensador (polarizador), e sua óptica tem cristais isentos de tensão (67).

A birrefringência é adquirida através da diferença de índices de refração do objeto, o que significa que num corpo birrefringente, a propagação da luz ocorre com velocidades diferentes em direções diferentes, ou seja, duas direções de propagação com um índice de refração para cada uma delas. Esta alteração de propagação provoca um brilho característico à microscopia (70). A birrefringência é expressa matematicamente pela equação:

$$B = n_e - n_o$$

Onde n_e é o índice de refração na direção de propagação do raio extraordinário e n_o o índice de refração na direção do raio ordinário. O raio ordinário obedece as leis de refração $n_o = \sin(i) / \sin(r)$, enquanto o extraordinário não segue as leis de refração e é perpendicular àquele (71).

Quando a luz polarizada penetra no corpo birrefringente, propaga-se em dois caminhos ópticos diferentes:

1. raio ordinário = $n_o \times e$

2. raio extraordinário = $n_e \times e$

e: espessura do espécime em estudo

O brilho exibido pelo objeto decorre da diferença de caminho óptico ou retardo óptico (RO), que é representado pela equação (72,73).

$$RO = S \cdot \frac{e^2}{2\epsilon_0 m \omega^2} = S \times 2.510^{-15}$$

Onde:

S: número de ligações peptídicas/cm²;

e: carga do elétron

m: massa do elétron

ϵ_0 : permissividade (constante dielétrica) do espaço;

ω_0 : ressonância da frequência deste oscilador eletrônico

O corpo birrefringente colocado entre polarizadores deverá exibir brilho máximo quando um dos seus eixos de propagação for colocado a 45 graus dos dois polarizadores. As nuances dos corpos podem ser demonstradas com o auxílio de compensadores, como o de Sénarmont, acoplado ao fotomicroscópio. O compensador tem como objetivo destacar o contraste entre as estruturas analisadas, ou seja, a diferença de iluminação entre amostras e os arredores ou o plano de fundo. As variações nos caminhos ópticos dos raios desviados são ajustadas para dar um contraste com impressão de imagem tridimensional (42) (Figuras 8 e 9).



Figura 8. Microscópio de Polarização Olympus BX51, em detalhe, setas vermelhas.
(A) Polarizador; (B) Analizador; (C) Compensador de Sénarmont

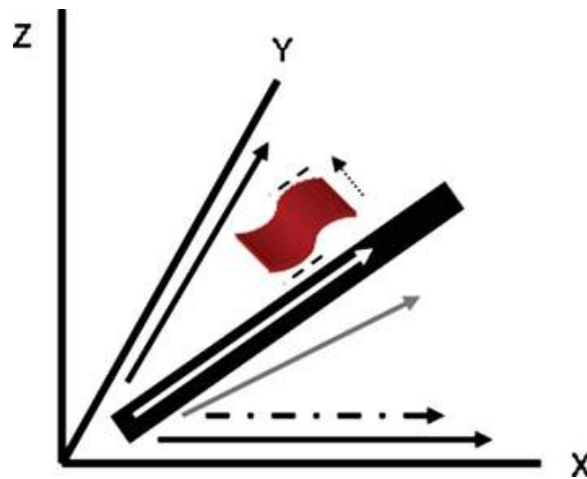


Figura 9. Desenho Esquemático representando a intensidade de birrefringência. AN (analizador) direção de vibração do analisador (eixo Y) é perpendicular ao POL (polarizador). POL, direção de vibração do polarizador no eixo X. Eixo z é o brilho de birrefringência correspondente para valores de retardo óptico (RO). A seta branca em um fundo preto representa uma estrutura birrefringente homogênea. Neste caso, uma fibra hipotética com paralelismo interno é composta por macromoléculas totalmente orientada em 45° em relação aos polarizadores cruzados, que resulta no brilho máximo. Se o eixo longo do objeto é posicionado paralelo a um dos polarizadores nenhuma birrefringência seria exibida (extinção da birrefringência), aqui representada por duas setas pretas finas. A seta com uma linha tracejada representa um objeto no qual há uma diferente orientação interna das fibras com relação aos polarizadores. Os segmentos negros representam fibras paralelas ao POL e os espaços em branco e pontos representam fibras com outras orientações (por exemplo, ondulação). A seta fina cinza representa um objeto birrefringente com outra orientação ao cruzamento dos polarizadores (por exemplo, 30°). O desenho ondulado vermelho mostra diferentes nuances de brilho de acordo com a orientação estrutural das fibras de aqui considerados com relação aos polarizadores cruzados. A pequena seta fina e as duas linhas quebradas representam fibras a 45° em relação aos polarizadores. Informações tridimensionais do objeto em estudo podem ser obtidas a partir desses parâmetros. Adaptado de Vidal, 2010 (42).

Quando estas direções são paralelas ao analisador ou polarizador, as imagens birrefringentes desaparecem, e o objeto se torna negro. Quando isto não acontece, o brilho permanecerá em alguns setores do objeto (74).

O colágeno (biopolímero) possui dois tipos de birrefringência, a intrínseca ou birrefringência cristalina que é secundária à ligações químicas nos microcorpos e a birrefringência de forma ou textural (67).

A birrefringência intrínseca é uma anisotropia óptica resultante de um alinhamento assimétrico das ligações químicas ou moléculas dentro de um meio de transmissão, independente do índice refrativo do meio de imersão (67).

A birrefringência de forma é uma anisotropia óptica revelada por corpos mistos, isto é composto, nos quais partículas assimétricas de um dado índice refrativo estão dispersas com orientação preferencial em meios de índices refrativos diferentes. A birrefringência de forma é variável em função da supraorganização dos diferentes tecidos (67).

Feixes colágenos embebidos em água têm apresentado retardo óptico (RO) mais elevado, resultante da soma da birrefringência de forma com a intrínseca. A demonstração da birrefringência, avaliada em termos de RO, estuda as peculiaridades estruturais dos tecidos, e se correlaciona com suas funções biomecânicas (67;75).

Em cortes histológicos corados com nitrato de prata, tricômico de Masson e cortes não corados, foi pesquisada a morfologia, geometria e distribuição textural de feixes de fibras colágenas. Esta quantificação foi realizada através do retardo óptico correspondente somente nas lâminas não coradas.

O retardo óptico é medido pelo brilho da birrefringência, através da análise das imagens. Nestas imagens, as medidas dos retardos ópticos correspondem aos valores de birrefringência, expressos em pixels (42).

As medidas da birrefringência foram realizadas no Laboratório de Biologia do Colágeno tipo I e II e Laboratório de Anisotropias Ópticas de Biopolímero do Departamento de Anatomia, Biologia Celular e Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp por um único examinador. Utilizou-se um Microscópio de Polarização Olympus BX51 (Olympus, Tokyo-Japan). As imagens foram analisadas em um Software Image Pro-Plus 6.0 System (Mediacybernetics, Inc; Bethesda, MD-USA) acoplado ao fotomicroscópio (aparelho que capta imagem). Este equipamento possui uma lente Neofluar, com objetiva de amplificação (40/1-2,5) para analisar as fibras colágenas.

A birrefringência apareceu visualmente como brilho. Este fenômeno foi avaliado como tal com o analisador de imagem e expresso em valores em *Gray Average* (GA) ou média de cinza, considerados em pixel. Os parâmetros analisados foram área, *Gray Average* e desvio-padrão. Os tons de brilho

estavam entre 50 e 255 pixel de níveis de cinza, onde 255 corresponderam aos valores máximos de brilho (42).

As observações foram sempre iniciadas pelo posicionamento do maior eixo da fibra (colágena) a 45 graus do azimute do vetor elétrico da luz polarizada. Em seguida foram selecionadas as áreas com melhor definição das fibras. Cada corte foi analisado em pelo menos seis pontos. Todas as etapas foram realizadas pelo mesmo examinador.

Metodologia estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software Minitab. Os resultados obtidos nos dois grupos foram analisados através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 0,05.

4. Resultados

Não houve óbito entre os animais. Durante o período de observação, não foram verificados sinais sugestivos de comprometimento sistêmico ou complicações relacionadas, especificamente, com o procedimento realizado. Nenhum animal apresentou extrusão de algum dos fragmentos de tela de polipropileno que foram implantados.

4.1. Estudo Biomecânico

Previamente ao implante das telas nos animais, foi realizado um estudo biomecânico comparativo entre as telas dos grupos I (PLP) e II (PLP+C) a fim de se identificar se o recobrimento da mesma com o gel de colágeno alterava, de alguma forma, as características originais da tela. Cinco fragmentos de tela de polipropileno monofilamentar com as mesmas medidas das telas implantadas (20 x 10 mm) sem o gel de colágeno e com o gel foram submetidos a testes de tração na mesma máquina universal de ensaios usada neste experimento e analisadas as variáveis normalmente aferidas por esse tensiômetro: carga máxima (N); deflexão até a carga máxima (mm); trabalho até a carga máxima (J); consistência do material (N/m); carga no desprendimento

da tela (N); deflexão até o desprendimento da tela (mm); trabalho até o desprendimento da tela (J) (Figura10)



Figura 10. Testes de tração realizados com as telas, previamente ao implante. Sony DSC W 70, lentes 2,8-5.2

Obtido os resultados se aplicou *Mann Whitney Rank Sum Test* sendo considerado o nível de significância para os testes estatísticos de 5% ($p < 0,05$). Foi observado que não houve diferença significativa entre os grupos quanto as variáveis analisadas, ou seja o gel de colágeno aplicado a tela de polipropileno monofilamentar não alterou suas características físicas (Tabela 1) (Anexo 3).

Tabela 1: Valores comparativos obtidos com os testes de tração das telas de polipropileno sem o gel (PLP) e as telas com o gel de colágeno (PLP+C) e os respectivos índices de significância

Variável	PLP+C (n=5)	PLP (n=5)	“p”
	Mediana	Mediana	
Carga Máxima (CM) - (N)	35,8796	35,1931	0,5476
Deflexão até a CM (mm)	37,3747	38,0395	1
Trabalho até a CM (J)	0,573648	0,523848	0,4206
Consistência Material (N/m)	2632,44	2486,11	0,4206
Carga na ruptura (J)	6,47565	6,46575	0,5476
Deflexão até a ruptura (mm)	42,4758	42,5649	1
Trabalho até a ruptura (J)	0,618375	0,671221	0,4206

Como relatado anteriormente, objetivando analisar a aderência das telas (PLP e PLP+C) aos tecidos optou-se por comparar os valores de Carga Máxima (pico de força) obtidos, medida em Newtons (N), necessária para o desprendimento da tela da interface tecidual. As outras variáveis obtidas automaticamente pelos testes de tração não foram objetos de estudo, pois o corpo de prova (parede abdominal da rata + telas) era híbrido, ou seja, constituído de tela de material sintético e tecidos vivos que individualmente apresentam propriedades biomecânicas completamente diferentes. Os resultados foram organizados em uma tabela e, em seguida, estudou-se a sua distribuição com base na dispersão das medidas colhidas.

Ao comparar os valores máximo, mínimo, média, mediana e desvio padrão de carga máxima encontradas observou-se que, nas telas com gel de

colágeno (PLP+C), esses valores foram estatisticamente superiores aos encontrados nas telas sem o mesmo (Tabela 2).

Tabela 2. Estudo de tração. Carga máxima até o desprendimento das telas (valores expressos em Newtons – N). PLP: Tela de polipropileno e PLP+C: Tela de polipropileno recoberta com colágeno

Tempo	N	Material	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
7 dias	5	PLP+C	12,0795	0,8810	10,8616	12,1706	13,3222	0,0016
		PLP	9,6950	1,4776	8,1491	9,5881	11,7801	
14 dias	5	PLP+C	18,7722	0,7952	17,7319	18,9096	19,8610	0,0039
		PLP	15,9511	0,8936	14,8967	16,3159	16,9812	
90 dias	5	PLP+C	25,1555	1,4160	23,2444	25,1208	27,1245	0,0009
		PLP	22,1051	1,1237	20,9872	21,8365	23,8965	
180 dias	5	PLP+C	25,1087	1,3264	23,2059	25,4970	26,5748	0,0029
		PLP	22,6415	1,0255	21,1931	22,6759	23,8691	

O perfil da amostra segundo a variável, carga máxima apresentada (Figura 11) demonstrou que houve diferença estatística significativa entre os grupos e os tempos analisados.

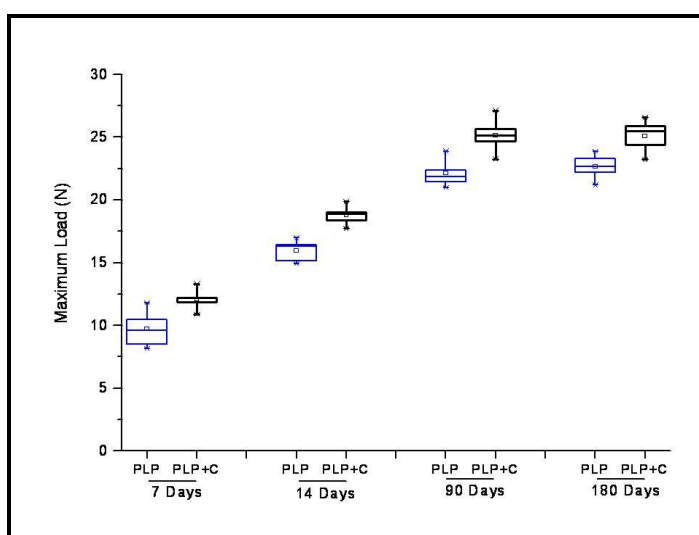


Figura 11. Representação gráfica da amostra (carga máxima no momento do desprendimento da tela “Maximum Load”)

4.2. Estudo Histológico

Macroscopia

Durante a observação macroscópica dos cortes histológicos não foram detectadas diferenças entre o grupo submetido ao implante de tela com colágeno (PLP+C) e o grupo exposto à tela de polipropileno sem o colágeno (PLP). Os *specimes* (parede abdominal contendo as telas) encontravam-se íntegros, com aspecto normal em todos os animais.

4.2.1. Estudo Anatomopatológico

As observações referentes ao estudo anatomopatológico encontram-se relacionadas no Anexo 4.

As estatísticas descritivas das variáveis coletadas para caracterização dos 2 grupos (Grupo I = PLP - Tela de polipropileno sem colágeno e Grupo II = PLP+C - Tela de polipropileno com colágeno) em cada tempo (7, 14, 90 e 180 dias), são apresentadas a seguir (Tabela 3).

Tabela 3. Estatísticas descritivas das variáveis de cada grupo. Para cada variável a linha superior representa o número de observações (n) e a linha inferior sua porcentagem correspondente (%).

	Grupo I = PLP					Grupo II = PLP+C					Grupo I = PLP					Grupo II = PLP+C				
	INFLAMAÇÃO CRÔNICA										TECIDO DE GRANULAÇÃO									
Dias	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total
Ausente	0	0	4	5	9	0	0	4	5	9	0	0	4	5	9	0	0	4	5	9
	0	0	80	100		0	0	80	100		0	0	80	100		0	0	80	100	
Leve	0	0	1	0	1	0	5	1	0	6	0	0	1	0	1	0	5	1	0	6
	0	0	20	0		0	100	20	0		0	0	20	0		0	100	20	0	
Moderada	0	4	0	0	4	4	0	0	00	4	0	4	0	0	4	5	0	0	0	5
	0	80	0	0		80	0	0			0	80	0	0		100	0	0	0	
Intensa	5	1	0	0	6	1	0	0	0	1	5	1	0	0	6	0	0	0	0	0
	100	20	0	0		20	0	0	0		100	20	0	0		0	0	0	0	
Total	5	5	5	5	20	5	5	5	5	20	5	5	5	5	20	5	5	5	5	20

	REAÇÃO CORPO ESTRANHO										FORMAÇÃO DE GRANULOMA									
Dias	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total
Ausente	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
Leve	0	0	5	5	10	4	5	5	5	19	0	4	5	5	14	4	4	5	5	18
	0	0	100	100		80	100	100	100		0	80	100	100		80	80	100	100	
Moderada	5	5	0	0	10	1	0	0	0	1	4	1	0	0	5	1	1	0	0	2
	100	100	0	0		20	0	0	0		80	20	0	0		20	20	0	0	
Intensa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	0	0	0	0		0	0	0	0		20	0	0	0		0	0	0	0	
Total	5	5	5	5	20	5	5	5	5	20	5	5	5	5	0	5	5	5	5	20

	INFLAMAÇÃO AGUDA									
Dias	7	14	90	180	Total	7	14	90	180	Total
Ausente	1	1	5	5	12	5	5	5	5	20
	20	20	100	100		100	100	100	100	
Leve	4	4	0	0	8	0	0	0	0	0
	80	80	0	0		0	0	0	0	
Moderada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0		0	0	0	0	
Intensa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0		0	0	0	0	
Total	5	5	5	5	20	5	5	5	5	20

As análises comparativas das variáveis ordinais entre os 2 grupos (Grupo I = PLP - Tela de polipropileno sem colágeno e Grupo II = PLP+C - Tela de polipropileno com colágeno) no mesmo animal e entre os 4 tempos (7, 14, 90 e 180 dias) em animais diferentes. Pelos resultados, verifica-se diferença

significativa entre os grupos e entre os tempos, com efeito significativo da interação grupos vs tempos para todos os parâmetros. Esses dados poder ser visualizados a seguir (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados das ANOVAs para medidas repetidas para comparação das variáveis entre grupos e tempos

Variáveis*	Comparação entre Tempos (7, 14, 90 e 180 dias)	Comparação entre Grupos (PLP vs PLP+C)	Interação Grupos vs Tempos
Inflamação aguda	p<0,001^b	p<0,001^b	p<0,001^b
Inflamação crônica	p<0,001^a	p=0,004^a	p=0,026^a
Tecido de granulação	p<0,001^a	p=0,001^a	p=0,008^a
Reação de corpo estranho	p<0,001^b	p<0,001^b	p<0,001^b
Formação de granuloma	p=0,002^c	p=0,029^c	p=0,004^c

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

(a) Efeito significativo da interação Grupo vs Tempo: diferenças significativas entre tempos (teste de Tukey): 7≠(14, 90 e 180), 14≠(90 e 180) para PLP; 7≠(14, 90 e 180), 14≠(90 e 180) para PLP+C; diferenças significativas entre grupos (teste de contraste): 7 dias (PLP ≠ PLP+C); 14 dias (PLP ≠ PLP+C); 90 dias (nenhuma diferença significativa); 180 dias (nenhuma diferença significativa).

(b) Efeito significativo da interação Grupo vs Tempo: diferenças significativas entre tempos (teste de Tukey): 7≠(90 e 180), 14≠(90 e 180) para PLP; diferenças significativas entre grupos (teste de contraste): 7 dias (PLP ≠ PLP+C); 14 dias (PLP ≠ PLP+C); 90 dias (nenhuma diferença significativa); 180 dias (nenhuma diferença significativa).

(c) Efeito significativo da interação Grupo vs Tempo: diferenças significativas entre tempos (teste de Tukey): 7≠(14 e 180), 90≠(14 e 180) para PLP; diferenças significativas entre grupos (teste de contraste): 7 dias (PLP ≠ PLP+C); 14 dias (nenhuma diferença significativa); 90 dias (nenhuma diferença significativa); 180 dias (nenhuma diferença significativa).

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos para cada parâmetro anatomopatológico estudado, quanto ao tipo de tela e o tempo decorrido do implante, no momento da análise.

4.2.1.1. Infiltrado Inflamatório Agudo

Para avaliar o infiltrado inflamatório agudo usou-se como critério a presença de grupamentos de neutrófilos (supuração). A inflamação aguda é de duração rápida, alguns minutos, horas ou um a dois dias e suas características principais são a exsudação de líquidos e de proteínas plasmáticas (edema), e a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Vê-se nos animais do grupo I (PLP), aos sete e 14 dias após o implante da tela, a presença de neutrófilos, já nos animais do grupo II (PLP+C) eles não foram observados em todos os tempos. Dessa forma os testes estatísticos demonstraram diferenças significativas entre as telas nos animais eutanasiados após sete e 14 dias ($p < 0,001$), com relação à reação inflamatória aguda sendo mais pronunciada nos animais submetidos ao implante de tela não recoberta pelo gel de colágeno. Já aos 90 e 180 dias não houve diferenças significativas entre os grupos, (Figuras 12 e 13).

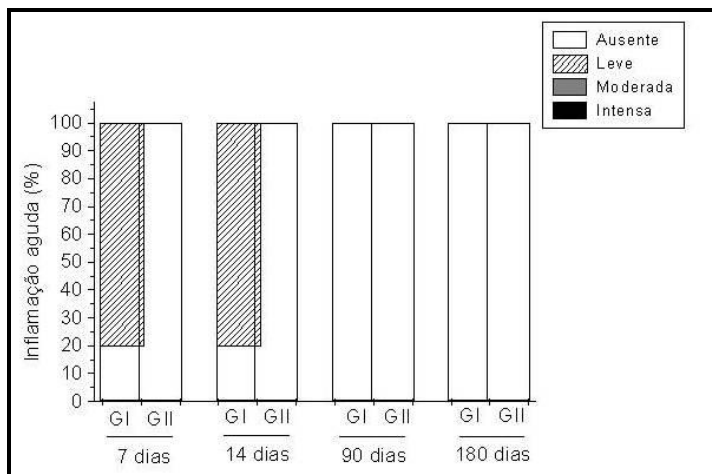


Figura 12. Intensidade da reação inflamatória aguda

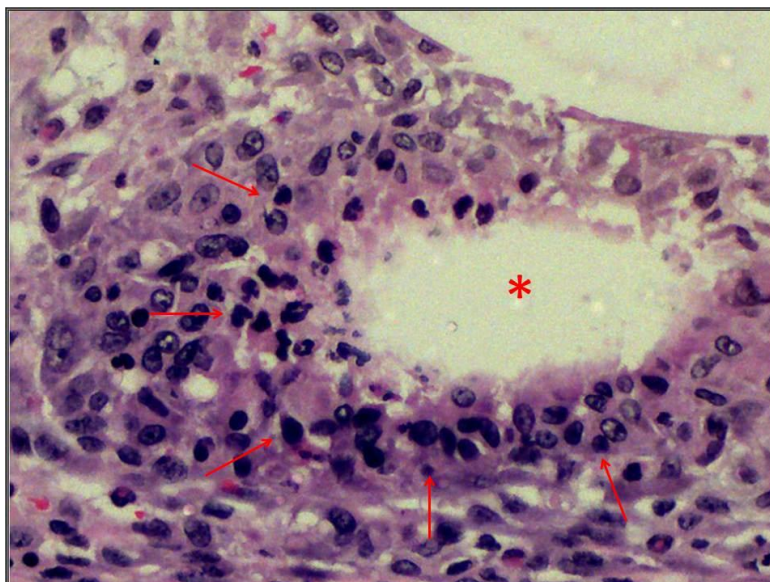


Figura 13. Infiltrado neutrofílico leve (setas vermelhas) ao redor da tela (área branca [*]) observado em ratos do grupo I (PLP) aos sete dias após o implante. Esta área branca corresponde ao espaço deixado pela tela que foi deslocada durante corte (microtomia) e em parte dissolvida pelo xilol no preparo das lâminas. HE- "Primo Star" (Carl Zeiss) 400X.

4.2.1.2. Infiltrado inflamatório Crônico

A inflamação crônica foi avaliada quanto à presença de macrófagos, linfócitos e histiócitos. O macrófago é a figura central da inflamação crônica por causa do grande número de produtos biologicamente ativos que ele pode produzir. Todos estes elementos foram avaliados de forma global. Ocorreram diferenças significativas entre as telas nos animais eutanasiados após sete e 14 dias, com relação à intensidade do processo inflamatório crônico sendo menos intenso no grupo de telas cobertas com o gel de colágeno ($p=0,004$). Já aos 90 e 180 dias não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos quanto a essa variável entre as telas nessas fases (Figuras 14,15,16).

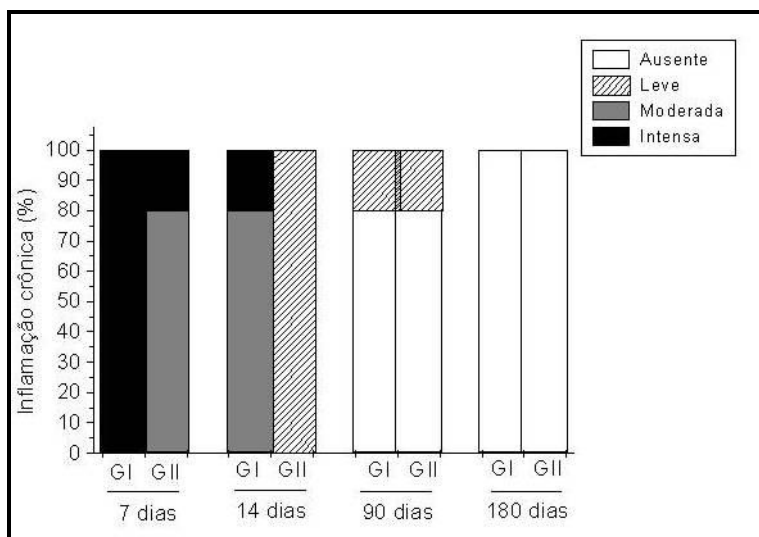


Figura 14. Intensidade da reação inflamatória crônica

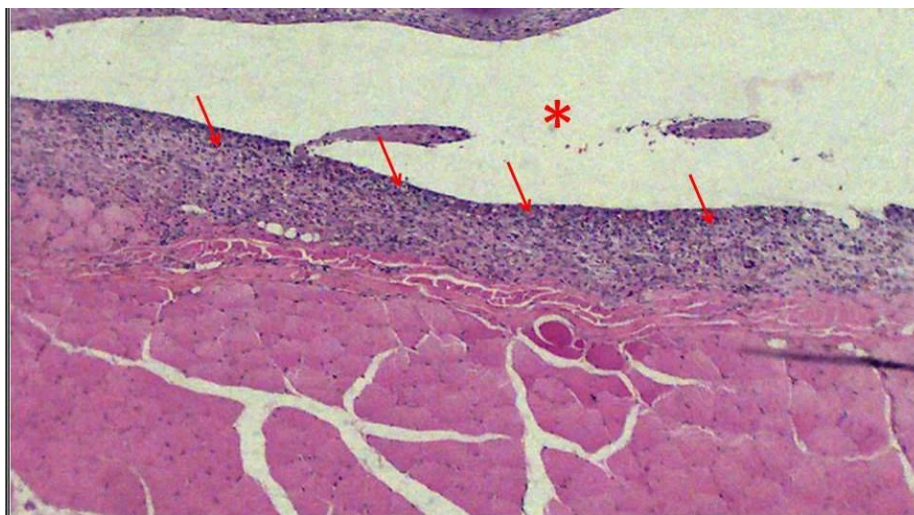


Figura 15. Vê-se nos ratos eutanasiados aos sete dias o intenso infiltrado crônico no grupo I (PLP) – Setas vermelhas; (*) Espaço ocupado pela Tela. HE- "Primo Star" (Carl Zeiss) 40x.



Figura 16. Vê-se nos ratos eutanasiados aos sete dias o moderado infiltrado crônico no grupo II (PLP+ C) – Setas vermelhas; (*) Espaço ocupado pela Tela. HE- “Primo Star” (Carl Zeiss) 40x.

4.2.1.3. Tecido de Granulação (Fibrose)

Na análise do tecido de granulação foi avaliado somente a proliferação fibroblástica jovem e neoformação vascular, excluindo-se o infiltrado linfomonocitário. O processo de reparação inicia-se logo após a agressão. Algumas vezes, até mesmo 24h após a agressão, os fibroblastos e as células endoteliais começam a proliferar e a formar (em três a cinco dias) o tipo especializado de tecido (tecido de granulação) que é o marco da inflamação em processo de cura e característico da cicatrização. O nome origina-se do aspecto róseo e granular sobre a superfície das feridas, mas são os aspectos histológicos que são característicos: a proliferação dos novos vasos sanguíneos pequenos e dos fibroblastos. Aos sete dias, foram vistas

células fibroblásticas típicas aderentes ao colágeno do implante que correspondem à fase proliferativa do processo de remodelação da inflamação. Foi detectada uma clara aderência do colágeno à tela de polipropileno. O que foi notado foi a presença da resposta vascular. A presença de vasos deve fazer parte da fase proliferativa da resposta inflamatória, já a partir do sétimo dia após os implantes terem sido feitos. Nos preparados correspondentes observou-se a presença de fibras de colágeno neoformadas que revestiam a tela de polipropileno. Ao redor do colágeno implantado observou-se a presença de células mononucleadas, linfócitos e ou histiócitos; nestas regiões constatou-se a presença de vasos neoformados, (Figura 17).

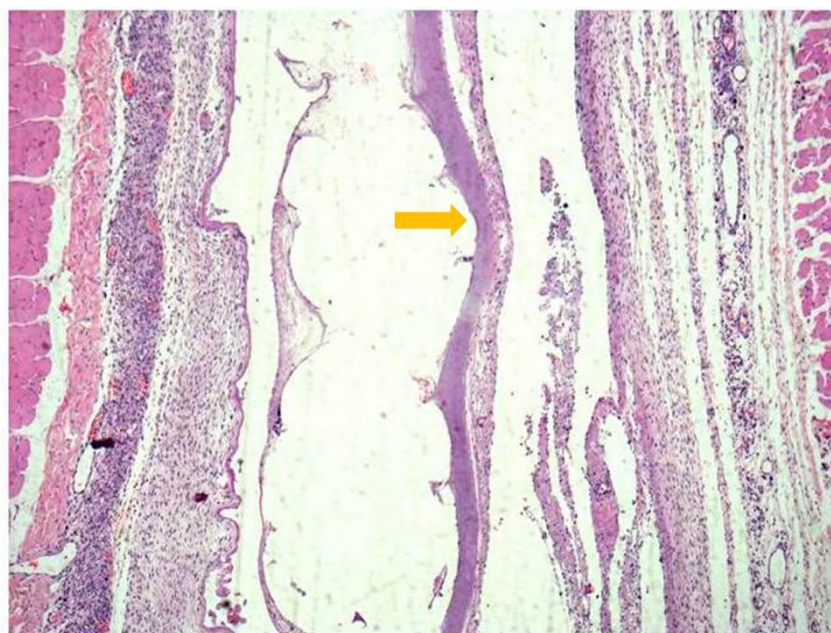


Figura 17. Micrografia de implante de tela com colágeno sete dias após o implante. Vê-se uma faixa violeta corada basofilamente, arroxeadada, caracterizando o gel de colágeno aderido à tela (seta amarela). São observados, fibroblastos, vasos e células mononucleadas. Tela PLC+C, HE- "Primo Star" (Carl Zeiss) 4 X1.

Houve diferenças significativas entre as telas nos animais eutanasiados após sete, 14 dias com referência à análise quantitativa da formação de tecido de granulação sendo menos intensa nos animais do grupo II ($p=0,001$). Já aos 90 e 180 dias os testes estatísticos não demonstraram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 18,19,20).

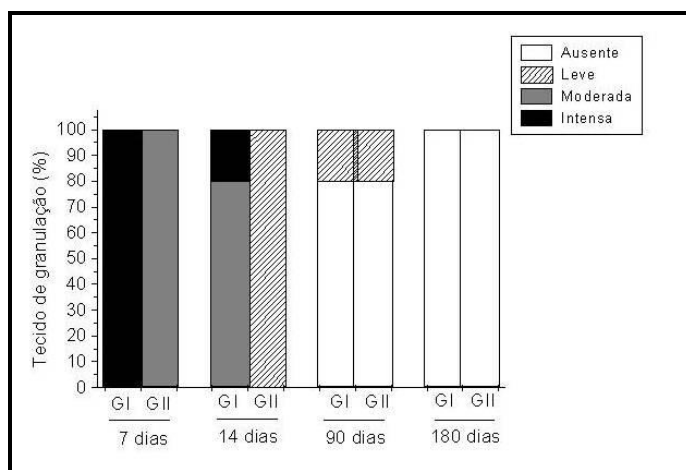


Figura18. Intensidade da formação de tecido de granulação (fibrose).

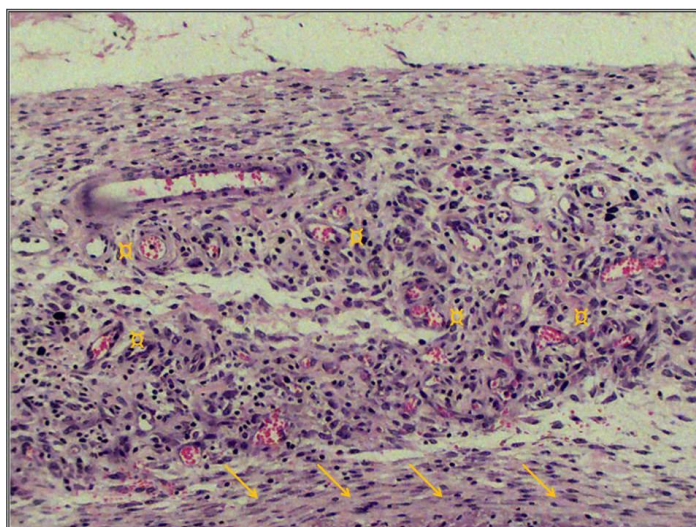


Figura 19. Vê-se nos ratos eutanasiados aos sete dias à intensa formação de tecido de granulação no grupo I (PLP) – Fibroblastos representados pelas setas laranja; (□) neoformação vascular. HE- “Primo Star” (Carl Zeiss) 100X.

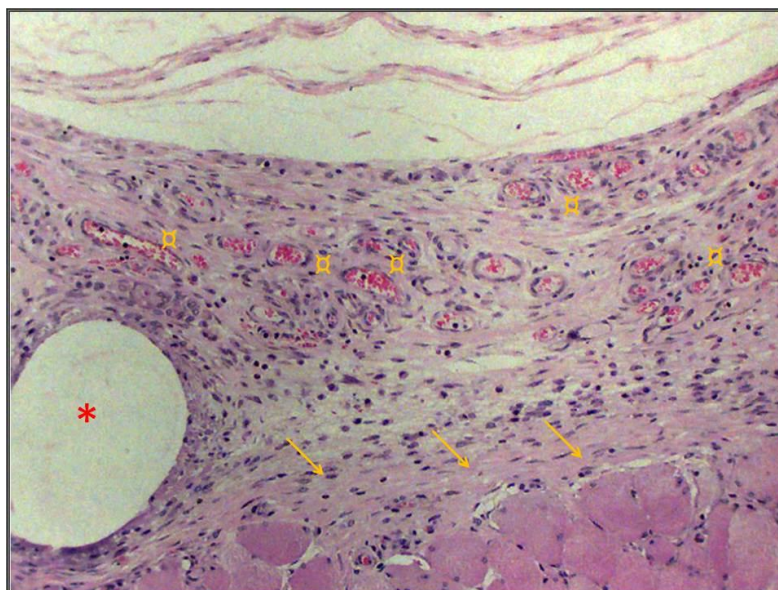


Figura 20. Nos ratos eutanasiados aos sete dias, observa-se a moderada formação de tecido de granulação no grupo II (PLP+C) Fibroblastos (núcleos fusiformes) nos espaços compreendidos entre os fios da tela de polipropileno - Setas laranja; (▣) neoformação vascular; (*) Espaço ocupado pela Tela. HE- "Primo Star" (Carl Zeiss) 100X.

4.2.1.4. Reação do Tipo Corpo Estranho

Para analisar a reação do tipo corpo estranho, foi avaliada somente sua presença ou ausência, baseado na formação de granulomas e presença de células gigantes do tipo corpo estranho. As células gigantes são formadas pela fusão e coalescência de células epitelióides e são formadas na presença de grandes quantidades de material indigerível. Essas se aglomeram ao seu redor, caracterizam-se por possuírem núcleos espalhados dando origem ao termo célula gigante do tipo corpo estranho (Figura 21).

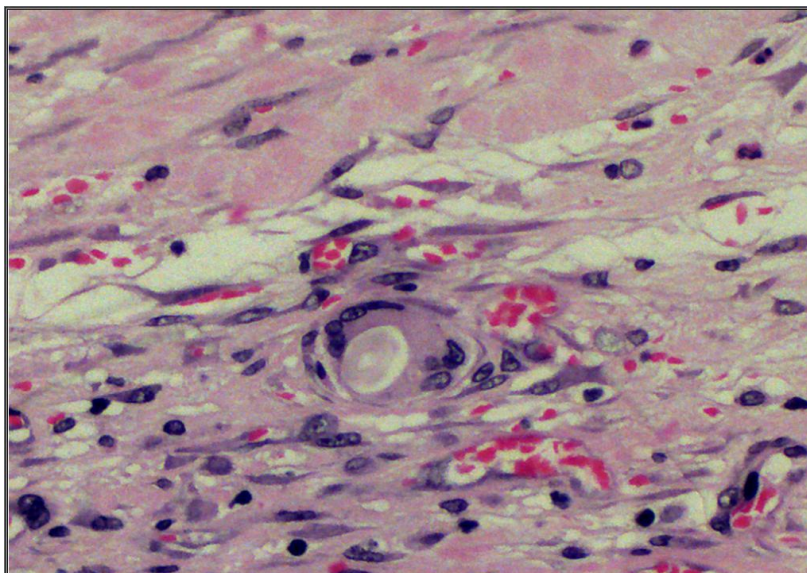


Figura 21. Em detalhe uma célula gigante do tipo corpo estranho observada em HE - Aumento 400X- "Primo Star" (Carl Zeiss) nos animais do grupo I (PLP) aos sete dias após o implante.

Nos testes estatísticos foram demonstradas diferenças significativas entre as telas nos animais eutanasiados após 07 e 14 dias após o implante das mesmas com relação à reação do tipo corpo estranho onde se pode aferir uma resposta menos intensa nos animais do grupo II ($p < 0,001$). Já aos 90 e 180 dias não ocorreram diferenças significativas entre os grupos (Figuras 22 e 23).

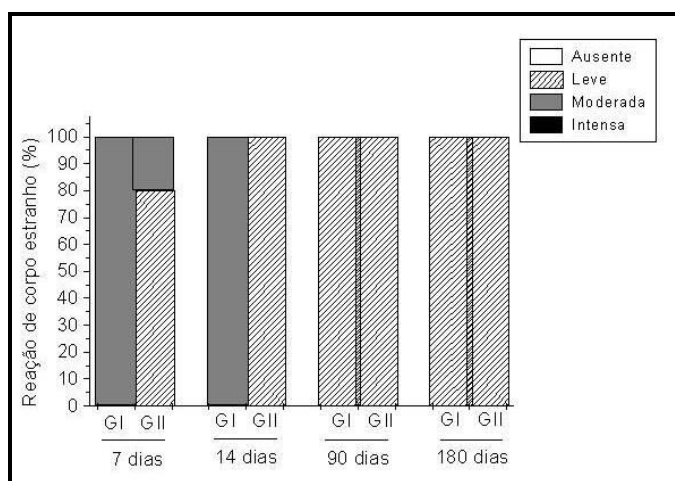


Figura 22. Intensidade da reação do tipo corpo estranho.

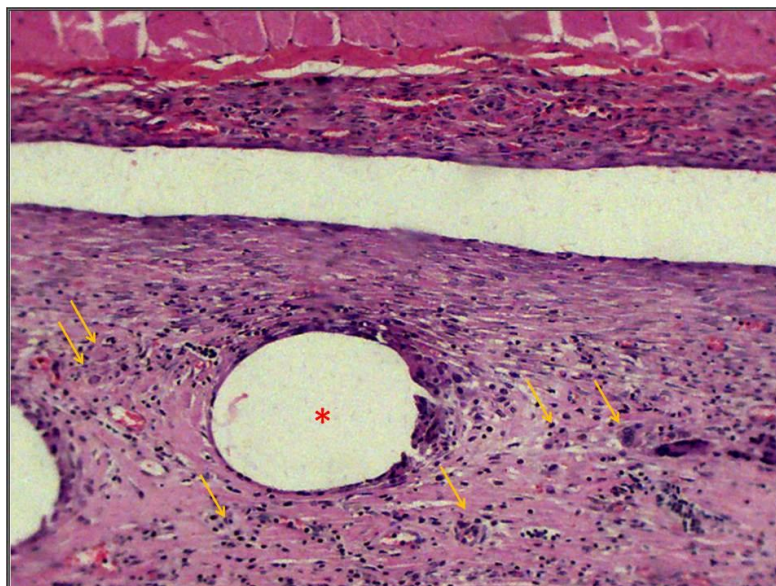


Figura 23. Nos ratos eutanasiados aos sete dias, observa-se a moderada formação de célula gigante do tipo corpo estranho no grupo I (PLP). Setas laranja; (*) Espaço ocupado pela Tela. HE “Primo Star” (Carl Zeiss) 100X.

4.2.1.5. Formação de Granuloma

Foi analisada somente a presença de grupamentos de células epitelióides circundadas por linfócitos e com células gigantes. Os granulomas são pequenas coleções, de 0,5µm a 2µm, de macrófagos modificados, chamados “células epitelióides” que são chamados assim por se assemelharem às células epiteliais com citoplasmas abundantes rosa-pálidos em grumos, geralmente circundados por um halo de linfócitos. Este é um padrão diferenciado de reação inflamatória crônica, na qual o tipo celular predominante é o macrófago ativado com o aspecto de uma célula epitelial modificada (epiteliólíde). Um granuloma é uma área focal de inflamação granulomatosa. Nas colorações com HE as células epitelióides apresentam um citoplasma

róseo-pálido e granular, com fronteiras celulares mal definidas, que muitas vezes parecem se fundir umas às outras. O núcleo é menos denso do que o de um linfócito (vesicular) tem uma conformação oval, alongada e pode apresentar um pregueamento de membrana nuclear. Os granulomas mais velhos desenvolvem uma bainha capsular de fibroblastos e de tecido conjuntivo. Com frequência, embora não de forma invariável, as células epitelióides fundem-se e constituem células gigantes na periferia, ou algumas vezes, no centro dos granulomas. Estas células gigantes podem atingir diâmetros de 40 a 50 μm e compreendem uma grande massa citoplasmática com mais de 20 pequenos núcleos dispostos na periferia (células gigantes do tipo Langhans) ou ao acaso (Célula gigante do tipo corpo estranho) (Figura 24).

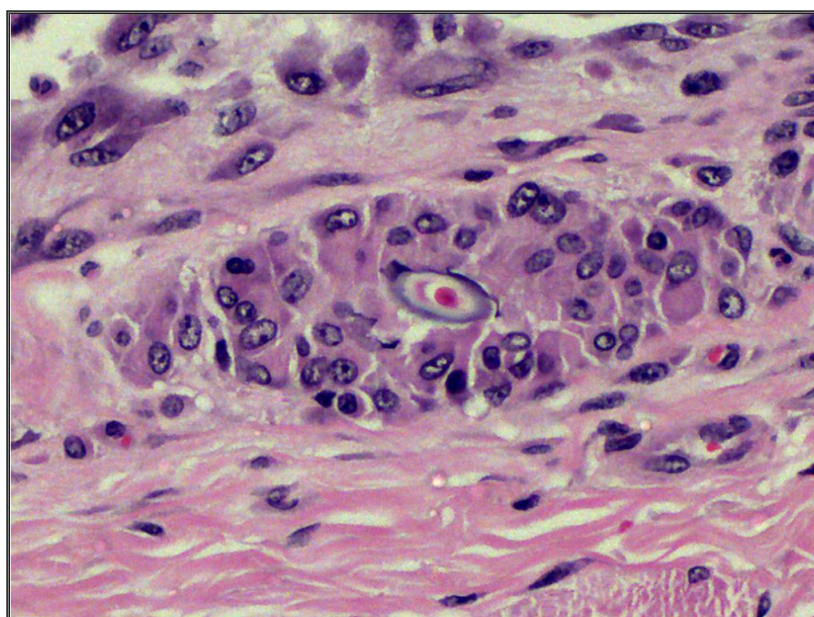


Figura 24. Em detalhe uma célula epitelióide observada em HE - Aumento 400X- "Primo Star" (Carl Zeiss) nos animais do grupo I (PLP) aos 7 dias após o implante.

Houve diferença significativa nas amostras avaliadas com relação à formação de granuloma somente nos animais eutanasiados após sete, dias, sendo menos intensa nos animais submetidos ao implante de tela de polipropileno recobertas pelo gel de colágeno ($p=0,029$). De forma contrária, nos animais eutanasiados aos 14, 90 e 180 dias não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos através dos estudos estatísticos para a variável em questão (Figura 25 e 26).

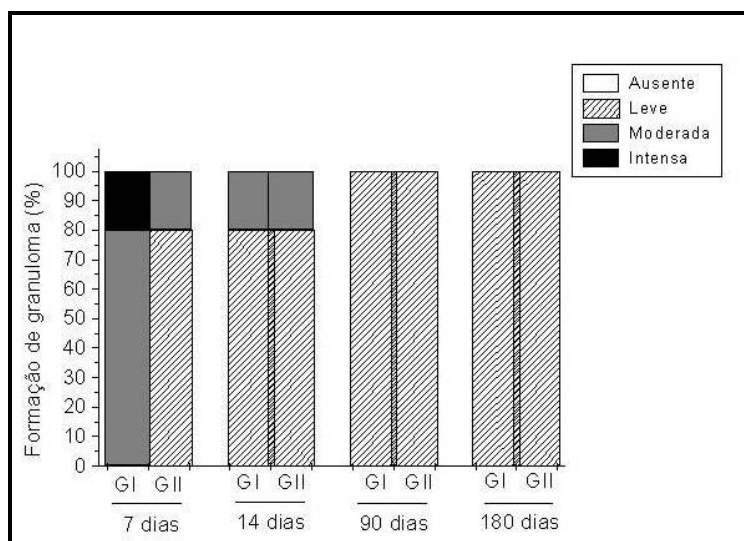


Figura 25 . Intensidade da reação granulomatosa.



Figura 26. Vê-se nos ratos eutanasiados aos sete dias a formação granuloma no grupo II (PLP + C). Setas laranja; (*) Espaço ocupado pela Tela. HE- “Primo Star” (Carl Zeiss) 100x.

4.2.2. Estudo da birrefringência (anisotropia)

Foi realizada, inicialmente, a análise morfológica das estruturas, onde se considerou que o preparo das lâminas resultou em amostras nas quais as imagens birrefringentes permitiram boa e acurada caracterização das fibras colágenas.

Em qualquer dos métodos de observação feitos já após sete dias à cirurgia de implante, foram vistas fibras de colágeno neoformadas. Sempre havia maior presença de fibras de colágeno junto às imagens dos fios componentes da tela de polipropileno embebida ou não no gel de colágeno. Em termos de observações visuais e para avaliação morfológica a coloração de tricrômico de Masson e as impregnações de prata (Ag) produziram excelentes resultados morfológicos, sendo que com prata as fibras individuais de colágeno

eram melhores individualizadas para comparações com as observações e medidas feitas com a microscopia de polarização. Foi possível detectar que havia diferenças de intensidade de coloração, grau de agregação e distribuição das fibras de colágeno, em todos os casos examinados. Assim, aos sete dias após implante, as fibras estavam mais separadas, i.e. com menor densidade em ambos os grupos. No grupo II (PLP+C) foi observado que o colágeno neoformado apresentava-se mais fino e esparsos quando comparado ao grupo I (PLP) (Figuras 27 e 28).

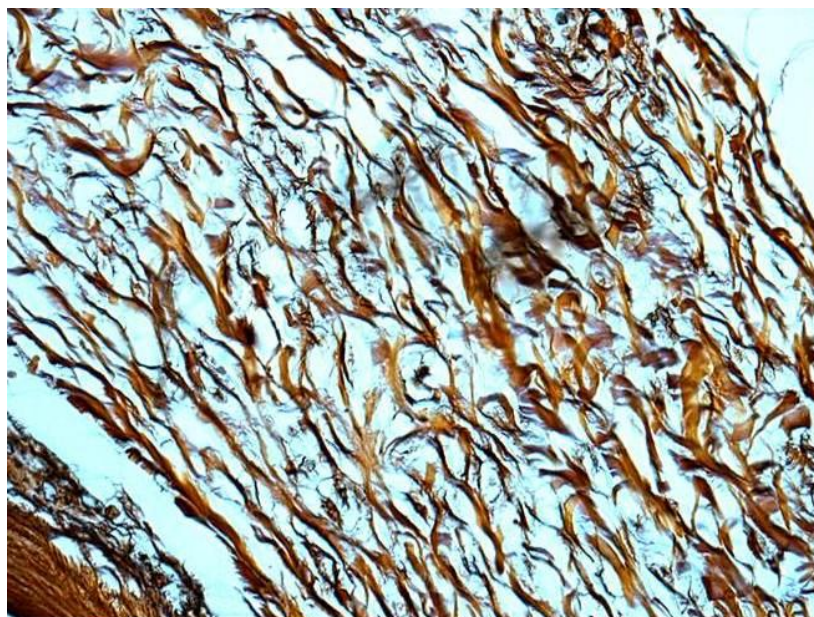


Figura 27. Imagem de corte impregnado por Ag, PLP+C sete dias após cirurgia. Nítida a distribuição e a direção das fibras (feixes observados em marrom). Ag 40x.

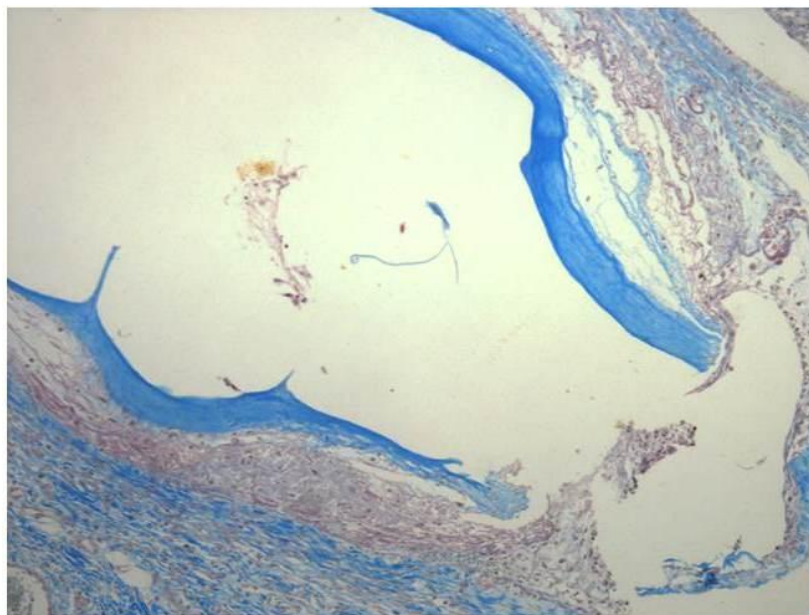


Figura 28. Micrografia, tricrômico de Masson, PLP+C sete dias após o implante. Veem-se fibras de colágeno em azul. O colágeno complexado com a tela de polipropileno é mais nitidamente representado pela espessa faixa azul. A tela foi dissolvida pelo Xilol e perdida na microtomia, agora representada pelo espaço em branco. Observam-se também fibroblastos e elementos de infiltração, 10x.

Aos 14 dias após os implantes, já se notou a ausência de material colagênico que envolvia a tela de polipropileno (Grupo II). A coloração pelo tricrômico de Masson permitia a visualização das fibras de colágeno em geral. Então, foi observado nos preparados em que a tela estava recoberta pelo colágeno que havia em contato com o mesmo uma camada estrutural de fibras de colágeno neoformadas, com um arranjo ondulado, mais denso quando comparadas às telas sem colágeno (Figura 29).

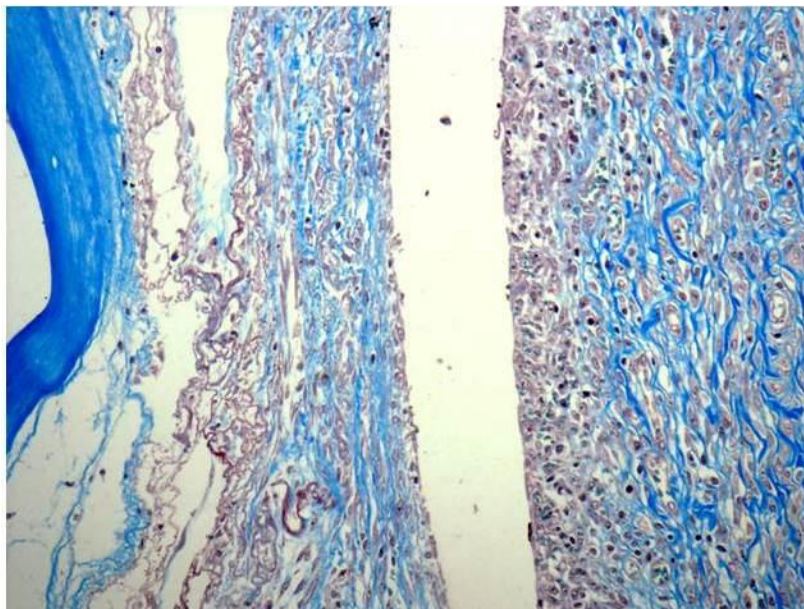


Figura 29. Detalhe da Figura 19. Colágeno do implante em azul, do canto esquerdo superior (faixa azul mais espessa). Fibras neoformadas separadas, não empacotadas em azul. Tricômico de Masson sete dias – 20X.

Após 90 e 180 dias de implante, as impregnações de prata revelaram que o tecido conjuntivo que envolvia os fios das telas de polipropileno estava com maior densidade de fibras do que os implantes não recobertos por colágeno. Os feixes de colágeno impregnados por prata revelaram as suas estruturas fibrilares, as quais eram mais bem visibilizadas do que nos implantes sem colágeno (Figura 30).

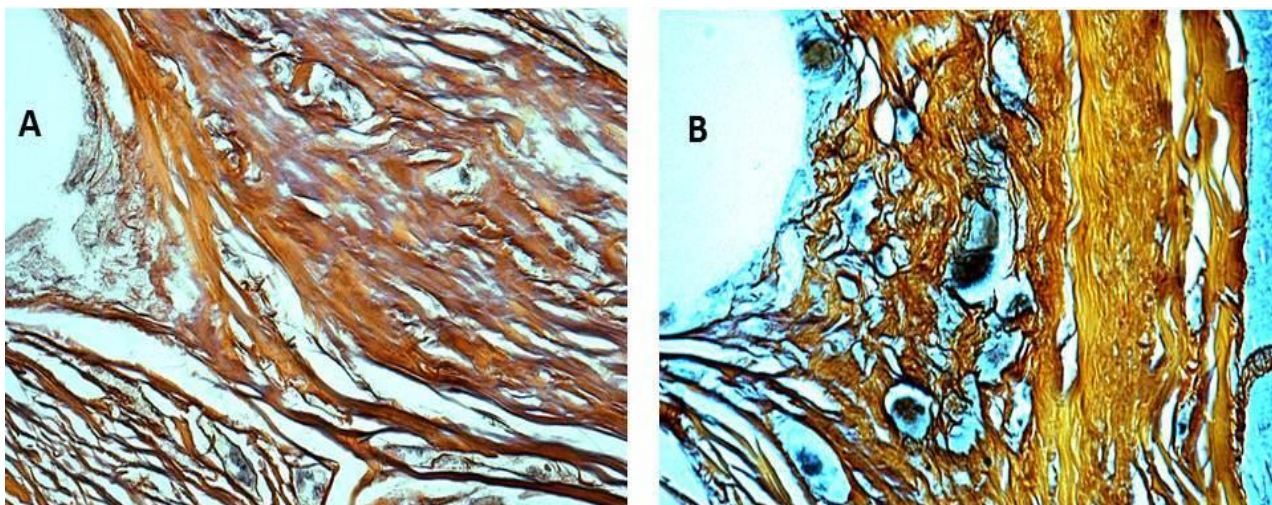


Figura 30. Imagem de corte impregnado por prata (Ag) 90 dias após o implante. Em A, vê-se PLP e em B vê-se PLP + C onde nota-se o empacotamento das fibras colágenas (representadas em marrom). Ag, 40x.

Medidas do brilho das birrefringências em pixels.

As áreas medidas perfizeram um total de quatrocentos e trinta e cinco mil e setecentos e setenta e nove micrometros quadrados ($435.779 \mu\text{m}^2$; a menor área = 69.013 ; a maior = $170.289 \mu\text{m}^2$), o que se constitui na obtenção máxima possível de medidas em todo o material disponível, princípios e significados da técnica e apresentada em Vidal 2003, 2010 e Vidal and Mello 2010. O número de medidas feitas nas áreas perfizeram um total de $n = 4.362$ (41,42,65) (Anexo 5).

A Tabela 5 mostra as estatísticas descritivas (valores das medianas - η) das birrefringências expressos em pixels, coletadas para caracterização dos dois grupos (Grupo I = PLP - Tela de polipropileno sem colágeno e Grupo II = PLP+C - Tela de polipropileno com colágeno) em cada tempo (sete, 14, 90 e 180 dias).

Tabela 5: Teste de Mann Whitney para valores de birrefringência (mediana) após os implantes das telas PLP e PLP+C. n = número de medidas de “Gray Average

	Tela	n	Valores (mediana - η)	p
7	PLP	554	110,15	0,000
	PLP+ C	554	81,0	
14	PLP	598	102,34	0,000
	PLP+ C	598	115,66	
90	PLP	515	8,59	0,000
	PLP+ C	515	94,78	
180	PLP	514	84,00	0,000
	PLP+ C	514	89,66	

4.2.2.1. O Sétimo dia pós-operatório

As birrefringências das fibras de colágeno neoformadas aos sete dias após os implantes foram maiores para as fibras existentes nas PLP sem colágeno do que para as PLP+C, sendo observada uma diferença significativa entre os grupos a favor do grupo I (PLP) ($p=0,000$). Constataram-se brilhos variáveis das birrefringências em cortes histológicos sem coloração em todas as fibras de colágeno (Figura 31). Nesta fase observamos histologicamente uma intensa atividade inflamatória e a reabsorção do colágeno complexado a tela de polipropileno, portanto era esperado que houvesse uma menor quantidade de colágeno neoformado em ambos os grupos. Ao se realizar uma análise comparativa, observamos que foi menor no grupo II (PLP+C).

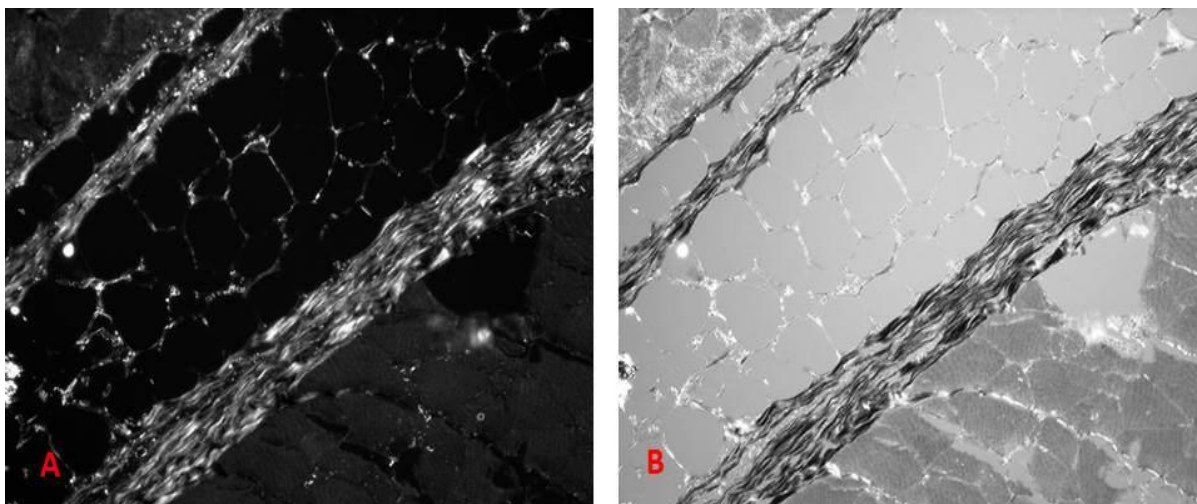


Figura 31. Imagem de corte sem coloração somente imerso em água. PLP sete dias após a cirurgia. Vê-se em A a birrefringência das fibras de colágeno que aparecem brilhantes contra o fundo escuro. 20X1. Em B a mesma área foi compensada com o compensador de Senarmont, a compensação faz as fibras aparecerem em escuro contra o fundo em branco. Após compensação vê-se agora que as fibras de colágeno aparecem em escuro. Só são compensadas as fibras na direção a 45 graus dos compensadores.

A distribuição das medidas de densidade de brilho das fibras colágenas neoformadas após o implante teve sua distribuição mais uniforme e deslocada para a direita no grupo I (PLP), quando comparada com a distribuição das medidas do grupo II (PLP+C). Isso denota que os valores de birrefringência mais elevados foram observados no grupo de telas do grupo I (Figura 32).

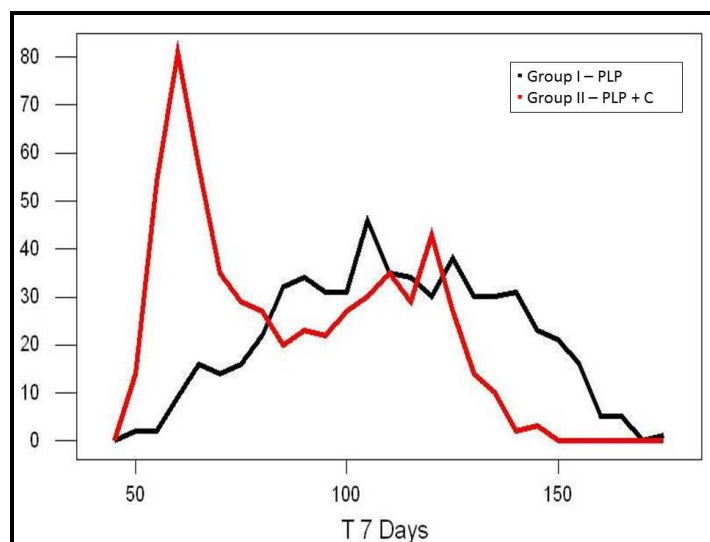


Figura 32. Histograma representativo das medidas de Densidade de Brilho ou Transmitância (T) obtido a partir da quantificação da birrefringência nas fibras colágenas no sétimo dia pós-operatório. Valores de “Gray Average”. Eixo X: “Gray Average” (pixels) e Eixo Y: Frequência.

4.2.2.2. Décimo quarto dia pós-operatório

As medidas de birrefringência das fibras de colágeno neoformadas aos 14 dias após os implantes foram maiores para as fibras existentes no grupo II (PLP+C) do que no grupo I (PLP), sendo observada uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,000$), a favor dos animais do grupo que foram submetidos ao implante de telas de polipropileno recobertas pelo gel purificado de colágeno, grupo II (PLP + C).

No histograma apresentado a seguir observa-se o comportamento das medidas de birrefringência dos grupos I (PLP), mostrado em preto e II (PLP+C), mostrado em vermelho, em relação a variável Tempo. Nota-se que os valores em pixels das birrefringências das fibras de colágeno neoformadas aos 14 dias após os implantes foram maiores, notado pelo deslocamento da curva

vermelha para a direita e tiveram uma distribuição mais uniforme nas fibras existentes nos animais do grupo II (PLP+C) (Figura 33).

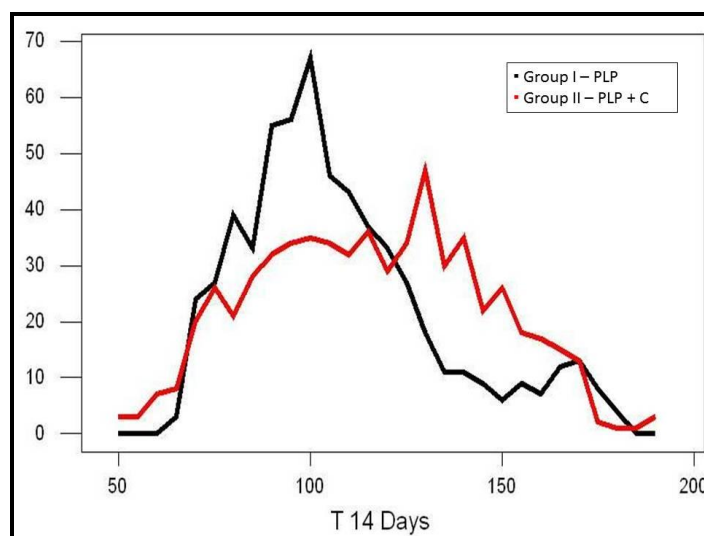


Figura 33. Histograma representativo das medidas de Densidade de Brilho ou Transmitância (T) obtido a partir da quantificação da birrefringência nas fibras colágenas no 14º dia pós-operatório. Valores de “Gray Average”. Eixo X: “Gray Average” (pixels) e Eixo Y: Frequência.

4.2.2.3. 90º dia pós-operatório

As birrefringências das fibras de colágeno neoformadas aos noventa dias após os implantes foram maiores para as fibras existentes nas PLP com colágeno do que para as PLP isoladas, sendo observada uma diferença significativa entre os grupos a favor do grupo II (PLP+C) ($p=0,000$). Nesta fase é nítido o brilho das fibras colágenas orientadas a 45 graus do plano de luz polarizada, onde é obtido o brilho mais intenso, com os valores de *Gray Average* (GA), enquanto as fibras em outras orientações têm menos intensidade de brilho, ou seja, menores valores de birrefringência (Figura 34).

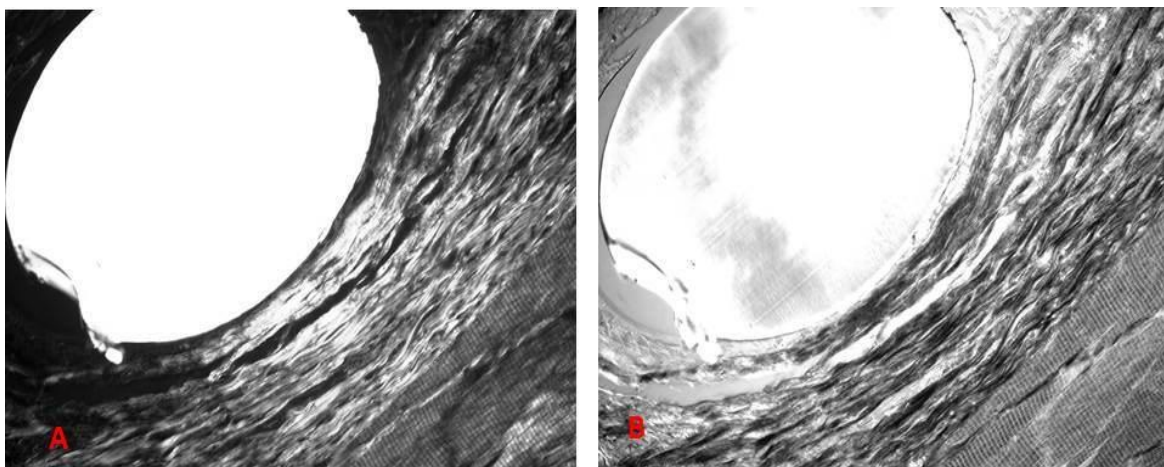


Figura 34. Em A vê-se imagem de corte sem coloração somente imerso em água, PLP+C 90 dias após cirurgia. A birrefringência revela-se pelo brilho contrastando com o fundo escuro. Na figura aparece um fio cortado perpendicularmente envolvido pelas fibras de colágeno que apresentam várias intensidades de brilho. Em B, após a compensação agora as fibras de colágeno aparecem em escuro. Após compensação veem-se finas fibras em diferentes direções. 20x.

A distribuição das medidas de densidade de brilho das fibras colágenas neoformadas após o implante das telas recobertas pelo colágeno (Grupo II – PLP+C) tem sua distribuição mais uniforme e deslocada para a direita, quando comparada com a distribuição das medidas do grupo I (PLP). Isso denota que os valores de birrefringência mais elevados foram observados no grupo de telas do grupo II (Figura 35).

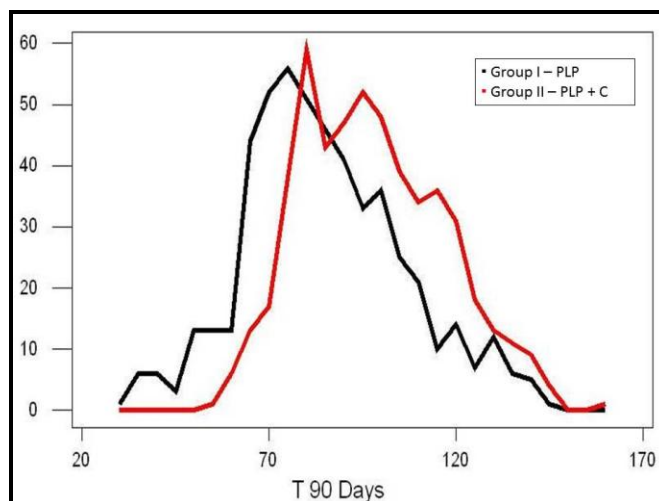


Figura 35. Histograma representativo das medidas de Densidade de Brilho ou Transmitância (T) obtido a partir da quantificação da birrefringência nas fibras colágenas no 90º dia pós-operatório. Valores de “Gray Average”. Eixo X: “Gray Average” (pixels) e Eixo Y: Frequência.

4.2.2.4. 180º dia pós-operatório

As medidas de birrefringência das fibras de colágeno neoformadas aos cento e oitenta dias após os implantes foram maiores para as fibras existentes no grupo II (PLP+C) do que no grupo I (PLP), sendo observada uma diferença significativa entre os grupos ($p=0,000$), a favor dos animais do grupo que foram submetidos ao implante de telas de polipropileno recobertas pelo gel purificado de colágeno, grupo II (PLP+C).

No histograma apresentado a seguir observa-se o comportamento das medidas de birrefringência dos grupos I (PLP), mostrado em preto e II (PLP+C), mostrado em vermelho, em relação a variável Tempo. Nota-se que os valores em pixels das birrefringências das fibras de colágeno neoformadas aos 180 dias após os implantes foram maiores, notado pelo deslocamento da curva

vermelha para a direita e tiveram uma distribuição mais uniforme nas fibras existentes nos animais do grupo II (PLP+C) (Figura 36).

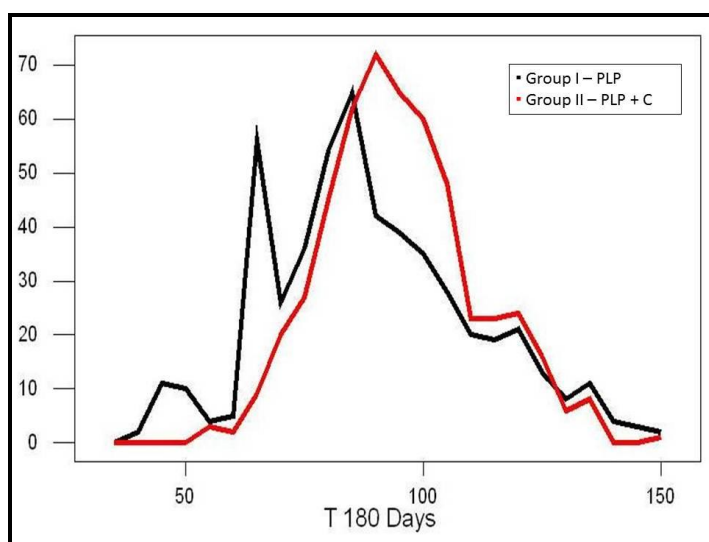


Figura 36. Histograma representativo das medidas de Densidade de Brilho ou Transmitância (T) obtido a partir da quantificação da birrefringência nas fibras colágenas no 180º dia pós-operatório. Valores de “Gray Average”. Eixo X: “Gray Average” (pixels) e Eixo Y: Frequência.

De forma sumária as medidas de birrefringência das fibras de colágeno neoformadas aos sete dias após os implantes foram maiores para as fibras existentes nas PLP sem colágeno do que para as PLP+C. Ao contrário, as birrefringências aos 14, 90 e 180 dias pós-implantes foram maiores para PLP+C. Tal achado sustenta que o colágeno complexado com PLP teve uma ação remodeladora positiva sobre o curso do reparo do mesênquima envolvendo a tela de polipropileno.

O alinhamento mais ordenado das fibras de colágeno determina o aumento da birrefringência no tecido das ratas que receberam as telas recobertas pelo gel purificado de colágeno (grupo II – PLP+C). Os valores de intensidade de brilho mais elevados sugerem uma maior compactação ordenada destas fibras, tornando o tecido mais resistente.

5. *Discussão*

Considerou-se, para o planejamento e execução dessa pesquisa, que o aumento da biocompatibilidade da tela de polipropileno seria alcançado quando, na interface tecidual, houvesse:

- Maiores valores de carga máxima no estudo biomecânico.
- Redução da intensidade e persistência do processo inflamatório agudo e crônico, além da formação de fibrose, granuloma e reação do tipo corpo estranho no estudo anatomopatológico.
- Aumento da deposição de fibras colágenas e melhora da sua organização supramolecular, avaliadas pelas propriedades anisotrópicas (microscopia de polarização).

Biocompatibilidade é definida como 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 (76).

5.1. Considerações sobre os estudos biomecânicos

Apesar de sua ampla aceitação e uso, as malhas sintéticas tiveram pouca supervisão regulamentar. Nos Estados Unidos da América (EUA), enquanto as leis federais têm recomendado a supervisão e aprovação pré-

comercialização de dispositivos médicos através da “Lei de dispositivos para uso médico” de 1976, as telas mais usadas em cirurgia pélvica não são sujeitas a esta jurisdição, pois elas são consideradas dispositivos 510 (k), ou seja, um dispositivo baseado em um outro similar que estava em uso antes de 1976 — nesse caso, as telas usadas para a correção de hérnias. Isso é especialmente alarmante agora que o *Food and Drug Administration* (FDA) lançou um comunicado de saúde pública em 21 De outubro de 2008, citando uma alta taxa de complicações com o uso de malhas sintéticas em implantação uroginecológica. A lista de complicações inclui infecção aguda e crônica, contração do tecido devido ao encolhimento de malha, dispareunia limitando a atividade sexual além de erosão, exposição e extrusão da malha (77). Assim, a pesquisa sobre o impacto de telas sintéticas nos resultados clínicos é extremamente necessária. Isso inclui estudos experimentais como o presente, e a proposta de alternativas quanto aos materiais e técnicas.

As propriedades mecânicas dos diferentes tipos de telas de polipropileno, usadas na correção dos defeitos do assoalho pélvico, são, geralmente, declaradas em suas embalagens pelos fabricantes. Porém o seu comportamento no leito receptor ainda permanece pouco conhecido. A crescente internacionalização do comércio de produtos põe em destaque a importância da normatização dos ensaios de materiais. Qualquer que seja a procedência do produto, os testes pelos quais passou em seu país de origem devem poder ser repetidos, nas mesmas condições, em qualquer lugar do mundo. Tanto o superdimensionamento como o subdimensionamento de produtos pode trazer consequências graves: o primeiro gera desperdício de

material, maior consumo de energia e baixo desempenho; o segundo pode predispor a falha do produto, prejuízos, e possibilidade de sérios acidentes, com danos irreparáveis. Por isso, é importante conhecer a resistência dos materiais, que pode ser avaliada através de ensaios mecânicos, sendo o teste de tração o mais importante para este fim (78).

Vários tipos de tensiômetros foram desenvolvidos para avaliar a resistência dos materiais. Em 2001 Kubricht et al., publicaram os primeiros resultados com utilizaram um tensiômetro primitivo e muito sujeito a incorreções de medidas, dotado de uma manivela que ao ser rosqueada no sentido horário, tracionava cranialmente a presilha superior até o corpo de prova romper-se. Este método foi utilizado para comparar a força tênsil necessária para ruptura da fâscia lata cadavérica e da submucosa intestinal porcina (79).

Dietz et al. (2003), já apresentaram um tensiômetro mais evoluído, chamado MTS *Mini-Bionix testing Machine* (MTS Corporation, Minneapolis, Mn, USA), projetado para avaliar as propriedades mecânicas de materiais sintéticos. Avaliaram oito tipos de materiais de implantes uroginecológicos através de testes de tração “*in vitro*”, quanto ao módulo de elasticidade e carga máxima para a ruptura do material. Porém, houve necessidade de adaptações ao tensiômetro para que o corpo de prova não se desprendesse dos dispositivos de fixação. Concluíram que as forças necessárias para a ruptura dos materiais estavam muito acima da realidade humana, pois, a média de carga necessária para a ruptura, por exemplo, do Nylon 66 foi de 422 N, enquanto que a pressão intra-abdominal normal não excede 10 a 16 N (80).

Choe et al. (2001), foram os pioneiros a utilizar uma Máquina Universal de Ensaio (MUE), semelhante à utilizada em nosso estudo para comparar, “*in vitro*” a carga máxima necessária para a ruptura de diferentes materiais de “*sling*”. Concluíram que os materiais sintéticos necessitam de maiores valores de carga máxima para a ruptura, quando comparados aos alo-enxertos (tecidos cadavéricos) e estes, por sua vez, maiores valores de carga que os autoenxertos. O mérito deste estudo está na padronização do uso da MUE, para avaliar as propriedades biomecânicas das próteses utilizadas no tratamento dos defeitos do assoalho pélvico (81).

Afonso et al. (2008), utilizaram o mesmo tensiômetro de precisão, MUE, para analisar “*in vitro*” a elasticidade (por meio de um teste de tração) de cinco diferentes telas de polipropileno usualmente utilizadas no tratamento dos defeitos do assoalho pélvico. Concluíram que, para o polipropileno, a elasticidade estava relacionada com sua geometria e espessura de seus filamentos, observando que houve diferenças significativas de elasticidade nas telas por eles estudadas. Assim como outros autores, consideraram que o teste de tração uniaxial é, no momento, seguro para avaliar a consistência elástica dos materiais (78).

Bazi et al. (2007), realizaram estudo comparativo com quatro diferentes tipos comerciais de telas de polipropileno usadas em “*slings*”, recuperadas 24 semanas após o implante na parede abdominal de ratos, e analisaram o seu comportamento biomecânico, usando a MUE, em testes de tração uniaxial. Concluíram que não houve diferença significativa quando comparadas às médias de pico de carga até a ruptura e a deflexão da tela até o

pico de carga. Porém, quando comparada à consistência (módulo de elasticidade), houve diferença significativa entre as telas. As conclusões deste estudo não apresentaram novidades e, embora seja um estudo em animais, o seu desenho não permitiu avaliar as propriedades dessas telas na interface tecidual (82).

Na literatura há vários estudos endereçados a avaliar as propriedades biomecânicas dos materiais de implante utilizados no tratamento da IUE e POP (77,78,82). Estes, porém analisaram os materiais isoladamente ou recuperadas após o implante em animais e não em seus leitos de implante medindo a aderência das telas aos tecidos, o que é a proposta deste presente estudo.

A partir de 2011 com a publicação dos trabalhos de Siniscalchi et al., começou-se a se conhecer um modelo experimental destinado a analisar as propriedades biomecânicas das telas na interface tecidual, método esse que se tornou um modelo padronizado e reconhecido para avaliar a aderência das telas aos tecidos circunvizinhos. Foram avaliados, “*in vivo*”, as propriedades biomecânicas da tela de polipropileno monofilamentar tipo I e os efeitos da inclusão de orifícios facilitadores de integração sobre a resistência na interface com o leito receptor. Verificou-se que a aderência das telas de polipropileno aos tecidos circunvizinhos aumentou significativamente com a inclusão de orifícios de tamanho padronizado ao se analisar os valores encontrados para a carga máxima; trabalho até a carga máxima; carga no desprendimento da tela e trabalho até o desprendimento da tela. Os orifícios também conferiram à tela de

polipropileno maior elasticidade, ao se analisar dos valores de deflexão até a carga máxima e deflexão até o desprendimento da tela (83).

Recentemente, Palma et al., usando essa mesma metodologia utilizada no presente estudo, publicaram um ensaio experimental usando os dispositivos de fixação de modernos “*mini-slings*”, comercialmente disponíveis, destinados ao tratamento minimamente invasivo da incontinência urinária. Foram submetidas ao implante subcutâneo de cinco diferentes tipos de dispositivos de ancoragem dos “*mini-slings*” e uma tela de polipropileno (controle), a saber: TVT-Secur (Gynecare, USA), Unitape (tela de controle) e Ophira mini sling system (Promedon, Argentina), Tissue Fixation System (TFS PTY Australia), Zipper Sling e Prosurg (Prosurg USA). Em cada grupo foram implantados de maneira randômica cinco amostras de cada dispositivo, ficando um em cada lado da parede abdominal da rata. O primeiro grupo foi sacrificado sete dias após o implante, o segundo 14 dias e o terceiro grupo em 30 dias. A sua parede abdominal retirada e dividida simetricamente em dois blocos, que continham os dispositivos de ancoragem implantados que foram submetidos a avaliações de fixação primária usando um tensiômetro de precisão (máquina universal de ensaios). Uma carga crescente era aplicada em uma extremidade do dispositivo de ancoragem ou tela até que este fosse completamente removido dos tecidos. Após sete dias do implante observaram que o Ophira apresentou melhor fixação e o dispositivo “T” a pior, não havendo diferença entre os outros grupos. No 14º dia após o implante notaram que o Ophira e o TFS mostraram melhor fixação quando comparado com os outros dispositivos que não mostraram diferença entre si. Após 30 dias foi observado que o Ophira

apresentou melhor fixação e o dispositivo “T” a pior, não havendo diferença entre os outros grupos (84).

No presente experimento, considerou-se o modelo descrito apropriado aos objetivos da pesquisa pelo fato deste ser um estudo pareado, no qual o animal era seu próprio controle, consideramos que os efeitos da variabilidade individual no processo de integração da tela ao leito receptor puderam ser controlados de forma adequada.

Os dados encontrados neste estudo inferem que a tela recoberta com o gel purificado de colágeno terá, provavelmente, menor mobilidade quando implantada e também uma melhor integração ao corpo do hospedeiro uma vez que a paciente é estimulada a deambular precocemente após o procedimento cirúrgico. Postula-se que micromovimentos na interface tecidual determinem processo inflamatório crônico e predisponham à defeitos de integração, entre os quais extrusão e exposição do implante. Dessa forma, o recobrimento com colágeno poderia representar vantagem em potencial para emprego clínico. A melhor integração da tela de polipropileno recoberta com o gel purificado de colágeno poderia sugerir sua adoção nos processos industriais. Isto poderia implicar em melhor adaptação ao tecido hospedeiro e diminuição da taxa de complicações relacionadas à integração da tela, o que contribuiria, significativamente, para o sucesso do procedimento.

Considerando-se o aumento da expectativa de vida das mulheres deste século e o aumento do número de cirurgias para a correção dos prolapsos vaginais, iniciativas para aumentar a biocompatibilidade e diminuir as

morbidades potenciais dos implantes sintéticos são muitos desejáveis. Nesse sentido, a demonstração objetiva das vantagens do recobrimento das telas de polipropileno com o gel purificado de colágeno, poderá repercutir significativamente na prática clínica.

5.2. Aspectos gerais da integração dos implantes

A resposta a corpo estranho é uma cascata fisiológica, desencadeada pela adesão de proteínas ao implante e, conseqüentemente, recrutamento de células inflamatórias (85,86). 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 crônico, na qual a fusão dos macrófagos cria as células gigantes de corpo estranho (87).

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 (86).

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 (88). 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 reposta 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 (89).

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 et al. (1998) relataram a importância das fibras colágenas do tipo I e III na força e tensão dos tecidos do assoalho pélvico feminino (90).

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.

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 (91). 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 (21,92,93,94,95).

Ricchetto et al. (2008) compararam quatro tipos de telas usadas na correção de incontinência urinária (TVT®, SPARC®, IVS® e *Sling Plus*®) 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 (21). 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 (96). Almeida et al (2007) compararam TVT®, Marlex® e SIS®, e, para tanto, implantaram fragmentos próximos ao colo vesical de ratas ooforectomizadas. Nesse último estudo, as análises da infiltrado inflamatório e da deposição colágena foram semi-quantitativas, categorizando os achados em quatro grupos (<25%, 25-50%, 50-75% e > 75%) (97). 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 medição dos valores de birrefringência (propriedades anisotrópicas) da deposição colagênica.

O processo de cicatrização tecidual é uma sequência de etapas subentrantes, as quais envolvem várias relações teciduais e ambientais, onde o acréscimo de um material exógeno, seja ele sintético ou biológico, irá interferir nesta dinâmica. O adequado controle desta interferência é o desafio apresentado à ciência no momento. Nesse sentido, nos parece útil a associação de material biológico ao sintético na tentativa de modular as fases iniciais da cicatrização, de tal maneira que este processo ocorra em amplitude ideal para obtermos sucesso no tratamento, porém com menor risco de complicações.

5.3 Considerações sobre Colágeno microfibrilar estabilizado com glutaraldeído.

A biocompatibilidade do colágeno depende significativamente da preservação de sua estrutura helicoidal supramolecular que, por sua vez, determinará menor reação inflamatória. Este arranjo é normalmente comprometido no processo de solubilização enzimática do colágeno, em decorrência da remoção das cadeias telopeptídicas (98). Desta forma, é interessante a proposta de introdução artificial de ligações intermoleculares entre as cadeias do colágeno, com a finalidade de prolongar a sobrevida do enxerto.

Embora o glutaraldeído seja muito empregado para a estabilização do colágeno, estudos anteriores alertaram para a possibilidade de efeitos citotóxicos provocados por concentrações crescentes desta substância no implante (98,99).

McPherson et al. (1986), compararam experimentalmente implantes subcutâneos de colágeno tratado com glutaraldeído em diferentes concentrações. Os autores verificaram diminuição da resposta imune celular e índice de persistência do enxerto de até 90%, após quatro meses, nas amostras com glutaraldeído em concentrações iguais ou pouco inferiores a 0,01%. Nestas condições, os enxertos apresentaram reação caracterizada por invasão fibroblástica, neovascularização e pouca ou nenhuma evidência de inflamação local. Concentrações superiores induziram reação do tipo corpo estranho de intensidade crescente, sendo este fenômeno atribuído à presença de glutaraldeído residual livre no preparado (100).

5.4. Considerações sobre os resultados observados com o gel de colágeno purificado

Considere no presente estudo o número de medidas levadas a efeito (“n”) muito elevado em uma extensa área e os resultados conseguidos (41,42,65).

A hipótese do trabalho foi a de que a presença de colágeno complexado com a tela de polipropileno estimulasse a reação mesenquimal remodelando a resposta do tecido conjuntivo. Esta hipótese fundamenta-se nos achados de que as moléculas de colágeno automontam-se construindo uma supraestrutura supramolecular com registros resultantes da ordem dos seus resíduos moleculares e na configuração molecular (40,41,42). A ordenação molecular da molécula nanométrica do colágeno na fibra de colágeno lhe

confere propriedades ópticas sobejamente discutidas em Vidal 1995, 2010 e 2003.

Assim, este experimento baseou-se em relatos de que colágeno tipo I, mesmo outro tipos, contem resíduos de aminoácidos para os quais existem receptores celulares. Uma sequência como a arginina-glicina-ácido glutâmico frequentemente citada, liga-se a receptores nas membranas celulares desencadeando modificações citoplasmáticas através da actina, ativando atividades gênicas ou mesmo a liberação de moléculas fisiologicamente ativas. Tal é o caso das plaquetas que se ligam ao colágeno rompendo-se e liberando inclusive fator de crescimento fibroblástico. A ligação de plaquetas ao colágeno vem sendo inclusive de uso para teste clínico de ligação plaquetária. Não só isto, mas também liberação de substâncias vasoativas. No caso presente, foi verificado que nos implantes contendo colágeno houve uma proliferação vascular mais intensa ao lado de sinais de um início de remodelação colagênica.

Aos sete dias pós-implantes, as medidas de birrefringência dos implantes contendo colágeno (PLP+C), foi menor. Isto revela que as fibras estariam menos arrançadas em termos de direção nas áreas estudadas do que em PLP. As análises das lâminas ilustradas pelas micrografias mostram que mais provavelmente essas observações devem-se ao fato das fibras de colágeno estarem mais separadas, com menor densidade e empacotamento.

A partir dos quatorze dias até cento e oitenta dias há uma inversão, os valores das birrefringências são maiores para PLP+C do que para PLP. Ou

seja, em PLP+C as fibras de colágeno são mais birrefringentes em função de estarem mais densamente empacotadas e orientadas.

O uso da impregnação por prata teve o intuito de obter as informações morfológicas e simultaneamente as relativas às propriedades anisotrópicas. As moléculas manométricas de colágeno ligam ordenadamente cristalitos de prata em sua periodicidade o que revela a sua ordem molecular através das propriedades ópticas não lineares (101,102). No caso do presente trabalho, mais uma vez, fica demonstrada a ordem molecular das fibras de colágeno, pela complexação com Ag.

5.5. Considerações sobre telas de polipropileno revestidas (Telas Biossintéticas)

Novas variantes da tela de polipropileno são frequentemente introduzidas no mercado. As telas biossintéticas combinam as vantagens dos materiais sintéticos com as vantagens dos enxertos biológicos (103). Elas são projetadas para reduzir as complicações locais como erosão, infecções e dispareunia (104). O revestimento na tela serve para proteger o tecido de processos inflamatórios que levam à exposição (36,103,105).

Recentemente têm sido desenvolvidas telas com uma camada de proteção no seu lado visceral. O objetivo da camada protetora é proporcionar separação suficiente entre a tela e vísceras enquanto a regeneração ocorre, sem impedir o crescimento interno do tecido na tela do outro lado (106).

O implante ideal seria aquele que se incorpora fortemente ao tecido durante o processo de cicatrização, iniciado pelo processo inflamatório

localizado seguido pelo processo de remodelagem. O material absorvível deve perdurar por no mínimo uma semana, que é o período de formação das aderências (36,105).

Tayrac et al. (2007), realizaram um estudo para comparar as telas de polipropileno monofilamentar com macroporos não recobertas (Soft Prolene®) com as recobertas com uma película hidrofílica absorvível de telecolágeno, polietilenoglicol e glicerol (Ugytex®) para cirurgias vaginais. Foram utilizadas 12 ovelhas fêmeas adultas neste estudo. Como resultado, ambas as telas foram bem toleradas por 3 meses depois da implantação. As telas recobertas foram um pouco menos bem integradas nos tecidos circundantes e apresentaram mais sinais de inflamação exsudativa aguda, porém os sinais desapareceram após o período de total reabsorção do revestimento (10 dias). O tamanho da resposta inflamatória entre os dois tipos de telas indica que o revestimento é uma camada eficiente entre a tela e os tecidos vizinhos. Além disso, o estudo mostrou uma diferença numérica, mas não estatística, no aparecimento de erosões entre as telas revestidas e não revestidas e com isso foi concluído que a tela de polipropileno revestida parece reduzir o risco de erosão vaginal quando comparada com a tela não revestida, porém mais estudos controlados randomizados com uma amostragem maior seriam necessários para confirmar esses resultados (36).

Tayrac et al. (2007) fizeram outro estudo utilizando a tela recoberta Ugytex® para comparar os resultados anatômicos e funcionais dessa tela na cirurgia de prolapso por via vaginal em mulheres. Foram avaliadas 143 pacientes com prolapso de parede vaginal anterior ou posterior, sintomáticas,

operadas por via vaginal utilizando a tela Ugytex® e acompanhadas por pelo menos dez meses. A taxa de cura anatômica foi de 92,3% das pacientes, com recorrência de cistocele em 6,8% e de retocele em 2,6%. A taxa de erosão vaginal foi de 12,8% e a de dispareunia “de novo” foi de 12,8%. As pacientes responderam questionários para avaliação dos resultados que mostraram que houve melhora significativa na qualidade de vida e nos sintomas intestinais, urinários e genitais relacionados, sendo que 96,5% das pacientes ficaram satisfeitas com os resultados funcionais. Não houve diferença significativa nas taxas de dispareunia no pré e pós-operatório. Além disso, 87,5% das pacientes com este distúrbio no pré-operatório melhoraram no pós-operatório e 20% que não tinham vida sexual ativa retornaram à atividade sexual normal no pós-operatório. Os autores concluíram que a tela de polipropileno de baixo peso revestida com uma película hidrofílica absorvível para reparo de prolapso genital por via vaginal parece diminuir a morbidade local, como a erosão vaginal e a dispareunia, enquanto mantém baixas taxas de recidivas (105).

Goissis et al. (2010), realizaram um estudo em carneiros para avaliar o comportamento biológico das telas de polipropileno recobertas com colágeno polianiónico ou na forma de dupla camada com poli cloreto de viníla (PVC) como biomateriais para a reconstrução da parede abdominal. Como resultado, a tela de polipropileno: PVC demonstrou ser mais biocompatível e menos susceptível à adesão das alças intestinais, evidenciando potencial para uso na reconstrução da parede abdominal. Além disso, o PVC isoladamente pode constituir-se em um biomaterial para uso temporário e de baixo custo principalmente pela ausência de adesão por nove semanas após a implantação.

Já os implantes de polipropileno: colágeno polianiónico não são recomendados para reconstrução da parede abdominal por induzir a neoformação óssea (107).

Van't Riet et al. (2004), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar se a adição de uma camada de colágeno no lado visceral de uma tela de polipropileno pode evitar a formação de aderências à tela. No experimento foram utilizados 58 ratos e nestes foram criados defeitos na parede muscular abdominal. Uma metade foi corrigida com uma tela de polipropileno não revestida (Prolene®) e a outra metade com uma tela de polipropileno revestida com uma camada de colágeno (Parietex®). Como resultado, uma redução significativa da formação de aderências com o uso da tela revestida com colágeno foi encontrada, em comparação com a tela não revestida. O percentual de incorporação da tela na parede abdominal foi comparável em ambos os grupos, mas após 30 dias a força de incorporação da tela foi significativamente maior com a tela revestida (106).

Cervigni et al. (2011), selecionaram 97 pacientes com cistocele sintomática e todas foram submetidas à reparação deste prolapso utilizando tela de polipropileno revestida com colágeno (Avaulta®). Todas as pacientes foram acompanhadas por um ano. Foi encontrada uma taxa de cura anatômica de 64,9% para prolapso de parede vaginal anterior e melhora significativa nos sintomas relacionados como urgência, urgi-incontinência, hesitação, esvaziamento incompleto da bexiga e sensação de peso. Além disso, a cirurgia teve um impacto positivo na função sexual, avaliada por questionários, com diminuição na incidência de dispareunia. Porém, não foi demonstrado melhora nos sintomas de incontinência fecal ou prisão de ventre. Foi demonstrada uma

alta taxa de recorrência de 35,1% e uma alta taxa de exposição de 21,6%, portanto os autores concluíram que a tela de polipropileno revestida com este tipo de colágeno é insatisfatória para o tratamento de prolapso de parede vaginal anterior (103).

Huffaker et al. (2008), compararam as respostas tissulares na vagina de coelhos entre dois tipos diferentes de enxertos sintéticos. Foram utilizadas 14 fêmeas adultas de coelhos brancos da Nova Zelândia e as telas implantadas na parede vaginal posterior foram de polipropileno monofilamentar não revestida (Gynemesh®) ou revestida com colágeno suíno (Pelvitex®). Os enxertos e tecidos vaginais circundantes foram colhidos 12 semanas após a implantação e foram processados para serem avaliados histologicamente. Não houve erosão dos enxertos e não houve evidência de infecção em nenhum dos animais. Ambas as telas receberam pontuação semelhante para inflamação, neovascularização e proliferação fibroblástica e também ambas induziram uma resposta inflamatória crônica leve, com fibrose mínima e houve boa incorporação do tecido hospedeiro. As porcentagens de apoptose e células em proliferação foram baixas (< 1%) para os dois tipos de enxertos o que indica que a lesão aos tecidos vaginais durante a implantação foi muito bem resolvida após 12 semanas. Com esses resultados foi concluído que a resposta tissular do hospedeiro foi semelhante em ambas as telas, mostrando que a tela de polipropileno recoberta com colágeno suíno não ofereceu uma óbvia vantagem sobre as telas de polipropileno não recobertas (104).

Poucos setores são tão dependentes das pesquisas quanto à área da saúde. É delas que emergem novos medicamentos e procedimentos que

permitem avançar na cura de doenças e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Apesar do reconhecimento sobre a importância dessa atividade, às vezes surgem questionamentos sobre o que é aceitável e quais os limites que devem guiar novos experimentos.

Essas discussões têm como ponto positivo o fato de lançar luz sobre um tema pouco debatido pela sociedade: os caminhos para chegar às novas inovações na medicina. O debate se concentra em dois eixos principais. De um lado, estão os aspectos éticos e de segurança que devem ser respeitados por aqueles que estão envolvidos no estudo de novos procedimentos, técnicas e medicamentos. Do outro, está à imprevisibilidade intrínseca aos processos e situações experimentais em que os resultados não são totalmente reconhecidos, mas apresentam potencial de ganhos para os pacientes. Afinal, muito do que se utiliza hoje na medicina foi objeto de estudos experimentais algum dia.

5.6. Considerações finais

A associação do colágeno à tela de polipropileno, como fator protetor ao material permanente, de tal maneira a reduzir a tendência a encapsulização e reação inflamatório peri-implante sendo eficientes na redução da exposição destas telas foi avaliada em estudos experimentais nos mostrando um caminho a ser seguido (36,104).

No presente estudo a associação do gel purificado de colágeno com o polipropileno desencadeou a formação de tecido cicatricial o qual não apresentou tendência a encapsulização e minimizou a formação de células

gigantes de corpo estranho. Consideramos que tal comportamento biológico agregou vantagens potenciais para o seu emprego clínico no assoalho pélvico. Ademais, a tendência de resolução mais precoce do processo inflamatório local, observada com o emprego associado do gel de colágeno com o polipropileno, poderia contribuir para uma efetiva diminuição da tendência a exsudação local e exposição vaginal da tela. A ausência de necrose e infecção local, observadas no presente experimento, qualifica a proposta de associação do gel de colágeno com o polipropileno para futuros estudos clínico.

Observamos também neste experimento que não houve extrusão da tela em nenhum dos grupos. Tal fato pode ter decorrido do posicionamento do implante no subcutâneo dos animais, que foi concebido de maneira a se evitar o contato direto das telas com linha de sutura. Isso teve por objetivo evitar que a cicatriz cutânea constituísse fator interveniente na análise da integração dos implantes. Considerou-se que a ausência de tecido adiposo e o contato direto entre o tecido epitelial da pele e a fáscia da musculatura abdominal tornaram a parede abdominal da rata particularmente vantajosa para o estudo proposto, pois os materiais testados são disponibilizados pelos fabricantes para que sejam interpostos entre um tecido de natureza epitelial (vagina) e outro de natureza conjuntiva, representado pela fáscia pubocervical.

Outra importante característica do gel de colágeno é a capacidade de ser degradado rapidamente e completamente depois de implantado (36,105). Em estudo prévio foi demonstrado que o processo de integração das telas de polipropileno estende-se até fases mais tardias (21). Entretanto, como o

objetivo do presente experimento era avaliar o comportamento do gel purificado de colágeno, a qual é substituída nas fases iniciais, justificou-se a utilização de um grupo de estudo precoce (7ºPO) o qual permitiu monitorar a substituição do gel complexado a tela pelo colágeno nativo (42). O gel de colágeno complexado a tela de polipropileno foi rapidamente removido do local do implante, atuando assim como molde para a nova formação de colágeno, o qual permanece modulando as etapas seguintes do reparo tecidual de tal forma que não há o desenvolvimento de processo granulomatoso circundando o polipropileno, enquanto que no grupo cuja tela de polipropileno não foi revestida pelo gel (Grupo I – PLP) houve intensificação da reação granulomatosa. As características da deposição colágena observadas no presente estudo, por meio da análise da birrefringência, permitem afirmar que o gel purificado de colágeno foi substituído em sua maior parte pelo colágeno neoformado pelo hospedeiro. Nesse sentido, a biocompatibilidade do gel na presente aplicação pode ser considerada muito elevada.

Confirmando a hipótese do trabalho observamos que a presença de colágeno complexado com a tela de polipropileno estimulou a reação mesenquimal remodelando a resposta do tecido conjuntivo. Provenzano e Vanderby, em 2006, afirmaram que o comportamento mecânico do tecido conectivo é determinado pela composição e organização do colágeno. O tecido imaturo é mais desorganizado, ou seja, com fibras colágenas desordenadas e com várias pontes de proteoglicanos entre elas, comparado com o tecido maduro, que é mais organizado, contínuo, com poucas interligações, que

resultam em maior resistência do tecido (108). Conforme estudo realizado por Ji et al., 2008, quanto mais organizadas, ou seja, mais bem orientadas as fibras colágenas, maior sua birrefringência e maior resistência (109).

Através dos testes biomecânicos foi confirmado que o recobrimento das telas de polipropileno com o gel purificado de colágeno fez também aumentar sua aderência aos tecidos tanto precocemente quanto tardiamente, como demonstrado através da análise dos valores de carga máxima necessários para o desprendimento das telas da interface tecidual.

Assim a busca por materiais híbridos, ou seja, implantes que apresentem componentes absorvíveis ou temporários e componentes não absorvíveis ou definitivos surgem na literatura médica como uma alternativa que possa minimizar as complicações associadas aos implantes únicos (36,103,104,105,106).

Os resultados obtidos neste modelo experimental demonstraram que o revestimento da tela de polipropileno pelo gel purificado de colágeno obtido a partir de tendão bovino melhorou a qualidade do reparo tecidual, com incremento positivo na integração da tela de polipropileno, o que qualifica a presente proposta para estudos clínicos subsequentes.

6. Conclusões

Os resultados encontrados nas condições do presente estudo permitiram concluir que o recobrimento das telas de polipropileno monofilamentar com o gel purificado de colágeno, quando implantadas na interface tecidual da parede abdominal de ratas adultas:

- 6.1.** Aumentou a sua aderência aos tecidos circunvizinhos;
- 6.2.** Causou reação linfoplasmocitária e granulomatosa menos intensa e menos persistente;
- 6.3.** Promoveu o aumento da birrefringência das fibras colágenas; o que refletiu melhor organização molecular espacial e ação remodeladora positiva sobre o curso do reparo do mesênquima envolvendo a tela de polipropileno.

7. Referências Bibliográficas

1. Rodrigues AM, Oliveira LM ,Martins K F; Del Roy CA; Sartori MG; Girão MJ; Castro RA. Risk factors for genital prolapse in a Brazilian population. Rev Bras Ginecol Obstet. 2009; 31(1):17-21.
2. Barbalat Y; Tunuguntla HS. Surgery for pelvic organ prolapse: a historical perspective. Curr Urol. 2012; 13(3):256-6.
3. Lewick-Gaupp C, Margulies RU, Larson K, Fenner DE, Morgan DM, DeLancey JO. Self-perceived natural history of pelvic organ prolapse described by women presenting for treatment. Int Urogynecol J. 2009; 20(8):927-31.
4. Lei L, Song Y, Chen RQ. Biomechanical properties of prolapsed vaginal tissue in pré- and postmenopausal women. Int Urogynecol J. 2007; 18:603-7.
5. Kerkhof MH, Hendricks L, Brolman AM. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse – a review of the current literature. Int Urogynecol J. 2009; 20(4):461-74.
6. Palloni A, Pelaez M, Wong R. Introduction: aging among Latin America and Caribbean populations. J Aging Heath. 2006; 18(2):149-56.

7. 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.
8. Klauschie JL, Cornella JL. Surgical treatment of vaginal vault prolapse: a historic summary and review of outcomes. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*. 2012; 18(1):10-7.
9. Lunardelli JL, Auge APF, Lemos NLB, Carramão SS, Oliveira AL, Duarte A, Aoki A. 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.
10. Ashton-Miller JA, DeLancey JO. On the biomechanicals of vaginal birth and common sequelae. *Ann Rev Biomed Eng*. 2009; 11:163-76.
11. Makinen J, Kahari VM, Soderstrom KO, Vuorio E, Hirvonen T. Collagen synthesis in the vaginal connective tissue of patients with and without uterine prolapse. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*. 1987; 24:319-25.
12. Chen HY, Chung YW, Lin WY, Wang JC, Tsai FJ, Tsai CH. Collagen type 3 alpha 1 polymorphism and risk of pelvic organ prolapse. *Int J Gynecol Obstet*. 2008; 103:55-8.
13. McIntosh LJ, Millett VT, Frahm JD, Richardson DA, Evans MI. Gynecologic disorders in women with Ehlers-Danlos syndrome. *J Soc Gynecol Investig*. 1995; 2:559-64.

14. Carley ME, Schaffer J. Urinary incontinence and pelvic organ prolapse in women with Marfan or Ehlers Danlos syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182:1021-3.
15. Novara G, Galfano A, Secco S, Ficarra V, Artibani Walter. Prolapse surgery: an update. *Curr Opin Urol.* 2007; 17(4):237-41.
16. De Ridder D. Should we use meshes in the management of vaginal prolapse? *Curr Opin Urol.* 2008; 18(4):377-82.
17. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obst Gynecol.* 1997; 89:501-6.
18. DeLancey JOL. The hidden epidemics of pelvic floor dysfunction: achievable goals for improved prevention and treatment. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192:1488-95.
19. Chen CC, Ridgeway B, Paraiso MF. Biologic grafts and synthetic meshes in pelvic reconstructive surgery. *Clin Obstet Gynecol.* 2007; 50:383–411.
20. Baessler K, Maher CF. Mesh augmentation during pelvic-floor reconstructive surgery: risks and benefits. *Current Opinion in Obstet and Gynecol.* 2006, 18:560-6.
21. Riccetto C, Myiaoka R, de Fraga R, Barbosa R, Dambrós M, Teixeira A, Palma P. Impact of the structure of polypropylene meshes in local tissue reaction: in vivo stereological study. *Int Urogynecol J.* 2008; 19(8):1117-23.

22. 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.
23. Amid PK, Lichtenstein IL, Shulman AG, Hakakha M. Biomaterials for “tension-free” hernioplasties and principles of their applications. *Minerva Chir.* 1995; 50:821–6.
24. Humberto Hott A, Roberto Iglesias R, Emil Schneider B, Denise Anrique C, Carola Villanueva M, Gonzalo Valdevenito A. Reparación de prolapso vaginal anterior com malla de prolene. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 2007; 72(2):120-4.
25. Tayrac R, Picone O, Chauveaud LA, Fernández H. A two-year anatomical and functional assessment of transvaginal rectocele repair using a polypropylene mesh. *J Urogynecol.* 2005; 17:100-5.
26. 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.
27. Sola V, Pardo J, Ricci P, Guilloff E. Tension Free Monofilament Macropore Polypropylene Mesh (Gynemesh PS) in Female Genital Prolapse Repair. *Int Braz J Urol.* 2006; 32:410-5.
28. Krause HG, Goh JTW. Biomechanical properties of graft materials employed for pelvic floor reconstructive surgeries. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology.* 2009; 21:419–23.

29. Davila GW, Baessler K, Cosson M, Cardozo L. Selection of patients in whom vaginal graft use may be appropriate. Consensus of the 2nd IUGA Grafts Roundtable: optimizing safety and appropriateness of graft use in transvaginal pelvic reconstructive surgery. *Int Urogynecol J*. 2012; 23 Suppl 1:S7-14.
30. Chermansky CJ, Winters JC. Complications of vaginal mesh surgery. *Curr Opin Urol*. 2012; 22(4):287-91.
31. Elliott DS. Con: Mesh in vaginal surgery: Do the risks outweigh the benefits? *Curr Opin Urol*. 2012; 22(4): 276-81.
32. Moretti AI, Pinto FJ, Cury V, Jurado MC, Marcondes W, Velasco IT, Souza HP. Nitric oxide modulates metalloproteinase-2, collagen deposition and adhesion rate after polypropylene mesh implantation in the intra-abdominal wall. *Acta Biomater*. 2012; 8(1):108-15.
33. Scheidbach H, Tannapfel A, Schmidt U, Lippert H, Köckerling F. Influence of titanium coating on the biocompatibility of a heavyweight polypropylene mesh. *Eur Surg Res*. 2004; 36:313-17.
34. Miaadi N, Ferhi K, Descargue G, Grise P. Traitement des prolapsus vaginaux antérieurs par voie vaginale avec implant de collagène ET fixation transobturatrice. *Prog Urol*. 2005; 15:1110-3.
35. Guerrete N, Peterson TV, Aguirre OA, VanDrie DM, Biller DH, Davila GW. Anterior repair with or without collagen matrix reinforcement. A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 2009; 114(1):59-65.

36. Tayrac R, Alves A, Thérin M. Collagen-coated vs noncoated low-weight polypropylene meshes in a sheep model for vaginal surgery. A pilot study. *Int Urogynecol J*. 2007; 18:513-20.
37. Kuiper N, Gabriel N, Griffiths S, Tew S. Shaping and sensing the extracellular matrix. *Int J Exp Path*. 2008; 89:A1-A29.
38. Louie LK, Yannas IV, Hsu HP, Spector M. Healing tendon defects implanted with a porous collagen-GAG matrix: histological evaluation. *Tissue Eng*. 1997; 3(2):187-96.
39. Oliveira ALR, Vidal BC, Langone F. Naturally supraorganized collagen increase axonal regeneration after tubulization repair. *Braz J Morphol Sci*. 2005; 22(3):143-8.
40. Vidal BC. From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*. 1995; 318:831-6.
41. Vidal BC. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. *Micron*. 2003; 34:423-32.
42. Vidal BC. Form birefringence as applied to biopolymer and inorganic material supraorganization. *Biotechnic and Histochemistry*. 2010; 85(6):365-378.
43. Knapp TR, Luck E, Daniels JR. Behavior of solubilized collagen as a bioimplant. *J. Surg. Res* 1977; 23:96-105.
44. Hay ED. Extracellular matrix. *J. Cell Biol*. 1981; 91:205-9.

45. Bornstein P, Piez KA. The nature of the intramolecular cross-links in collagen. *Biochemistry*. 1966; 5:3460-63.
46. Takeda T, Isawa M, Koeda T, Shibata U. Laboratory studies of collagen wound dressing. *J Dermatol*. 1983; 10:475-8.
47. Chvapil M; Kronenthal RL; Van Winkle W.Jr. Medical and surgical application of collagen. *Int. Rev. Conn. Tissue Res*. 1973; 6:1-15.
48. Davison PF, Levine L, Drake MP, Rubin AL, Bump S. The serologic specificity of tropocollagen telopeptides. *J. Exp. Med*. 1967; 126:331-37.
49. Senyk G, Michaeli D. Induction of cell-mediated immunity and tolerance to homologous collagen in guinea pigs: demonstration of antigen-reactive cellsfor a cell-antigen. *J Immunol*. 1973; 111:1381-8.
50. Dawson RC, Krisht AF, Barrow DL, Joseph GI, Shengelaia GG, Bonner G. Treatment of experimental aneurysms using collagen-coated microcoils. *Neurosurg*. 1995; 36:133-39.
51. Riccetto CLZ, Novaski GL, Palma PCR, Dambros M, Thiel M, Vidal BC. New biocompatible highly purified collagen gel for therapeutic renal artery embolization. *Urology*. 2006; 67:851-54.
52. Palma PCR, Vidal BC, Riccetto CLZ, Herrmann V, Dambros M, Thiel M, Netto Jr NR. Effect of purified collagen on lipograft survival: Experimental basis for periurethral lipoinjections. *J Endourology*. 2003; 17(4):255-9.
53. Cooke A, Oliver RF, and Edward M. An in vivo cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *Br J Exp Pathol*. 1983; 64:172–6.

54. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005; 21:775-7.
55. Wolfensohn S, Lloyd M. Handbook of laboratory animal management and welfare. 2nd ed. London: Ed. Blackwell science. 1998; p.179-87.
56. Martins PALS, Jorge RMN, Ferreira AJM. A comparative study of several material models for prediction of hyperelastic properties: Application to Silicone-Rubber and Soft Tissues. *Strain*. 2006; 42:135-147.
57. Piedade SR, Del Fabbro IM, Vidal BC, Gamba R. Uniaxial Traction Test on Human Gracilis and Semitendinous Tendon. *Acta ortop bras*. 2001; 9(1):5-11.
58. Palma PCR, Marques P, Vidal BC, Riccetto CLZ, Dambros M, Netto NRJr. Histopathological alterations resulting from subcutaneous implant of collagen and autologous aponeurotic fascia: a comparative study in dogs. *Int Braz J Urol*. 2001a; 27(2):171-7.
59. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Inflamação Aguda e crônica. In: *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. 8^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier editor. 2010; 43-77.
60. Vidal BC. Evaluation of the carbohydrate role in the molecular order of collagen bundles: microphotometric measurements of textural birefringence. *Cell Mol Bio*. 1986; 32(5):527-35.
61. Vidal BC, Mello MLS. *Biologia Celular*. 1a ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1986.

62. Haskell RC, Carlson FD, Blank OS. Form birefringence of muscle. *Biophys J*. 1989; 56(8):401-13.
63. Leal LHM. Fundamentos de microscopia. 1a ed. Rio de Janeiro: EdUER J; 2000.
64. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa, 1ª ed. Rio de Janeiro: Instituto Antônio Houaiss; Ed. Objetiva Ltda. 2009; Anisotropia p.139.
65. Vidal BC, Mello ML. Optical anisotropy of collagen fibers of rat calcaneal tendons: Na approach to spatially resolved supramolecular organization. *Acta Histochemica*. 2010; 112: 53-61
66. Vidal BC. The part played by proteoglycans and structural glycoproteins in the macromolecular orientation of collagen bundles. *Cell Mol Biol*. 1980; 26:415-21.
67. Vidal BC. Métodos em Biologia Celular. *Biologia Celular* 1ª. Ed São Paulo: Atheneu; 1987. p.5-34.
68. Vidal BC. Image analysis of linear dichroism in collagen-nano-silver complexes. *Microscopy Analysis*. 2003; 97:21-3.
69. Vidal BC. Reticulin morphometry and collagen fibers optical anisotropy as assessed by image analysis after silver impregnation. *Braz J Morphol Sci*. 2003; 20(3):165-70.
70. Vidal BC, Mello MLS. Structural organization of collagen fibers in chordae tendineae as assessed by optical anisotropic properties and fast fourier transform. *J Struct Bio* 2009; 167:166-75.

71. Schlammadinger J, Joo P, Bogner GI, Módos L. Birefringence of cells grown in vitro and of mitotic chromosomes after staining with picosirius red. *Braz J Morphol Sci.* 2005; 22(2):105-11.
72. Gathercole LJ, Keller A, Shah JS. The periodic wave pattern in native tendon collagen: correlation of polarizing with scanning electron microscopy. *J Microsc.* 1974; 102(Pt 1):95-105.
73. Landowne D. Molecular motion underlying activation and inactivation of sodium channels in squid giant axons. *J Membr Biol.* 1985; 88(2):173-85.
74. Vilarta R, Vidal BC. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix.* 1989; 9(1):55-61.
75. Vidal BC, Bozzo L. Variation of birefringence of the collagen fibers. *Rev Biol Oral.* 1966; 4:1-7.
76. Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Medical device technology.* 2003;14(8):10-3.
77. Shepherd JP, Feola AJ, Abramowitch SD, Moalli PA. Uniaxial biomechanical properties of seven different vaginally implanted meshes for pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J.* 2012; 23:613–20.
78. Afonso JS, Martins PALS, Girão MJB, Natal Jorge RM, Ferreira AJM, Mascarenhas T, Fernandes AA, Bernardes J, Baracat EC, Rodrigues de Lima G, Patrício B. Mechanical properties of polypropylene mesh used in pelvic floor repair. *Int Urogynecol J.* 2008; 19:375-80.

79. Kubricht WS, Williams J, Eastham JA, Veneble DD. Tensile strength of cadaveric fascia lata compared to small intestinal sub mucosa using suture pull through analysis. *J Urol*. 2001; 165:486-90.
80. Dietz HP, Vancaillie P, Svehla M, Wash W, Steensma AB, Vancaillie TG. Mechanical properties of urogynecologic implant materials. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2003; 14:239-43.
81. Choe JM, Kothandapani R, James L, Bowling D. Autologous cadaveric and synthetic materials used in sling surgery: comparative biomechanical analysis. *Urology*. 2001; 58:482–6.
82. 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*. 2007; 51:1364-75.
83. Siniscalchi RT, Palma PCR, Riccetto CLZ, Maciel LC, Ens G, Dal Fabbro IM. Efectos biomecánicos de la inclusión de orificios facilitadores de la integración en mallas de polipropileno monofilamento: estudio experimental. *Actas Urol Esp*. 2011; 35:599-604.
84. Paulo PCR, Siniscalchi RT, Maciel LC, Bigozzi MA, Dal Fabbro IM, Riccetto CLZ. Primary fixation of mini slings: a comparative biomechanical study in vivo. *Int Braz J Urol*. 2012; 38:258-66.
85. Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *J Controlled Release*. 2002; 78:211–8.

86. Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: Where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed. Eng.* 2004; 6:41–75.
87. Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomed Mater.* 2006; 1:R1–R9.
88. 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.
89. Petros P. Medium-term follow-up of the intravaginal *slings*plasty operation indicates minimal deterioration of urinary continence with time. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1999; 39:354-7.
90. Ulmsted U, Falconer C. Connective tissue in female urology incontinence. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999; 11:509-15.
91. Hunt JA, Williams DF. Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials.* 1995; 16:167-70.
92. Hetrick EM, Schoenfisch MH. Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials.* 2007; 28:1948–56.
93. 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.
94. Bogusiewicz M, Wrobel A, Jankiewicz K, Adamiak A, Skorupski P, Tomaszewski J, Rechberger T. Collagen deposition around polypropylene

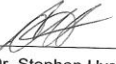
- tapes implanted in the rectus fascia of female rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2006; 124:106–9.
95. Biondo-Simões MLP, Westphal VL, de Paula JB, Borsato KS, Noronha L. Collagen synthesis after the implantation of polypropylene nets in the abdominal wall of young and old rats. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005; 20 (4): 300-4.
 96. 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.
 97. Almeida SHM, Rodrigues MAF, Gregório E, Crespício J, Moreira HA. Influence of sling material on inflammation and collagen deposit in an animal model. *Int J Urol*. 2007; 14:1040–43.
 98. Cooke A; Oliver RF; Edward M. An in vivo cytotoxicity study of aldehyde-treated pig dermal collagen. *Br J Exp Pathol*. 1983; 64:172-6.
 99. Costable EC. Molecule, assemble thyself! *Nature*. 1993; 362:412-3.
 100. McPherson JM, Sawamura S; Armstrong R. An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants. *J Biomed Mat Res*. 1986, 20:93-107.
 101. Vidal BC, Joazeiro P. Electron microscopy determination of silver incorporation in collagen fibers as model of organic-metal chiral supramolecular structure with optical anisotropic properties. *Microm*. 2002; 33:507-9.

102. Vidal BC Mello MLS, Godo C, Caseiro FAC, Abujadi LM. Anisotropic properties of silver plus gold impregnated collagen bundles: ADB and forma birefringence curves. *Ann. Histochem.* 1975; 20:15-26.
103. Cervigni M; Natale F; La Penna C; Saltari M; Padoa A; Agostini M. Collagen-coated polypropylene mesh in vaginal prolapse surgery: an observational study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 156(2):223-7.
104. Huffaker RK, Muir TW, Rao A, Baumann SS, Kuehl TJ, Pierce LM. Histologic response of porcine collagen-coated and uncoated polypropylene grafts in a rabbit vaginal model. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198(582):1–7.
105. Tayrac R, Devolvere G, Renaudie J, Villard P, Guilbaud O, Eglin G. Prolapse repair by vaginal route using a new protected low-weight polypropylene mesh: 1-year functional and anatomical outcome in a prospective multicentre study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2007; 18:251-6.
106. Van't Riet M, Burger JM, Bonthuis F, Jeekel J, Bonjer HJ. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating: a randomized controlled study in a rat model of ventral hernia repair. *Surg Endosc.* 2004; 18:681-5.
107. Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Raymundo SRO, Chaves H, Hussain KMK. Malhas de polipropileno recobertas com colágeno polianiónico ou com dupla camada com poli (cloreto de vinila) para reconstrução da parede abdominal. *Rev Bras Eng Biom.* 2001; 17(2):69-78.

108. Provenzano PP, Vanderby R. Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 2006; 25:71-84.
109. Huiling J, Dailey T L, Long V, Chien EK. Androgen-regulated cervical ripening: a structural, biomechanical and molecular analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198:543.e1-543.e9.

8. Anexos

8.1. Anexo 1. Parecer da Comissão de Ética na experimentação Animal

	
Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEAA/Unicamp	
CERTIFICADO	
Certificamos que o Protocolo nº <u>1972-1</u>, sobre "<u>Efeitos biomecânicos e histológicos do recobrimento de tela de polipropileno com gel purificado de colágeno: estudo experimental</u>", sob a responsabilidade de <u>Prof. Dr. Cássio Luís Zanettini Ricetto / Rodrigo Teixeira Siniscalchi</u>, 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 – CEEAA/Unicamp em <u>05 de outubro de 2009</u>.	
CERTIFICATE	
We certify that the protocol nº <u>1972-1</u>, entitled "<u>Biomechanical and histological effects of coating a polypropylene mesh with a purified collagen gel: experimental study</u>", 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 <u>October 5, 2009</u>.	
Campinas, 05 de outubro de 2009.	
 _____ Prof. Dr. Stephen Hyslop Vice-Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
CEEAA – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-8369 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/

8.2. Anexo 2. Relatório Técnico de Esterelização



RELATÓRIO TÉCNICO: TESTE DE COMPATIBILIDADE

RT N°: TES.RT.0092.09

1. CLIENTE: Rodrigo Teixeira Siniscalchi

2. DESCRIÇÃO DO PRODUTO:

- ✓ Telas de Polipropileno Cobertas com Colágeno / Frasco com Colágeno.
- ✓ Quantidade: 04 volumes de amostras para teste.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL:

Com o objetivo de avaliar a compatibilidade do material em relação à radiação ionizante (raios gama – Co - 60) as amostras foram submetidas à dose de 25 kGy, conforme solicitação do cliente.
A embalagem recebeu selo radiossensível, indicativo de processo (amarelo-não tratado; laranja a vermelho – tratado).

4. DOSIMETRIA

Dose absorvida pelo produto: Ver dados acima Tipo de dosímetro: Red Perspex

Fabricante: Harwell Dosimeters (UK) Batch n°: KK

5. ESPECTROFOTÔMETRO

Fabricante: Spectronic Instruments

Modelo: Harwell Dosimeters (UK) Comprimento de Onda (nm): 640 nm

6. CONCLUSÃO

O processamento teve início às 17h50min do dia 08/10/2009 e foi finalizado no dia 09/10/2009 às 03h12min.
O tratamento foi realizado no sistema de transporte.
Produto destinado à pesquisa.

7. ORDEM DE SERVIÇO INTERNA: TES.OS.0092.09

8. DATA DE REALIZAÇÃO DO PROCESSO: 08/10/2009

9. RESPONSÁVEL:

Nome: Daniela Paquer (Técnica de Nível Superior)

Ass.:

8.3. Anexo 3. Análise estatística dos testes realizados com as telas antes do implante

Aplicando-se Mann Whitney Rank Sum Test

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	35,30866	35,8796	0.686546	0.5476
PLP	5	35,04153	35,1931		

Carga Máxima (CM) medida em Newtons (N)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	37,91009	37,3747	-0,664829	1
PLP	5	37,98460	38,0395		

Deflexão até CM, medida em milímetros (mm)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	0,577736	0,573648	0,0498	0,4206
PLP	5	0,539635	0,523848		

Trabalho até a carga máxima, medido em joules (J)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	2584,812	2632,44	146,323	0,4206
PLP	5	2420,948	2486,11		

Consistência do material, medida em Newtons por metro (N/m)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	6,467483	6,47565	0,009902	0,5476
PLP	5	6,362598	6,46575		

Carga na Ruptura, medida em Newtons (N)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	42,62778	42,4758	-0,0890083	1
PLP	5	42,70488	42,5649		

Deflexão até a ruptura, medida em milímetros (mm)

	N	Média	Mediana	Diferença Mediana	"p" value
PLP + C	5	0,615798	0,618375	-0,0528467	0,1508
PLP	5	0,658249	0,671221		

Trabalho até a ruptura, medido em joules (J)

8.4. Anexo 4 – Valores brutos medidos de Carga Máxima (N) nos tempos

7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
PLP + C	PLP	PLP + C	PLP	PLP + C	PLP	PLP + C	PLP
12,17057	10,45118	17,73194	14,89669	24,64877	21,83645	25,49697	23,86905
11,84536	9,588126	19,01493	16,98121	25,12084	22,37042	25,87961	23,27486
12,19774	8,506523	18,90963	16,31587	27,12453	23,89651	26,57484	22,67594
10,86165	8,149104	19,86104	15,13667	25,63879	21,43502	24,38596	22,19476
13,32221	11,78012	18,34327	16,42526	23,24444	20,98715	23,20594	21,19306

Valores de Carga Máxima (N)

8.5. Anexo 5 – Estudo Histológico(anatomopatológico) – Descrição da amostra

INFLAMAÇÃO CRÔNICA								
	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C
1	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Leve	Ausente	Ausente	Ausente
2	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Intensa	Intensa	Intensa	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente

TECIDO DE GRANULAÇÃO								
	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C
1	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Leve	Ausente	Ausente	Ausente
2	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Intensa	Moderada	Moderada	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Intensa	Moderada	Intensa	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente

REAÇÃO DE CORPO ESTRANHO								
	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C
1	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
2	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
3	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
4	Moderada	Moderada	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
5	Moderada	Leve	Moderada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve

FORMAÇÃO DE GRANULOMA								
	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C
1	Modrada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
2	Modrada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
3	Intensa	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve
4	Modrada	Modrada	Modrada	Modrda	Leve	Leve	Leve	Leve
5	Modrada	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve	Leve

INFLAMAÇÃO AGUDA								
	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C	PLP	PLP +C
1	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
4	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
5	Leve	Ausente	Leve	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

8.6. Anexo 6 – Medidas de Birrefringência – Descrição da amostra (Pixel)

	7 DIAS		14 DIAS		90 DIAS		180 DIAS	
	PLP	PLP+C	PLP	PLP+C	PLP	PLP+C	PLP	PLP+C
1.	76,534	110,257	164,887	138,564	77,626	57,311	106,673	94,331
2.	78,393	82,193	103,091	138,897	94,340	73,049	113,869	101,187
3.	74,531	77,613	101,722	136,348	75,843	59,254	115,149	87,833
4.	62,253	90,209	99,155	114,195	108,925	85,449	117,508	89,650
5.	82,990	78,098	113,416	137,685	83,517	74,781	83,833	99,119
6.	71,842	81,336	96,831	121,866	81,774	110,750	86,271	95,919
7.	93,346	80,381	92,385	142,837	92,321	96,463	81,200	81,289
8.	83,004	79,929	104,287	138,770	95,838	109,665	99,529	100,910
9.	87,146	93,926	92,913	128,583	92,830	93,649	84,558	75,333
10.	69,297	101,238	92,583	124,551	91,003	108,452	90,000	106,572
11.	97,400	86,725	102,426	132,415	104,988	84,996	83,778	102,647
12.	61,545	75,975	98,868	119,626	111,738	89,231	109,785	85,012
13.	70,964	83,904	144,995	130,417	85,553	79,732	122,844	89,031
14.	109,048	78,652	93,400	135,202	99,999	85,699	128,807	98,799
15.	94,519	88,161	150,402	129,782	89,832	94,736	83,302	65,791
16.	103,739	73,363	106,158	140,704	90,810	105,774	84,455	136,139
17.	78,813	73,092	91,200	144,367	80,404	83,990	103,585	81,785
18.	64,469	79,461	99,133	118,380	101,507	92,990	82,778	80,970
19.	68,565	111,277	100,167	127,669	75,625	65,286	94,151	87,972
20.	110,363	78,036	94,063	137,193	126,896	64,851	88,500	106,575
21.	77,558	92,714	123,551	107,640	93,220	92,623	98,196	108,374
22.	84,928	78,986	112,278	114,720	105,455	77,372	86,273	102,435
23.	84,204	88,881	99,143	143,669	128,326	90,311	83,786	99,308
24.	63,002	75,259	103,529	114,798	89,231	73,114	83,526	96,182
25.	91,658	78,915	105,106	111,872	91,380	92,822	86,547	89,566
26.	130,810	79,518	112,444	116,432	107,891	116,101	84,267	89,307
27.	81,589	92,468	101,151	148,410	96,439	103,184	135,942	103,717
28.	78,858	92,922	100,333	130,000	101,143	79,597	75,719	101,508
29.	68,978	92,965	139,934	139,109	76,006	99,216	71,189	95,894
30.	91,369	79,544	131,903	126,361	104,189	76,152	77,722	85,486
31.	110,149	82,392	110,261	107,539	78,751	116,617	89,417	80,958
32.	91,655	77,491	134,595	134,875	101,713	109,149	88,568	109,514
33.	75,349	73,879	107,625	118,222	99,668	96,624	70,415	96,600
34.	70,195	84,566	116,661	131,567	126,168	98,873	77,479	89,781
35.	77,933	85,781	126,367	114,382	132,410	82,913	81,720	89,749
36.	73,900	97,583	119,755	131,030	89,957	127,706	77,478	99,370
37.	65,938	107,021	143,157	138,759	113,537	91,118	74,353	87,709
38.	86,121	79,984	112,322	126,649	92,237	112,767	84,528	100,787
39.	69,457	106,482	94,667	130,719	93,951	78,166	73,829	82,659
40.	75,617	98,029	103,387	135,614	120,956	101,534	69,155	90,716
41.	85,226	101,914	94,368	113,271	98,204	80,361	78,188	86,265
42.	68,658	81,483	107,846	127,640	127,216	79,220	75,654	83,662
43.	95,931	75,551	100,447	138,863	94,933	103,003	77,175	94,988
44.	90,159	119,511	96,440	131,595	95,652	79,551	70,615	90,856
45.	96,641	93,351	106,604	142,083	90,728	68,249	104,751	99,223
46.	110,157	95,292	94,800	124,778	99,738	84,266	74,132	86,451
47.	70,783	119,424	91,471	111,313	84,928	78,802	70,923	111,589
48.	74,870	109,266	94,364	115,877	92,919	67,817	76,145	100,679

49	103,908	101,983	97,474	110,946	44,648	66,222	74,893	97,324
50	84,917	82,684	121,290	134,227	64,609	65,073	84,740	97,020
51	83,039	79,951	97,100	113,080	40,164	91,621	68,703	83,483
52	109,389	49,764	97,583	116,615	38,873	112,849	79,552	94,058
53	80,921	57,227	96,083	137,321	37,597	75,007	73,784	113,482
54	83,835	59,092	93,600	130,853	33,513	88,915	71,365	97,026
55	98,848	77,653	102,471	133,677	33,724	96,311	81,736	93,423
56	77,800	69,600	103,667	134,388	32,971	115,497	77,507	88,735
57	88,713	51,588	97,500	130,764	34,236	73,971	87,956	86,750
58	96,566	58,715	98,000	148,833	36,247	70,413	109,788	89,761
59	67,315	76,909	99,733	129,062	38,869	74,012	68,333	86,278
60	91,769	59,584	100,231	121,923	31,699	87,627	64,923	89,791
61	116,920	63,814	100,226	109,578	50,619	82,222	65,250	82,889
62	90,143	55,185	94,286	127,657	40,098	61,393	69,500	84,935
63	82,250	59,136	96,231	129,630	36,443	65,931	81,463	127,214
64	66,614	71,925	102,833	119,764	42,075	88,713	67,118	90,105
65	85,544	68,728	98,647	112,479	59,799	59,304	66,061	129,334
66	96,899	59,524	139,077	130,995	49,596	73,085	69,591	92,130
67	77,334	89,682	99,316	139,576	131,562	68,405	105,856	129,514
68	103,707	68,051	95,647	134,637	100,389	68,954	70,338	118,660
69	98,156	63,641	98,355	110,925	76,246	67,015	64,063	102,318
70	66,345	69,492	128,035	131,459	104,528	113,284	67,329	75,071
71	84,792	67,298	118,928	124,793	132,524	88,315	66,156	72,935
72	83,794	60,073	106,091	128,686	78,639	123,505	64,600	77,496
73	124,195	62,079	117,463	115,890	85,938	80,490	75,271	85,754
74	106,596	55,183	110,032	140,358	72,759	66,905	64,667	66,110
75	90,195	58,724	98,846	130,531	86,225	82,707	65,125	95,651
76	112,643	61,950	99,000	139,993	82,840	69,101	81,480	83,168
77	101,710	55,997	98,278	139,801	99,566	84,069	65,120	110,611
78	81,625	52,031	106,500	142,574	96,857	69,734	72,951	98,808
79	112,118	55,196	97,765	146,784	73,212	72,618	76,171	73,538
80	103,692	61,879	93,629	146,429	97,734	64,592	66,991	105,697
81	119,770	64,861	93,273	137,618	72,356	81,128	66,760	100,269
82	73,309	58,216	102,594	147,513	102,154	117,909	68,120	94,362
83	80,548	63,067	93,600	134,645	77,357	70,928	81,955	80,481
84	138,366	56,619	93,833	132,527	88,080	80,380	67,826	97,041
85	81,745	53,843	98,807	158,882	83,750	66,628	65,438	112,181
86	76,990	54,490	98,194	123,938	100,614	61,254	65,545	78,351
87	85,519	62,908	98,026	143,789	82,326	111,880	86,103	92,937
88	149,361	49,776	98,071	151,754	79,205	100,168	70,032	66,470
89	88,043	69,894	108,320	157,500	87,532	67,890	64,100	90,393
90	112,081	75,932	117,391	153,888	112,541	58,513	72,613	91,110
91	121,889	53,370	95,870	126,217	87,809	89,458	73,581	77,166
92	128,816	58,042	124,204	141,146	137,549	64,647	67,000	92,275
93	128,364	57,306	93,600	146,710	78,624	66,821	67,143	90,337
94	125,670	57,924	99,727	153,438	101,709	59,498	68,588	81,822
95	97,768	82,448	104,500	142,430	81,000	140,791	93,845	85,252
96	117,837	55,084	113,855	145,585	87,052	82,493	68,759	83,094
97	106,283	67,075	179,789	141,783	103,854	66,722	64,818	94,396
98	127,300	73,915	178,769	118,044	93,013	69,980	82,172	97,236
99	125,872	70,117	169,619	128,063	77,760	67,873	72,029	86,287
100	91,267	74,496	157,525	122,989	67,578	70,941	66,029	79,417
101	106,816	58,804	161,059	129,636	80,841	66,582	66,226	101,367
102	90,552	58,154	166,770	136,842	70,910	69,265	100,102	96,827

103	118,260	62,191	169,896	121,342	65,688	72,151	74,048	84,076
104	99,689	56,970	167,133	156,008	65,036	79,161	66,542	68,582
105	122,596	73,205	170,787	154,573	73,741	113,599	72,819	110,153
106	123,796	58,886	166,762	190,772	96,286	91,979	67,500	90,178
107	125,022	67,109	169,870	180,598	65,770	111,457	66,000	89,439
108	113,055	58,465	156,781	189,353	66,874	118,989	92,557	94,369
109	120,596	67,419	146,522	159,867	75,422	89,727	67,154	95,979
110	116,047	62,148	163,010	173,162	66,244	129,177	103,535	97,158
111	134,900	56,915	161,146	175,097	67,067	76,987	77,722	93,548
112	124,380	56,333	169,959	171,783	69,155	82,105	89,702	102,100
113	103,261	60,737	158,320	189,027	74,067	106,914	63,643	79,835
114	104,883	51,320	172,772	151,588	68,984	82,654	66,688	86,101
115	115,223	61,214	174,243	172,010	64,039	118,929	65,357	113,054
116	106,673	59,847	154,727	185,350	63,675	117,259	64,133	79,123
117	88,959	62,590	162,550	135,016	72,972	77,272	65,875	75,896
118	119,849	65,442	164,631	127,102	90,301	88,498	65,429	96,693
119	90,401	76,707	173,246	125,228	65,462	115,489	109,456	99,332
120	111,370	65,092	161,247	140,768	71,228	93,104	65,077	87,381
121	104,459	81,335	171,012	133,300	68,097	92,393	66,067	90,667
122	99,723	68,620	160,732	153,463	75,366	102,772	75,785	110,297
123	109,321	61,242	177,809	148,401	106,551	79,318	72,813	83,412
124	101,698	51,112	172,629	152,382	72,958	127,224	72,792	78,024
125	110,793	57,386	169,063	118,735	75,928	93,210	89,953	84,583
126	107,983	60,692	172,952	126,703	76,765	120,622	73,182	75,754
127	107,119	51,860	166,994	154,678	77,920	101,955	65,516	92,738
128	125,295	57,052	166,131	131,313	68,413	105,060	63,714	99,358
129	106,560	59,095	164,200	129,630	73,189	81,210	64,880	96,047
130	139,018	66,015	171,616	127,184	75,924	86,178	77,903	87,640
131	113,328	70,443	168,680	125,201	67,291	95,484	78,004	76,849
132	94,138	81,281	176,704	144,508	68,717	77,454	64,192	81,155
133	101,179	56,330	167,449	116,752	66,806	99,683	72,682	75,443
134	120,041	64,911	157,423	132,243	117,114	113,932	65,273	81,471
135	97,103	66,382	177,149	128,264	91,628	92,820	66,703	102,175
136	95,284	96,900	171,729	125,566	94,068	84,676	65,400	103,814
137	138,767	64,085	172,583	130,034	120,523	81,931	73,538	71,088
138	88,851	92,694	179,168	138,123	64,758	75,528	68,500	109,492
139	116,660	53,495	170,768	125,008	68,014	113,289	80,382	84,232
140	127,171	65,988	172,281	148,296	107,200	103,607	64,091	91,952
141	142,380	62,449	167,087	153,530	61,138	110,355	70,188	87,905
142	110,058	53,534	153,171	125,714	70,746	101,613	68,809	106,451
143	97,974	51,345	144,766	143,344	69,253	117,399	66,092	95,306
144	102,838	61,302	122,070	135,186	83,663	84,411	68,188	78,165
145	111,383	66,013	152,325	134,868	82,696	81,023	64,773	88,565
146	100,711	60,940	146,996	139,294	87,820	101,797	75,969	72,781
147	97,081	58,855	143,128	137,418	79,583	86,483	64,739	117,282
148	72,562	59,375	122,007	133,943	99,530	89,648	66,077	90,161
149	65,379	55,683	138,813	150,141	106,448	113,563	88,632	110,103
150	83,352	50,515	121,221	166,613	77,838	133,468	90,014	102,058
151	88,190	62,511	152,632	122,299	90,763	106,003	64,455	101,914
152	67,126	52,563	141,077	151,482	96,275	77,941	67,371	87,299
153	65,285	54,795	157,249	141,151	67,671	100,106	90,035	65,690
154	49,667	56,568	131,535	162,597	63,430	78,187	66,059	80,501
155	80,312	65,721	150,607	160,439	99,129	91,263	65,700	99,405
156	66,550	57,185	138,303	155,419	66,403	78,622	66,638	83,980

157	64,430	61,294	152,055	148,997	115,132	98,761	111,171	91,973
158	78,497	51,580	125,361	162,429	76,327	111,487	93,519	77,782
159	62,095	52,097	107,114	162,142	58,284	88,033	82,509	103,178
160	66,858	56,089	144,238	167,175	69,633	77,908	80,969	81,332
161	96,489	54,863	124,253	151,038	67,693	105,364	107,162	73,050
162	79,455	57,448	116,760	167,568	80,491	81,213	82,795	69,492
163	99,918	61,745	127,822	165,009	63,092	81,259	80,937	80,566
164	53,951	54,892	131,224	160,853	74,904	77,860	94,239	102,313
165	84,162	57,414	125,013	171,196	68,367	112,869	96,623	103,838
166	57,644	52,351	133,083	165,616	85,180	76,016	90,521	106,760
167	74,363	57,859	144,297	164,978	52,962	113,976	96,462	108,177
168	67,945	56,691	110,697	165,612	51,826	92,640	84,798	97,946
169	58,854	77,097	115,429	154,451	55,826	97,543	78,831	92,948
170	55,266	54,422	127,705	155,408	48,068	119,828	100,584	69,631
171	64,541	69,121	133,864	153,836	76,374	87,108	90,680	98,705
172	51,114	54,343	139,385	162,645	63,794	85,765	79,658	81,988
173	59,945	60,590	119,407	158,678	58,402	87,205	93,351	82,207
174	118,913	61,687	126,762	161,672	95,832	96,269	113,981	103,664
175	91,909	61,116	136,736	169,339	49,173	89,709	77,492	98,212
176	58,696	64,868	114,717	169,958	57,954	93,759	99,216	98,905
177	72,017	58,125	168,647	168,547	56,054	94,679	77,000	67,623
178	71,765	56,429	147,607	156,475	73,443	97,847	115,540	104,568
179	92,659	66,224	126,231	169,129	69,302	88,154	88,979	72,966
180	68,310	55,946	126,498	160,856	56,777	78,092	92,721	75,014
181	80,611	63,873	150,949	134,842	47,285	119,215	93,318	95,765
182	90,596	62,021	138,515	144,725	80,530	100,920	88,675	105,911
183	59,982	48,727	157,204	142,833	62,784	86,649	87,752	69,515
184	68,992	54,363	127,891	146,686	52,875	127,650	89,815	75,583
185	57,843	87,895	153,618	163,170	52,999	87,764	81,583	99,120
186	93,899	59,645	129,938	151,799	66,170	91,968	80,309	81,219
187	84,457	57,933	132,824	158,935	78,010	93,960	80,069	70,552
188	72,501	62,029	121,064	146,394	59,156	99,954	92,475	84,294
189	76,723	54,219	159,158	168,920	60,374	79,636	107,045	86,362
190	65,948	53,260	137,590	149,043	56,694	89,947	95,206	83,312
191	110,939	74,560	131,554	154,086	45,673	81,050	89,099	98,230
192	73,107	52,604	126,397	150,290	64,013	81,206	81,188	75,929
193	63,553	50,037	114,635	166,672	68,329	93,879	93,697	64,101
194	89,271	83,149	133,634	162,682	59,850	111,308	82,769	82,093
195	99,062	52,597	120,830	156,483	75,582	113,982	82,505	94,047
196	141,300	80,062	127,919	148,007	50,041	89,313	107,347	108,826
197	83,122	54,015	144,923	163,233	51,701	77,782	78,458	104,958
198	73,135	61,131	140,588	162,238	71,050	86,143	98,231	98,833
199	63,697	61,787	113,422	157,830	52,438	78,065	82,991	107,336
200	95,328	87,288	132,743	164,921	83,457	94,668	99,642	99,687
201	120,987	55,586	126,186	170,224	71,382	112,387	76,114	74,483
202	116,566	66,647	112,661	152,899	65,543	91,813	100,280	82,644
203	115,029	66,166	122,936	156,218	50,515	90,631	93,389	94,751
204	118,041	58,659	96,618	162,423	54,010	94,163	83,013	89,249
205	106,672	71,121	104,456	159,666	72,253	81,670	103,049	82,424
206	110,046	68,148	86,528	152,114	66,029	112,219	92,091	71,636
207	91,758	76,893	92,557	156,859	49,050	97,222	90,333	108,382
208	120,704	61,684	98,495	171,536	77,755	123,766	100,942	105,799
209	106,900	55,493	75,081	165,811	66,297	91,715	88,249	107,510
210	128,145	70,835	134,424	164,521	70,852	92,074	84,619	104,033

211	121,472	79,002	107,052	159,614	67,803	80,381	96,386	93,906
212	92,320	73,035	88,232	172,214	52,483	102,741	91,879	88,101
213	108,493	58,836	73,647	157,650	66,659	76,449	81,029	98,434
214	101,366	58,145	98,380	171,116	68,059	89,932	96,205	98,124
215	118,871	76,798	75,000	139,674	52,658	128,651	81,007	106,268
216	116,202	52,833	111,402	91,691	47,621	94,549	82,925	83,463
217	94,789	60,551	116,291	100,074	54,540	73,542	82,493	90,820
218	80,661	78,531	101,774	89,381	49,304	80,016	79,395	110,570
219	105,950	57,141	118,251	135,322	68,219	87,139	85,250	91,267
220	83,581	61,384	89,930	98,366	53,203	79,146	82,150	80,896
221	86,106	90,258	102,621	113,745	65,654	86,009	93,217	77,485
222	99,620	55,171	91,959	90,338	66,332	100,097	88,887	77,034
223	124,075	70,046	71,096	92,350	55,121	83,083	79,667	75,710
224	83,358	56,181	101,119	106,449	70,328	98,203	83,828	80,849
225	108,029	65,789	108,586	94,697	59,586	80,620	82,764	112,590
226	88,337	59,005	78,082	89,563	80,401	93,554	94,071	103,922
227	107,142	63,765	110,256	89,764	59,441	94,738	83,574	78,197
228	106,293	76,155	114,092	121,027	68,819	121,337	79,754	98,386
229	99,216	68,488	111,502	114,652	54,742	92,929	107,864	83,270
230	119,997	64,461	105,017	106,527	94,159	70,396	86,977	101,133
231	108,542	61,931	118,319	80,705	61,724	106,505	85,381	84,694
232	127,708	104,988	106,605	100,437	115,134	75,382	93,242	100,939
233	102,798	65,725	98,649	105,759	67,123	82,123	100,817	103,152
234	114,641	58,861	99,775	117,675	102,500	98,654	84,018	106,541
235	109,960	54,579	104,587	89,831	112,900	74,607	110,754	98,260
236	93,772	78,661	79,537	92,233	119,721	108,614	94,152	91,791
237	113,516	63,938	107,193	107,722	77,267	98,057	86,400	95,514
238	113,149	56,242	115,734	88,999	73,348	86,005	111,056	94,638
239	104,881	62,754	90,643	138,491	90,220	115,149	82,333	88,658
240	81,470	57,091	119,732	121,701	81,823	89,675	79,417	103,078
241	86,696	76,100	72,481	123,061	74,078	77,264	77,651	72,542
242	83,434	67,536	82,875	103,853	77,310	118,318	83,776	70,300
243	108,645	64,521	124,694	113,901	73,472	111,806	76,631	73,640
244	80,442	70,558	109,175	113,512	66,108	76,169	84,700	70,232
245	97,434	78,942	108,877	94,817	102,062	123,422	96,288	66,412
246	123,067	62,098	81,759	93,295	81,011	93,687	101,085	105,803
247	116,379	63,225	69,543	101,494	68,878	117,085	84,388	84,214
248	128,307	67,098	118,923	84,494	93,186	111,602	94,262	91,155
249	128,391	66,329	114,344	130,346	80,824	100,393	68,098	69,202
250	107,623	58,612	99,106	95,774	73,647	121,602	58,719	72,986
251	133,049	66,686	111,841	110,648	70,074	127,955	76,980	76,909
252	131,739	72,867	82,710	135,757	119,079	78,173	60,116	70,033
253	101,537	63,108	74,203	98,152	109,473	131,020	46,320	98,519
254	104,343	62,307	81,398	96,122	106,188	72,929	47,927	81,573
255	110,158	63,981	83,307	125,095	109,673	84,365	50,973	56,650
256	99,006	63,891	90,029	105,935	73,111	77,396	54,021	66,632
257	132,144	74,104	100,733	101,014	72,226	89,874	53,103	106,372
258	129,403	70,578	108,151	112,373	85,602	108,801	44,673	94,271
259	120,435	59,807	79,962	114,279	76,949	83,866	42,997	88,027
260	108,811	64,503	108,376	103,060	83,811	82,193	50,637	72,301
261	102,425	73,330	78,778	126,742	102,771	74,422	56,558	69,229
262	141,091	71,545	110,075	105,429	129,476	92,261	49,158	72,269
263	126,130	54,428	107,478	133,271	115,309	76,744	43,289	102,220
264	106,273	64,344	87,734	106,995	120,348	82,922	58,922	53,990

265	106,273	64,344	87,734	106,995	120,348	82,922	58,922	53,990
266	129,427	65,789	92,795	122,749	123,589	78,258	42,442	103,845
267	106,145	68,457	98,965	95,103	100,195	78,110	50,789	67,804
268	133,329	65,942	89,839	89,872	94,939	137,259	43,931	106,536
269	124,109	59,878	75,535	119,229	83,483	134,585	59,831	101,494
270	94,101	61,083	89,429	110,511	135,667	123,294	72,027	55,343
271	100,244	53,958	80,450	107,782	128,085	102,881	46,232	66,517
272	104,154	60,566	85,409	91,673	139,303	95,970	44,937	67,609
273	113,190	68,420	83,644	113,987	117,509	82,496	43,829	58,843
274	107,814	55,587	110,321	119,636	139,746	80,108	52,036	87,635
275	126,406	63,166	115,392	142,086	123,798	113,416	63,941	73,785
276	101,865	63,475	90,968	105,534	91,680	119,769	46,011	78,257
277	145,580	59,829	71,766	128,923	88,761	103,675	49,642	84,600
278	128,308	65,805	82,583	113,012	109,070	102,737	44,758	62,339
279	96,500	55,955	80,336	133,389	132,812	118,484	41,094	81,698
280	94,455	65,305	106,697	131,903	94,547	87,846	56,169	116,535
281	113,972	67,404	79,324	125,683	89,351	97,560	49,944	97,068
282	126,183	69,502	79,223	126,831	120,661	122,035	60,539	88,600
283	124,279	61,753	92,535	134,538	117,252	77,595	45,631	88,748
284	113,131	58,502	85,923	138,627	129,116	92,733	52,127	81,605
285	122,675	59,906	113,498	135,587	88,329	83,666	48,724	86,062
286	124,110	60,803	104,388	110,916	89,417	102,068	123,433	71,142
287	104,935	68,882	70,320	142,379	90,634	83,445	84,371	94,565
288	129,495	68,409	88,615	116,324	91,887	73,136	131,968	84,002
289	136,222	65,366	75,195	139,765	83,656	121,080	140,579	79,425
290	114,406	73,231	85,748	122,983	119,882	77,970	89,344	98,233
291	105,071	72,839	93,741	130,216	90,265	70,738	117,857	86,712
292	113,787	56,253	94,359	124,190	84,700	68,937	139,027	96,020
293	95,351	67,240	116,377	123,237	95,523	102,660	87,872	86,394
294	101,746	57,770	108,864	113,128	130,095	93,660	126,523	123,632
295	119,703	61,111	84,205	131,337	97,375	120,442	80,418	99,277
296	98,592	58,628	114,996	126,939	121,421	76,546	92,280	95,774
297	95,924	65,051	85,007	133,119	89,552	82,505	84,915	71,961
298	83,854	75,554	112,307	130,462	81,940	104,345	77,740	67,446
299	106,962	67,278	86,635	125,263	95,000	75,201	135,254	76,994
300	89,682	61,541	85,441	128,000	115,583	79,844	88,424	91,237
301	140,631	58,426	87,848	139,875	98,716	101,366	100,229	94,780
302	93,443	59,472	80,773	149,922	121,564	96,854	107,778	91,209
303	88,886	70,777	127,254	129,093	102,880	81,015	84,909	85,869
304	131,266	75,161	69,771	128,294	92,063	102,926	97,243	94,270
305	94,975	61,077	83,194	113,877	102,599	89,413	76,975	82,318
306	129,299	66,798	75,483	131,876	89,447	96,262	104,920	113,167
307	90,563	62,047	75,500	151,575	132,212	74,698	76,639	96,122
308	132,985	62,155	64,970	149,277	110,858	92,204	88,882	105,461
309	104,511	65,829	83,123	131,989	104,423	88,916	112,150	97,855
310	113,313	66,360	94,642	132,714	87,460	91,265	90,138	91,312
311	106,029	59,433	85,376	144,883	128,787	76,363	99,953	102,603
312	93,720	61,704	80,237	118,933	130,176	99,098	81,780	103,567
313	105,069	69,311	113,288	131,642	94,032	75,031	77,932	113,040
314	97,209	62,421	72,714	148,532	139,676	127,273	77,509	71,838
315	142,883	68,431	87,736	145,227	143,502	98,665	85,015	101,047
316	151,339	69,480	79,909	116,716	110,509	84,337	99,820	95,160
317	149,543	60,474	86,876	154,731	99,219	76,492	86,057	91,489
318	124,535	61,299	66,591	140,731	87,323	96,804	90,645	108,385

319	156,866	65,213	75,228	114,983	89,727	81,724	119,417	96,249
320	142,135	62,247	72,236	127,760	101,098	104,841	87,804	86,548
321	137,442	58,602	88,331	147,090	108,760	94,692	96,354	102,136
322	141,703	69,817	79,300	121,386	109,634	80,806	78,719	91,665
323	143,155	73,976	77,914	138,600	100,383	129,665	97,766	101,726
324	141,787	67,010	86,771	128,906	103,568	75,475	99,780	92,543
325	117,745	67,803	113,865	140,088	85,144	103,217	85,658	114,935
326	123,344	67,585	91,070	147,877	139,406	76,319	77,944	121,138
327	122,416	70,020	80,134	127,653	109,473	123,496	139,499	93,436
328	135,167	60,611	76,153	122,225	108,154	106,536	95,027	80,509
329	134,444	73,879	72,929	135,208	80,839	106,036	87,140	105,489
330	133,556	72,132	79,547	114,180	124,551	77,436	84,322	129,973
331	140,340	71,125	74,273	144,765	109,759	81,915	78,304	96,224
332	114,093	67,553	84,500	147,511	99,988	81,320	89,943	108,782
333	136,898	102,926	88,042	108,524	80,491	117,320	114,835	86,612
334	151,473	120,655	69,992	129,313	79,022	75,309	84,233	96,989
335	117,948	115,733	80,097	117,499	122,157	122,265	85,843	105,812
336	155,100	132,454	83,621	150,900	98,394	79,626	100,768	117,710
337	144,465	115,412	75,699	143,777	108,456	117,389	102,546	115,678
338	153,243	119,704	107,673	116,456	111,717	80,154	87,230	123,244
339	131,438	109,053	112,665	140,564	65,988	106,322	79,199	122,923
340	130,567	128,773	85,299	143,234	77,966	91,548	83,093	119,307
341	128,523	118,176	100,075	120,841	93,662	105,967	87,622	95,617
342	126,208	120,682	88,657	135,377	80,600	98,914	87,018	118,276
343	135,915	101,868	88,666	139,165	71,806	77,537	118,600	101,781
344	140,077	118,052	77,647	150,733	58,000	99,395	91,878	87,675
345	150,605	124,672	98,226	113,241	82,867	76,174	131,048	97,848
346	140,462	123,411	111,629	84,423	107,987	101,229	123,168	77,963
347	142,615	116,175	101,628	117,049	76,740	116,190	119,111	82,127
348	143,982	112,945	95,524	90,934	108,989	106,803	134,306	108,507
349	142,963	112,161	124,624	102,279	77,191	73,558	128,904	93,915
350	137,415	124,682	88,134	84,574	68,751	92,532	94,267	98,936
351	159,576	114,266	104,746	106,886	83,519	129,177	130,809	98,582
352	142,154	112,823	97,240	123,306	101,140	114,602	94,558	90,965
353	125,352	103,401	101,389	90,292	78,268	110,662	87,621	97,470
354	125,175	111,288	79,676	98,062	80,123	103,660	135,935	83,899
355	147,957	118,258	104,508	116,176	95,336	117,606	113,702	87,163
356	110,273	103,326	88,239	96,048	81,935	121,888	101,169	88,566
357	126,448	105,958	88,346	126,078	100,872	103,970	99,676	110,366
358	112,695	124,509	106,185	89,402	87,673	134,745	126,222	118,237
359	127,181	117,529	97,911	95,241	73,273	88,679	113,552	124,853
360	138,454	115,124	94,177	92,823	100,494	111,730	134,022	116,580
361	118,017	132,795	102,374	94,610	83,875	120,328	122,058	88,134
362	156,292	102,023	93,699	104,473	72,653	123,445	93,684	95,353
363	148,595	120,701	95,561	73,836	89,314	131,087	102,499	121,008
364	139,870	126,402	134,078	90,550	104,967	124,047	113,811	82,314
365	143,444	107,016	108,825	103,957	79,017	134,953	98,933	122,021
366	134,891	113,474	91,477	110,034	74,936	93,089	86,115	118,722
367	121,153	115,256	87,889	106,741	64,358	140,264	128,376	85,439
368	138,436	105,625	96,492	85,058	88,507	132,894	86,103	88,508
369	147,169	124,830	88,589	101,371	104,710	100,047	126,099	103,227
370	143,027	121,582	101,333	83,829	97,394	122,213	86,542	82,418
371	150,446	107,030	107,678	86,634	103,238	98,686	105,217	116,486
372	131,219	127,140	94,144	75,630	92,733	101,664	90,226	116,735

373	137,317	107,709	100,203	76,010	136,641	112,332	116,575	87,509
374	157,859	110,006	130,532	92,539	74,023	134,754	89,498	82,053
375	141,177	119,253	94,263	118,689	91,961	113,074	105,272	112,902
376	111,145	107,893	119,985	96,364	85,357	132,004	138,607	83,940
377	132,978	123,809	121,274	89,278	62,415	120,111	99,676	84,234
378	129,914	130,426	105,084	93,723	75,733	100,906	125,803	89,741
379	150,046	121,719	95,711	99,320	99,042	113,705	114,090	119,170
380	141,400	118,866	91,882	93,896	65,429	137,303	125,171	112,343
381	139,661	121,356	87,093	80,747	81,941	95,058	120,694	94,640
382	134,106	132,777	118,136	103,635	86,906	138,030	96,611	106,075
383	144,779	116,772	93,328	105,594	97,718	122,261	136,261	96,028
384	135,246	111,757	122,810	96,080	67,337	99,369	111,545	125,418
385	129,554	114,780	102,907	94,399	83,623	139,914	115,380	76,992
386	128,174	119,091	109,641	91,673	108,563	102,227	94,086	86,377
387	153,053	134,390	135,705	85,888	71,787	119,281	121,061	81,383
388	139,546	128,705	81,520	107,315	76,266	98,214	89,087	83,154
389	149,822	114,610	115,014	94,962	68,914	96,019	83,897	84,737
390	135,925	120,053	97,907	100,321	70,684	94,297	86,954	88,200
391	164,236	139,019	92,485	87,333	85,389	107,604	100,388	121,763
392	163,492	121,677	124,877	113,808	70,242	96,128	86,249	120,975
393	84,853	139,821	116,297	93,532	76,102	92,206	118,627	122,296
394	105,220	118,246	89,946	94,980	78,662	114,872	112,153	123,163
395	116,304	114,864	111,051	83,240	65,032	137,633	104,116	98,909
396	91,146	118,569	128,028	113,832	71,154	115,037	63,598	102,505
397	88,762	132,741	119,723	138,233	114,829	105,414	66,827	91,294
398	111,899	125,412	89,782	117,699	110,947	123,840	66,503	99,306
399	84,364	132,828	114,224	112,080	96,974	126,317	79,764	85,777
400	108,024	118,130	101,970	101,786	68,125	118,948	90,602	103,868
401	83,998	123,553	104,986	112,137	72,523	118,877	64,527	124,097
402	84,953	120,732	121,261	119,351	72,523	159,164	68,739	85,825
403	105,750	124,145	107,615	93,820	96,726	118,544	85,420	80,347
404	112,670	120,898	99,127	99,879	67,065	94,400	74,423	92,010
405	97,950	108,848	112,190	124,507	74,820	108,583	62,918	92,306
406	89,179	112,442	102,299	98,247	72,884	115,332	93,766	123,829
407	78,578	119,539	123,879	103,236	75,504	104,828	67,308	95,955
408	88,327	110,921	104,103	149,764	67,457	139,649	72,700	89,341
409	89,526	120,325	108,932	97,846	91,667	146,300	75,032	81,426
410	108,079	124,874	132,110	71,547	85,336	97,563	72,072	82,545
411	75,721	115,817	88,907	82,215	69,411	136,164	100,787	89,736
412	83,946	121,286	119,918	129,147	65,420	139,951	86,485	87,071
413	116,055	110,786	122,672	115,450	102,063	107,039	99,968	90,258
414	81,989	95,735	95,546	84,942	95,105	138,179	107,396	107,893
415	89,238	123,148	116,090	104,477	68,021	107,697	122,276	127,251
416	100,167	103,780	109,184	98,526	77,759	124,681	133,677	115,900
417	85,733	123,210	123,566	131,792	71,328	114,708	100,082	104,641
418	98,023	118,856	103,515	127,356	66,848	106,835	106,188	109,313
419	116,925	114,472	135,121	107,171	85,937	143,405	124,840	122,981
420	106,661	122,067	102,398	122,486	103,800	109,658	106,263	92,151
421	91,823	119,225	90,998	121,974	81,215	128,239	107,940	105,200
422	95,415	107,874	118,643	96,597	87,166	91,240	110,403	117,924
423	108,097	125,094	95,231	111,754	108,937	136,096	122,009	118,244
424	89,822	113,522	114,158	76,170	77,286	101,895	110,408	90,316
425	109,077	124,439	123,612	103,201	73,440	117,247	106,036	118,916
426	98,168	122,160	111,346	110,585	80,771	103,109	115,915	92,595

427	104,255	112,619	88,218	128,445	134,185	128,821	118,157	119,218
428	104,659	129,547	102,592	96,679	67,441	144,040	100,275	89,129
429	105,836	110,626	113,828	96,120	79,248	108,569	107,772	93,768
430	115,739	118,492	86,939	104,359	77,591	146,257	120,149	99,419
431	91,929	112,123	121,901	91,179	85,644	111,365	130,624	86,878
432	108,894	123,276	73,703	102,676	90,160	123,139	122,762	122,888
433	85,323	124,599	105,064	94,874	95,465	86,509	132,684	90,666
434	104,099	124,611	85,379	80,841	98,320	97,408	144,819	119,862
435	101,909	123,846	91,736	112,440	73,195	107,150	133,233	116,454
436	100,828	134,160	78,512	99,883	95,369	102,101	106,798	95,234
437	96,058	128,744	81,328	84,295	66,865	92,781	99,717	104,685
438	89,034	118,668	97,711	79,674	86,968	94,931	95,564	123,812
439	100,947	121,372	108,277	108,401	104,932	109,817	113,695	90,903
440	101,082	108,550	77,493	82,455	84,662	121,591	123,490	117,018
441	108,724	121,335	88,974	108,673	81,564	103,562	109,124	120,645
442	79,202	131,981	99,524	98,178	80,330	99,037	106,649	116,170
443	113,705	136,292	76,835	110,295	75,973	139,241	119,809	125,273
444	139,389	110,232	91,391	103,748	86,370	90,959	101,446	90,391
445	106,737	144,777	79,255	103,674	70,535	82,164	118,468	136,712
446	85,665	106,639	107,282	83,242	82,448	112,552	135,173	106,794
447	101,460	128,009	106,068	89,183	72,367	85,039	151,112	95,540
448	133,815	132,115	94,954	90,154	99,157	84,136	113,440	115,719
449	113,196	116,568	79,460	121,824	75,037	123,498	148,133	103,023
450	104,205	142,968	104,028	137,923	86,438	80,160	145,281	93,709
451	103,408	103,614	83,148	113,168	72,256	106,777	103,799	98,657
452	136,883	132,124	98,398	93,962	68,481	95,706	114,757	149,331
453	105,248	93,509	90,352	119,977	67,661	128,082	116,548	83,978
454	131,663	100,031	92,083	108,564	67,383	92,035	89,802	90,117
455	106,012	118,790	100,779	92,797	99,162	102,950	97,329	93,636
456	131,451	86,643	108,814	120,902	66,197	98,451	81,787	107,150
457	119,202	101,172	78,642	98,738	83,892	100,320	103,572	106,077
458	116,832	91,597	109,830	103,331	74,851	88,342	99,522	90,752
459	145,236	82,660	92,238	84,370	62,629	93,469	83,836	121,050
460	116,948	87,313	108,064	110,489	122,484	111,174	96,904	84,301
461	121,979	90,258	125,566	117,069	71,612	85,551	104,069	89,955
462	129,400	103,158	111,899	103,473	121,892	102,271	144,235	136,245
463	117,025	95,549	89,494	90,259	85,453	123,321	80,926	106,238
464	96,792	103,368	90,366	102,713	97,814	113,000	106,759	134,104
465	123,167	83,644	105,640	103,884	129,133	98,187	116,649	96,608
466	148,185	129,152	118,044	85,497	89,319	134,444	124,710	124,590
467	141,506	123,464	80,021	130,091	91,816	89,417	106,402	99,680
468	123,083	87,151	90,170	109,338	74,085	89,712	109,045	86,737
469	95,934	82,484	92,788	127,067	76,106	109,241	122,431	122,116
470	119,763	89,372	119,239	94,029	86,151	96,523	86,311	91,052
471	126,325	98,740	76,034	95,723	80,098	104,392	120,723	129,562
472	150,870	106,572	67,658	94,008	78,018	111,531	86,331	89,535
473	109,292	103,556	80,522	105,393	88,694	119,592	84,705	99,285
474	105,506	110,580	70,902	106,698	84,891	82,754	82,157	120,583
475	125,087	99,427	70,926	124,749	69,282	108,573	135,154	96,255
476	137,155	122,815	80,722	99,593	71,878	121,406	113,905	77,724
477	112,696	108,833	99,162	95,122	66,491	81,015	97,512	107,333
478	165,938	90,843	81,354	101,723	83,839	79,993	85,313	115,563
479	106,503	84,938	74,558	89,500	120,222	93,768	79,610	78,315
480	151,594	88,931	66,648	110,251	122,643	87,244	109,162	124,226

481	138,980	96,956	70,218	84,456	82,745	120,834	119,306	98,289
482	145,404	100,022	73,612	111,122	92,212	117,961	102,739	86,279
483	126,271	101,236	86,486	107,620	79,584	124,397	110,148	104,160
484	123,071	97,937	68,020	92,677	79,608	108,054	103,112	85,838
485	123,198	119,854	99,924	97,732	103,161	103,659	83,736	102,117
486	111,942	105,710	129,253	121,087	93,137	85,504	104,209	102,876
487	134,079	88,956	115,288	123,932	91,986	83,433	118,296	92,755
488	121,985	95,868	70,923	90,222	92,341	83,808	85,952	111,160
489	126,792	127,962	68,102	65,452	81,553	95,976	82,838	131,517
490	118,773	115,710	68,494	73,530	87,362	109,103	101,762	82,152
491	118,159	99,324	76,827	69,848	77,706	104,223	93,836	110,180
492	119,911	108,899	67,713	69,672	108,195	126,142	93,401	97,563
493	131,396	117,809	69,741	65,009	102,999	110,271	89,093	103,156
494	129,857	92,977	74,672	71,024	77,290	92,258	88,438	118,376
495	123,296	96,485	72,064	83,653	98,800	86,752	99,917	86,719
496	134,764	111,890	69,493	76,862	81,691	112,718	116,719	85,844
497	130,834	104,049	116,303	79,023	103,350	123,687	73,554	116,563
498	119,286	103,639	77,645	74,585	74,783	91,770	80,169	85,185
499	130,446	117,982	79,300	78,663	82,895	78,781	109,548	82,678
500	106,060	89,561	121,837	100,091	74,482	103,399	81,055	90,664
501	141,347	124,274	78,362	80,715	131,675	99,576	78,750	81,656
502	135,722	104,682	93,557	89,886	101,840	99,387	118,392	114,281
503	154,722	115,201	95,070	112,144	77,856	99,395	94,150	95,047
504	119,721	94,989	91,171	72,307	84,950	84,993	122,849	134,485
505	143,684	145,678	85,789	76,710	71,108	89,812	79,482	132,640
506	143,205	121,322	105,099	63,827	106,719	108,105	81,159	88,060
507	146,762	111,595	137,641	59,836	81,087	82,877	128,961	101,799
508	131,461	99,589	78,874	56,986	97,679	122,339	99,932	103,691
509	151,927	97,404	107,538	72,989	66,579	86,996	118,420	115,727
510	147,853	115,186	78,220	62,839	84,187	96,811	84,051	115,383
511	144,856	136,299	90,739	97,559	71,564	84,653	80,876	94,526
512	115,174	106,735	108,853	50,469	132,711	97,621	101,471	117,647
513	141,256	106,798	77,459	54,355	84,975	117,138	93,517	135,945
514	136,576	84,436	73,740	61,391	69,736	94,504	96,896	128,737
515	152,398	90,799	80,603	74,548	74,653	92,505	96,821	134,449
516	135,544	118,161	78,043	68,903	107,257	100,656		
517	143,243	132,505	154,652	77,360				
518	146,047	111,435	121,305	85,658				
519	148,763	86,512	131,777	92,296				
520	127,415	86,400	72,045	70,707				
521	153,205	89,870	113,180	58,427				
522	153,890	112,224	76,128	65,711				
523	123,073	107,981	71,672	58,162				
524	134,349	100,647	75,516	67,154				
525	149,027	97,452	77,916	98,693				
526	138,298	87,399	93,598	70,931				
527	140,439	115,712	90,537	99,959				
528	152,106	88,249	117,449	72,302				
529	132,820	95,973	90,731	64,037				
530	156,801	95,291	72,138	88,891				
531	154,680	91,834	92,223	76,357				
532	145,607	109,411	123,694	73,082				
533	175,203	88,730	90,748	75,096				
534	156,932	88,354	67,861	101,877				

535	143,367	104,154	137,873	72,122				
536	139,815	87,344	74,562	83,552				
537	148,655	110,739	84,093	70,080				
538	163,292	109,753	115,035	51,096				
539	154,772	87,432	88,184	71,259				
540	161,154	107,348	121,391	78,335				
541	145,050	100,753	106,909	72,585				
542	146,281	136,751	122,441	99,811				
543	139,557	86,812	94,977	70,898				
544	126,133	98,572	116,619	54,537				
545	155,681	95,637	115,417	104,400				
546	154,989	113,577	114,926	67,704				
547	134,487	100,389	103,583	61,123				
548	159,347	88,193	100,113	52,132				
549	164,360	117,324	127,715	57,742				
550	140,114	101,554	85,362	142,852				
551	136,431	98,369	101,099	121,699				
552	150,337	98,781	93,612	103,760				
553	157,979	92,458	126,533	91,002				
554	154,965	99,269	99,263	75,888				
555	155,198	118,835	131,594	113,950				
556			128,586	69,190				
557			87,192	61,774				
558			123,170	72,136				
559			104,556	77,254				
560			92,477	74,409				
561			100,476	77,997				
562			117,697	85,887				
563			117,516	73,518				
564			96,572	91,125				
565			103,581	67,368				
566			110,194	87,106				
567			125,238	99,868				
568			99,775	69,958				
569			109,054	82,292				
570			83,615	85,341				
571			105,548	82,652				
572			93,269	73,684				
573			97,115	111,231				
574			95,253	95,520				
575			96,241	103,376				
576			114,579	99,742				
577			119,478	74,421				
578			101,487	98,160				
579			123,259	68,627				
580			80,763	78,289				
581			118,622	100,251				
582			101,382	67,610				
583			88,643	84,440				
584			101,695	90,475				
585			98,020	101,219				
586			91,478	87,004				
587			104,583	83,985				
588			97,028	95,525				

589			92,169	103,542				
590			95,046	90,127				
591			86,456	77,712				
592			101,983	97,567				
593			88,126	72,834				
594			107,710	76,213				
595			117,538	116,348				
596			88,476	83,083				
597			86,652	81,453				
598			118,396	82,678				
599			103,851	100,445				

8.6. Anexo 7 – Descrição e avaliação do apoio

No período coberto pelo presente relatório (01/07/2010 – 30/07/2012), os recursos empregados foram provenientes das categorias material permanente, material de consumo e reserva técnica.

Avaliação do apoio: O apoio financeiro cedido pela FAPESP foi imprescindível para a realização desta pesquisa. Permitiu a aquisição de modulo de contraste de fase e software para análise avançada de imagens para o microscópio que já dispomos no laboratório, os quais foram utilizados nas avaliações histológicas e anisotrópicas deste projeto, além do módulo "automeasure" para software "axiovision 4, programa para medições automáticas com funções básicas para processamento de imagens. Permitiu, ainda, a compra de uma balança de precisão para análises quantitativas dos implantes, bem como dos materiais necessários para o preparo das amostras e dos componentes dos corantes. A verba destinada à reserva técnica foi aplicada na compra de insumos para confecção de laminas de microscopia, equipamentos de informática e materiais de suporte do laboratório. Além disso, os recursos disponibilizados foram utilizados para apresentação do estudo em eventos nacionais e internacionais voltados à biotecnologia e biomateriais, permitindo compartilhar os resultados obtidos com a comunidade científica e discutir os próximos passos dessa linha de pesquisa, ampliando as perspectivas futuras.

Apresentação dos resultados em eventos nacionais

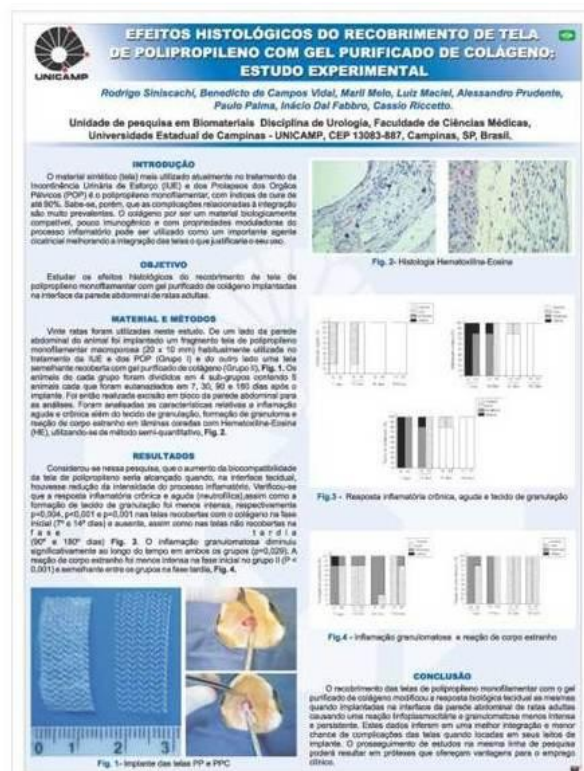
Evento: XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia – Florianópolis 23-26 nov/2011

Modalidade: Pôster

Título: P - 463 - Efeitos histológicos do recobrimento de tela de polipropileno com gel purificado de colágeno: Estudo experimental

Especialização: Urologia Feminina

Autores: Rodrigo Siniscalchi, Benedicto de Campos Vidal, Marli Melo, Luis Maciel, Paulo Palma, Inácio Dal Fabbro, Cássio Riccetto



Apresentação dos resultados em eventos internacionais

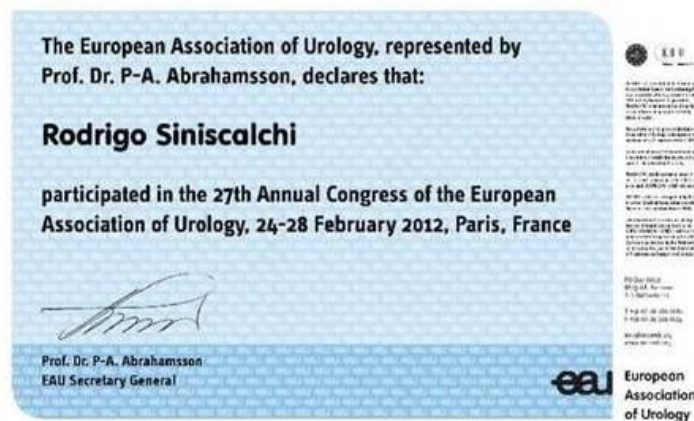
Evento: 27th Annual European Association of Urology(EAU) Congress, realizado entre 24 a 28 de fevereiro de 2012, Paris- França

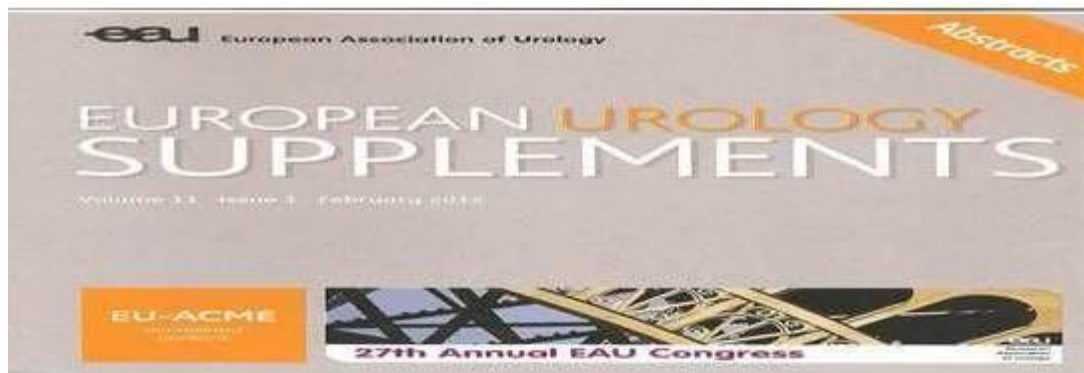
Modalidade: “Discussed Poster” nº 1067

Título: Biomechanical and histological effects of coating a polypropylene mesh with a purified collagen gel.

Autores: Rodrigo Siniscalchi, Benedicto de Campos Vidal, Marli Melo, Luiz Maciel, Alessandro Prudente, Paulo Palma, Inácio Dal Fabbro, Cassio Riccetto.

Certificate of Attendance





1067

Biomechanical and histological effects of coating a polypropylene mesh with a purified collagen gel

Eur Urol Suppl 2012;11:e1067

Simecchi R.T., Vidal B.C., Melo M., Maciel L.C., Prudente A., Palma P.C.R., Dal Fabbro I.M., Ricetto C.L.Z., Biomaterials Research Unit - Division of Urology, Campinas, Brazil

University of Campinas, Dept. of Surgery, Campinas, Brazil

INTRODUCTION & OBJECTIVES: Polypropylene (PP) type 1 meshes have been currently used for the treatment of stress urinary incontinence (SUI) and pelvic organ prolapse (POP) with anatomical cure rates of up to 90%. However, complications related to integration are still very prevalent. Collagen properties can modulate the inflammatory process and can be used as an healing agent improving the integration of PP meshes. The aim of this research is to study the biomechanical and histological effects of the coating PP type 1 meshes implanted at the interface of the abdominal wall of adult female rats with a highly purified collagen gel.

MATERIAL & METHODS: Forty female rats have been submitted to subcutaneous implant of a PP type 1 (20 x 10 mm) and PP type 1 previously coated with a highly purified collagen gel according to a standardized method (20 x 10 mm). Twenty rats are used for the histological analysis and 20 rats for biomechanical study. The animals were divided into 4 sub-groups each with 10 animals that were euthanized at 7, 30, 90 and 180 days after the implantation. The abdominal wall was excised in block for analysis. The biomechanical study was performed on a precision tensiometer, in which the mesh was pulled in uniaxial direction to study the maximum load (N) required for the detachment from the tissue. In the histological study, inflammatory reaction, granulation tissue and foreign body reaction were studied in slides stained with hematoxylin-eosin (HE), using a semi-quantitative method.

RESULTS: In the biomechanical study, it was showed that the adhesion to the surrounding tissues increased significantly in coated meshes 2 at 7 ($p=0.0016$), 14 ($p=0.0039$), 90 ($p=0.0009$) and 180 ($p=0.0029$) days after implantation. In the histological analysis it was showed that the chronic ($p=0.004$) and acute inflammatory responses ($p<0.001$), as well as the formation of granulation tissue ($p=0.001$) was less intense in coated meshes in the initial phase (7 and 14 days) and absent, as well as in the non-coated meshes in the late phase (90 and 180 days). The granulomatous inflammation decreased significantly over time in both groups ($p = 0.029$). The foreign body reaction was less intense in the initial phase in coated meshes ($p < 0.001$) and similar between the both types of meshes in the late phase.

CONCLUSIONS: Coating of PP meshes with purified collagen gel did increase their adherence to tissues and attenuate granulomatous reaction and foreign body inflammatory reaction to the implant in the abdominal wall of rats. This findings could result in prostheses with advantages for clinical use in the future.

Evento: Annual Meeting American Urological Association - AUA, realizado entre 19 a 23 de maio de 2012, Atlanta – Estados Unidos,

Modalidade: “Discussed Poster” nº 117

Título: Biomechanical and histological effects of coating a polypropylene mesh with a purified collagen gel. Autores: Rodrigo Siniscalchi, Benedicto de Campos Vidal, Marli Melo, Luiz Maciel, Alessandro Prudente, Paulo Palma, Inácio Dal Fabbro, Cassio Riccetto.

