

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO-UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESE**

**Avaliação Clínica, Termográfica e Morfológica da Utilização da Pele de Rã-Touro (*Lithobates catesbeianus*) e do Polietileno de Baixa Densidade Laminar Bolhoso (Plástico Bolha) na Hernioplastia da Parede Abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar.**

**Siria da Fonseca Jorge**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, TERMOGRÁFICA E MORFOLÓGICA DA  
UTILIZAÇÃO DA PELE DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*) E DO  
POLIETILENO DE BAIXA DENSIDADE LAMINAR BOLHOSO  
(PLÁSTICO BOLHA) NA HERNIOPLASTIA DA PAREDE ABDOMINAL  
DE *Rattus norvegicus*, VARIEDADE WISTAR.**

**SIRIA DA FONSECA JORGE**

*Sob a Orientação do Professor:*  
**Marcelo Abidu Figueiredo**

*e Co-orientação da Professora:*  
**Lycia de Brito Gitirana**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração Patologia e Ciências Clínicas.

**Seropédica, RJ  
Dezembro de 2016**

636.089

J82a

T

Jorge, Siria da Fonseca, 1976-

Avaliação clínica, termográfica e morfológica da utilização da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e do polietileno de baixa densidade laminar bolhoso (plástico bolha) na hernioplastia da parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade wistar / Siria da Fonseca Jorge. - 2016.  
xiv, 78 f.: il.

Orientador: Marcelo Abidu Figueiredo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2016.

Bibliografia: f. 73-78.

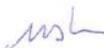
1. Medicina veterinária - Teses. 2. Hérnia - Cirurgia - Teses. 3. Rã touro - Teses. 4. Materiais biomédicos - Teses. 5. Polietileno - Teses. 6. Prótese - Teses. 7. Pele de animais - Teses. 8. Ratos como animais de laboratório - Teses. I. Figueiredo, Marcelo Abidu, 1968- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

SÍRIA DA FONSECA JORGE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 07/12/2016



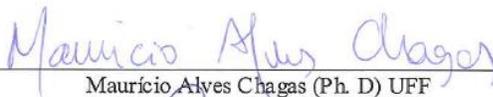
Marcelo Abidu Figueiredo (Ph. D) UFRRJ  
(orientador)



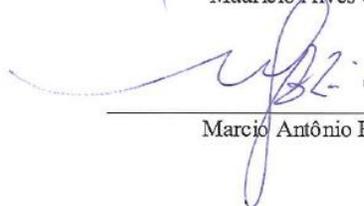
Marco Aurélio Pereira Sampaio (Ph. D) UFF



Clarice Machado dos Santos (Ph. D) UFF



Maurício Alves Chagas (Ph. D) UFF



Marcio Antônio Babinski (Ph. D) UFF

## DEDICATÓRIA

A minha família, meu alicerce, que esteve presente durante TODOS momentos ao meu lado, INCANSÁVEIS, para que eu alcançasse mais este objetivo.

Ao meu marido Gustavo Vaz de Melo, meu parceiro na vida, pela paciência e carinho, que mesmo nos momentos mais difíceis estiveram presentes.

A minha mãe Cecília Maria da Fonseca Jorge, sempre lutando ao meu lado, vencendo todas as dificuldades e sendo meu maior exemplo hoje e sempre.

Aos meus filhos Caio Fonseca Vaz de Melo e Mariana Fonseca Vaz de Melo, que são a melhor parte de mim e meu motivo de inspiração para viver.

## AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu Mestre e Orientador Professor Marcelo Abidu Figueiredo, que desde o início acreditou no trabalho, incentivou, viabilizou sua confecção e principalmente esteve sempre disposto a ajudar amplamente na confecção do mesmo.

Em especial ao Gustavo Vaz de Melo, meu parceiro na vida, que não mediu esforços para me ajudar na confecção deste trabalho. Esteve presente em todas as etapas, participando integralmente da parte prática, da parte teórica, da parte filosófica e principalmente da parte emocional.

Aos meus filhos Caio Fonseca Vaz de Melo e Mariana Fonseca Vaz de Melo que mesmo sem saber são minha fonte de inspiração, fazem de mim uma pessoa melhor a cada dia.

A minha mãe Cecília Maria da Fonseca Jorge que está sempre presente me amparando nas difíceis jornadas de minha vida.

A minha AMIGA Sônia Maria Vaz de Melo (*in memoriam*) que esteve sempre ao meu lado me incentivando, fazendo acreditar em mim mesma e “puxando as orelhas” quando necessário.

A minha prima e comadre Sandra Leila Maia Barbati que com seu jeito doce e meigo se mostra uma guerreira contra as peripécias da vida, sendo uma amiga incondicional.

As minhas tias queridas Margarida Maria Maia, Syria Mee Maia Menezes, Maria Antonieta Maia Barbati pelo apoio, carinho e torcida.

A meu amigo e compadre Matheus Fernandes de Souza que esteve presente ajudando em todas as etapas e somando sempre.

A minha Co-orientadora Professora Lycia de Brito Gitirana e seu grupo do Laboratório de Histologia Integrativa da UFRJ, sempre dispostos a colaborar e buscando o melhor para nosso trabalho.

A Professora Clarice Machado dos Santos que não mediu esforços para ajudar nas análises histológicas e esteve sempre me incentivando nos momentos de cansaço.

Ao Professor Fernando Luis Fernandes Mendes que colaborou com suas idéias, opiniões e também na realização dos procedimentos cirúrgicos.

Ao Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário Serra dos Órgãos – UNIFESO, na pessoa de André Vianna Martins – Coordenador de Curso, onde foi realizada a parte cirúrgica deste trabalho.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Valença, CESVA, na pessoa da Professora Valesca de Souza e do Professor Rodrigo Neto, que abriram as portas da Faculdade para ajudar na confecção deste trabalho.

A Mariana Correia que colaborou diretamente nas análises histopatológicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, na pessoa de seu atual Coordenador Professor Jonimar Paiva.

## CAMINHOS DO CORAÇÃO

Há muito tempo que eu saí de casa  
Há muito tempo que eu caí na estrada  
Há muito tempo que eu estou na vida  
Foi assim que eu quis, e assim eu sou feliz

Principalmente por poder voltar  
A todos os lugares onde já cheguei  
Pois lá deixei um prato de comida  
Um abraço amigo, um canto prá dormir e sonhar

E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
Das lições diárias de outras tantas pessoas

E é tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá  
E é tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho por mais que pense estar

É tão bonito quando a gente pisa firme  
Nessas linhas que estão nas palmas de nossas mãos  
É tão bonito quando a gente vai à vida  
Nos caminhos onde bate, bem mais forte o coração

O coração, o coração

Gonzaguinha, 1982.

## RESUMO

JORGE, Siria da Fonseca. **Avaliação clínica, termográfica e morfológica da utilização da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e polietileno de baixa densidade laminar bolhoso (plástico bolha) na hernioplastia da parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar.** 2016. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

As hernioplastias incluem-se nas cirurgias mais realizadas na Medicina Humana. Apesar da alta frequência, suas complicações e recorrências ainda as tornam o grande desafio da cirurgia moderna. Atualmente vários tipos de telas estão disponíveis para hernioplastias, ressalta-se que sua aplicação na correção de defeitos herniários tem sido exaustivamente testada com o propósito de conseguir uma prótese ideal em todos os sentidos, com biocompatibilidade, pouca ou nenhuma formação de aderências peritoneais, textura e flexibilidade compatíveis, proporcionando a resistência necessária para a proteção das vísceras e ainda assim, permitindo a perfeita movimentação do abdome. O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia e reação local do implante utilizando polietileno de baixa densidade (PEBD) laminar bolhoso, plástico bolha e pele de rã-touro para correção de defeitos herniários em parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. Foram utilizados 40 ratos, machos divididos em dois grupos, um recebeu o implante de plástico bolha e o outro implante de pele de rã. Foi retirado um seguimento de 3,0 no eixo longitudinal por 1,0 cm no eixo transversal incluindo todos os planos da musculatura abdominal, a partir da linha média em direção ao lado esquerdo da parede abdominal, criando-se uma falha que foi recoberta por uma das próteses propostas de acordo com o grupo em questão. Os animais foram avaliados através de acompanhamento de parâmetros clínicos, termográficos, macroscópicos, histológicos e histopatológicos aos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. Clinicamente nenhuma das duas próteses testadas apresentou alterações como abscessos, fístulas entero-cutâneas, eventrações ou eviscerações. Macroscopicamente todos os animais apresentaram aderências consideradas leves, principalmente, na região da sutura das próteses. A termografia infravermelha se mostrou eficaz como método avaliativo de inflamação e da involução das próteses em conjunto com a análise morfológica. Após a análise de todos os resultados concluiu-se que a pele de rã-touro provocou um processo inflamatório inicial que foi reduzindo até a cura aos 90 dias de pós-operatório, sendo considerada um biomaterial promissor para hernioplastias e o PEBD laminar bolhoso produziu um processo inflamatório inicial que regrediu até os 30 dias de pós-operatório, entretanto triplicou aos 90 dias de pós-operatório sendo considerado um bom material para implantes temporários de até no máximo 30 dias e sendo necessário novos estudos com períodos de implantação mais longos deste biomaterial para que seja utilizado com segurança nas correções de defeitos herniários de modo definitivo.

**Palavras-chave:** Hernioplastia. Pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). Polietileno de baixa densidade.

## ABSTRACT

JORGE, Siria da Fonseca. **Clinical, thermographic and morphological evaluation of the use of skin frog bull (*Lithobates catesbeianus*) and polyethylene low density bullous laminar (bubble wrap) in hernia repair of abdominal wall *Rattus norvegicus*, Wistar variety.** 2016. 92f. Thesis (Doctor Science in Veterinary Medicine, Pathology and Clinical Sciences). Veterinary Institute, Postgraduate Veterinary Medicine Program, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Hernioplasties are included in the most performed surgeries in Human Medicine. Despite the high frequency, its complications and recurrences still make them the great challenge of modern surgery. Currently several types of screens are available for hernioplasties, it is emphasized that its application in the correction of hernia defects has been exhaustively tested in order to achieve an ideal prosthesis in every sense, with biocompatibility, little or no formation of peritoneal adhesions, texture And flexibility, providing the necessary strength for protection of the viscera and yet allowing perfect movement of the abdomen. The present study had as main objective to evaluate the efficacy and local reaction of the implant using low density polyethylene (LDPE) bullous lamina, bubble wrap and frog-bull skin for correction of hernia defects in the abdominal wall of *Rattus norvegicus*, Wistar variety. A total of 40 male rats were divided into two groups, one received the blister plastic implant and the other frog skin implant. A follow-up of 3.0 cm in the longitudinal axis by 1.0 cm was taken on the transverse axis including all planes of the abdominal musculature, from the midline towards the left side of the abdominal wall, creating a fault that was covered by one of the prostheses proposed according to the group in question. The animals were evaluated through monitoring of clinical, thermographic, macroscopic, histological and histopathological parameters at 7, 15, 30 and 90 postoperative days. Clinically, none of the two prostheses tested presented alterations such as abscesses, entero-cutaneous fistulas, eventrations or eviscerations. Macroscopically, all the animals had adhesions considered to be mild, mainly in the region of the suture of the prostheses. Infrared thermography proved effective as an evaluation method of inflammation and involution of the prostheses together with the morphological analysis. After analyzing all the results it was concluded that the bullfrog skin caused an initial inflammatory process that was reduced until the cure at 90 postoperative days, being considered a promising biomaterial for hernioplasties and the lamellar PEPD bullous produced a An initial inflammatory process that regressed up to 30 postoperative days, but tripled at 90 postoperative days, being considered a good material for temporary implants up to a maximum of 30 days and new studies with longer implantation periods of this biomaterial So that it is used safely in corrections of hernia defects definitively.

**Key words:** Hernia repair. Skin frog bull (*Lithobates catesbeianus*). Polyethylene low density bullous laminar.

## LISTA DE QUADROS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Quadro 1</b> | Divisão em grupos e subgrupos de estudo e períodos de avaliação pós-operatória.                                  | 15 |
| <b>Quadro 2</b> | Graduação baseada em escores atribuídas a parâmetros clínicos e análises macroscópicas.                          | 25 |
| <b>Quadro 3</b> | Número de animais com alterações clínicas nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.        | 31 |
| <b>Quadro 4</b> | Graduação das deiscências de sutura apresentadas nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório. | 32 |
| <b>Quadro 5</b> | Graduação dos edemas apresentados nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.                | 34 |
| <b>Quadro 6</b> | Classificação em graus das aderências nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.            | 42 |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Esquema geral do tegumento de anuros (modificado de Elkan, 1968).  | 10 |
| <b>Figura 2</b>  | Fotomicrografia mostrando segmento da pele de Rã-touro, após descongelamento em solução fisiológica 0,9% estéril, imediatamente antes de sua implantação em parede abdominal dos ratos.  | 17 |
| <b>Figura 3</b>  | Fotomicrografia mostrando a sequência da confecção da falha em parede abdominal de rato Wistar. <b>A:</b> Primeira incisão, longitudinal, na linha alba, de aproximadamente 3cm; <b>B:</b> Segunda incisão, transversal a linha alba de aproximadamente 1,0cm. <b>C:</b> Terceira incisão, longitudinal paralela a linha alba. <b>D:</b> Última incisão fechando o retângulo criado. | 18 |
| <b>Figura 4</b>  | Fotomicrografia mostrando a falha criada em toda a espessura da parede abdominal, incluindo aponeuroses musculares, músculos e peritônio de aproximadamente 1,0 cm no eixo transversal por 3,0 cm no eixo longitudinal.  | 19 |
| <b>Figura 5</b>  | Fotomicrografia mostrando a colocação das próteses de pele de Rã touro (à esquerda) e de PEDB (à direita).   | 19 |
| <b>Figura 6</b>  | Fluxograma de processamento da imagem infravermelha em gradiente de temperatura.   | 24 |
| <b>Figura 7</b>  | Imagem infravermelha; Isoterma e Gradiente de temperatura.   | 24 |
| <b>Figura 8</b>  | Gráfico mostrando diferença das médias dos pesos no momento imediatamente anterior ao procedimento cirúrgico de colocação das próteses e no momento imediatamente anterior a eutanásia dos grupos do experimento.  | 31 |
| <b>Figura 9</b>  | Gráfico mostrando o percentual de animais que apresentaram deiscência de sutura nos períodos de 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório e o grau destas deiscências.   | 33 |
| <b>Figura 10</b> | Fotomicrografia mostrando diferentes graus de deiscência de sutura nos diferentes períodos pós-operatórios estudados no grupo Rã e no grupo PEDB.  | 34 |
| <b>Figura 11</b> | Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo Rã <sub>7d</sub> . Notar no gradiente a presença de imagem correspondente a prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde (seta fina).   | 35 |
| <b>Figura 12</b> | Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo Rã <sub>90d</sub> . Notar no gradiente a ausência de imagem correspondente a prótese e/ou ao processo inflamatório por esta gerado (estrela).   | 36 |
| <b>Figura 13</b> | Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo PEDB <sub>7d</sub> . Notar no gradiente a presença de imagem correspondente a prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde (seta fina).   | 36 |
| <b>Figura 14</b> | Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo PEDB <sub>90d</sub> . Notar no gradiente a presença de imagem correspondente a prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde   | 37 |

- (seta fina).
- Figura 15** Gráficos demonstrando o comportamento, com relação ao tamanho, da prótese de Rã e PEBD, mensurado através da termografia infravermelha, nos diferentes períodos pós-operatórios estudados. 38
- Figura 16** Gráfico demonstrando o percentual de área inflamada, mensurada através de termografia infravermelha, na região analisada nos grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios estudados. 39
- Figura 17** Fotomicrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>7d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>7d</sub>. 40
- Figura 18** Fotomicrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>15d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>15d</sub>. 40
- Figura 19** Fotomicrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>30d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>30d</sub>. 41
- Figura 20** Fotomicrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>90d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>90d</sub>. 41
- Figura 21** Gráfico demonstrando a incidência e o grau de aderências nos grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios estudados. 43
- Figura 22** Fotomicrografias da parede abdominal dos animais do grupo Rã<sub>7d</sub>. **A:** O implante é claramente observado através do arranjo das fibras colagenosas da derme compacta da pele da rã (★). Ao redor do implante é possível observar área de inflamação (\*). Tecido de aderência (asterisco). Tricrômico de Mallory. Barra = 500 µm. **B:** Notar aumento da quantidade de células (\*) no tecido conjuntivo abaixo da derme reticular da pele do rato. O edema separa a pele do rato da pele da rã-touro (★). HE. **C:** Observe hemácias (→) do hospedeiro percorrendo vasos sanguíneos localizados por entre os feixes de fibras colagenosas da derme compacta da rã. HE. 45
- Figura 23** Fotomicrografias da parede abdominal dos animais do grupo PEBD 7d. **A:** Observar o espaço negativo da prótese (★). Ao redor do implante é possível observar área de inflamação (\*). HE. **B:** Notar acentuada inflamação (\*) com a presença de células gigantes (cabeça de seta). HE. **C:** Observe infiltrado inflamatório, congestão (seta) e aderência (\*). HE. **D:** Imuno-histoquímica para alfa-actina mostrando a presença de novos vasos (setas). 47
- Figura 24** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo Rã<sub>15d</sub>. **A:** A pele da Rã ainda pode ser reconhecida pelo arranjo das fibras colagenosas (★). É possível observar que o músculo cutâneo começa a restaurar (→). HE. **B:** Observe o arranjo das fibras colagenosas (★) da pele da Rã. Notar o músculo cutâneo, que começa a restaurar (→). Tricrômico de Mallory. **C:** Observe os vasos sanguíneos do hospedeiro (com hemácias anucleadas), infiltrados na derme compacta da Rã (→). Tricrômico de Mallory. Barra = 50 µm. **D:** Nesse período, nota-se que as células epidérmicas (★) começam a perder sua estruturação própria. Tricrômico de Mallory. Barra = 50 µm. 48
- Figura 25** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>15d</sub>. **A:** Notar 49

- lacuna ocupada pelo PEBD (★). Picrosirius red **B**: Reação inflamatória (\*), área de congestão (seta) e foco de fibrose (cabeça de seta). HE.
- Figura 26** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>30d</sub>. **A**: A pele da Rã aparece integrada a derme do hospedeiro (★). Tricrômico de Mallory. **B**: Observar o arranjo das fibras colagenosas espessas (★) da pele da Rã em comparação as fibras do hospedeiro (\*). Picrosirius red com polarização. **C**: Observar os vasos sanguíneos do hospedeiro próximos a área do implante (seta larga), neovascularização. Notar o músculo cutâneo restaurado (seta fina)  $\alpha$ -actina. **D**: Nesse período, nota-se a presença de esparsos queratinócitos (detalhe) no implante. Citoqueratina. Barra = 100  $\mu$ m. 51
- Figura 27** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>30d</sub>. **A**: Notar lacuna ocupada pelo plástico bolha com projeções de tecido inflamatório do hospedeiro entre as bolhas do PEBD (setas). Reação inflamatória (\*). HE. **B**: Nota-se acentuada formação de novos vasos - Angiogênese (cabeça de seta) entremeados a edema na região de contato com a cavidade abdominal do Rato, com formação de aderências (\*) e células inflamatórias (\*). HE. 52
- Figura 28** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>90d</sub>. **A**: A pele da Rã aparece integrada a derme do hospedeiro (★). Notar a presença de aderência peritoneal (seta). HE. **B**: Observar parede abdominal com aspecto uniforme (★). HE. 53
- Figura 29** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>90d</sub>. **A**: Notar focos de fibrose (cabeça de seta) ao redor da lacuna. HE. **B**: Nota-se tecido de granulação na região em contato com a cavidade abdominal do Rato (losango). Tricrômico de Mallory. 54
- Figura 30** Gráfico demonstrando a intensidade do processo inflamatório nos animais dos grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios estudados. 56
- Figura 31** Gráfico demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, fibroblastos e mononucleares, nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 57
- Figura 32** Gráfico demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, polimorfonucleares, neutrófilos e eosinófilos nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 58
- Figura 33** Gráfico demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, macrófagos e células gigantes, nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 59
- Figura 34** Gráfico demonstrando a porcentagem de aparecimento de tecido de granulação e fibrose nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 60
- Figura 35** Gráfico demonstrando a porcentagem de interação entre as próteses e a pele do hospedeiro nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 62
- Figura 36** Gráfico demonstrando a média do número de novos vasos (Angiogênese) em 10 campos de 40x nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. 63

## SUMÁRIO

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                                   | <b>4</b>  |
| <b>2.1</b> | <b>Hernioplastias</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.2</b> | <b>Biomateriais</b>  | <b>5</b>  |
| 2.2.1      | Malhas sintéticas  | 6         |
| 2.2.1.1    | Polímeros  | 6         |
| 2.2.2      | Malhas biológicas  | 7         |
| 2.2.2.1    | Pele de Rã-touro ( <i>Lithobates catesbeianus</i> )            | 9         |
| <b>2.3</b> | <b>Reações do Organismo Frente aos Implantes</b>               | <b>10</b> |
| <b>2.4</b> | <b>Aderências Peritoneais</b>                                  | <b>12</b> |
| <b>2.5</b> | <b>Termografia infravermelha</b>                               | <b>13</b> |
| <b>3</b>   | <b>METODOLOGIA</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Animais</b>   | <b>15</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Protocolo Anestésico</b>                                    | <b>16</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Protocolo Cirúrgico</b>                                     | <b>16</b> |
| 3.3.1      | Aquisição e preparo das próteses                               | 16        |
| 3.3.2      | Técnica cirúrgica  | 17        |
| <b>3.4</b> | <b>Análises Pós-operatórias</b>                                | <b>20</b> |
| 3.4.1      | Avaliação clínica  | 20        |
| 3.4.2      | Avaliação da temperatura cutânea por termografia infravermelha | 20        |
| 3.4.2.1    | Obtenção das Imagens Infravermelhas                            | 20        |
| 3.4.2.2    | Processamento das Imagens Infravermelhas                       | 21        |
| 3.4.2.3    | Dimensionamento das áreas da prótese e inflamadas              | 22        |
| 3.4.3      | Análise macroscópica   | 25        |
| 3.4.4      | Análise microscópica   | 26        |
| 3.4.4.1    | Análise estrutural em microscopia de luz                       | 26        |
| 3.4.4.1.1  | Coloração pela hematoxilina-eosina                             | 26        |
| 3.4.4.1.2  | Técnica de coloração pelo Tricrômico de Mallory                | 27        |
| 3.4.4.1.3  | Técnica de coloração pelo Picrossírius red                     | 27        |
| 3.4.4.2    | Imuno-histoquímica   | 27        |
| 3.4.4.3    | Análise histopatológica  | 28        |
| 3.4.5      | Análise estatística  | 29        |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS</b>  | <b>30</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Avaliação Clínica</b>                                       | <b>30</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Termografia Infravermelha</b>                               | <b>35</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Avaliação Macroscópica</b>                                  | <b>39</b> |
| <b>4.4</b> | <b>Avaliação Microscópica</b>                                  | <b>44</b> |
| 4.4.1      | Análise qualitativa  | 44        |
| 4.4.2      | Análise semi-quantitativa                                      | 55        |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO</b>   | <b>64</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>72</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                              | <b>73</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de biomateriais constituem uma área em crescente expansão na Medicina Humana e Veterinária.

Os biomateriais constituem todo material de origem sintética ou biológica utilizados para confecção de implantes que estarão em contato com tecidos vivos, tendo o objetivo de reparar perdas teciduais. Muitas pesquisas já foram realizadas visando verificar a eficácia do uso dos biomateriais em cirurgias craniomaxilofaciais (TURRER e FERREIRA, 2008), em correções de defeitos ósseos (CORAÇA, 2002), como protetores de anastomoses intestinais (JORGE et al., 2004; JORGE, 2002), como substitutos de paredes de vísceras e vasos sanguíneos (NAKAYAMA et al., 2004) e correções de defeitos herniários (FALCÃO et al., 2008; BRITO E SILVA 2009; COSTA, 2009; KIST et al., 2012; RICCIARDI et al., 2012).

Nas aplicações de implantes, poucos materiais atendem as exigências de força, resistência à corrosão (resistência a deteriorização por eletrólitos líquidos), biocompatibilidade (inércia) e textura (regularidade) (GREER e PEARSON, 1998).

As hernioplastias incluem-se nas cirurgias mais realizadas, sendo que, só nos Estados Unidos, cerca de 600.000 destes procedimentos são realizados anualmente na Medicina Humana. Apesar da alta frequência, suas complicações e recorrências ainda as tornam o grande desafio para a cirurgia moderna (RICCIARDI et al., 2012).

Atualmente vários tipos de telas estão disponíveis para hernioplastias. Sua aplicação na correção de defeitos herniários tem sido exaustivamente testada com o propósito de conseguir uma prótese ideal em todos os sentidos, com biocompatibilidade (capacidade de o material desempenhar sua função com uma resposta apropriada do tecido hospedeiro), pouca ou nenhuma formação de aderências peritoneais, textura e flexibilidade compatíveis, proporcionando a resistência necessária para a proteção das vísceras e ainda assim, permitindo a perfeita movimentação do abdome (BELLÓN, 2005).

Para a correção de hérnias abdominais, discute-se o uso de malhas biológicas ou sintéticas, reticulares, laminares ou compostas, absorvíveis, inabsorvíveis ou parcialmente absorvíveis para o tratamento. Atualmente já existe um grande número de malhas disponíveis para os cirurgiões, assim como, existe uma introdução constante de novas telas ou adaptações de antigas telas no mercado. Cada uma delas propõe uma indicação clínica para sua utilização e

diferentes formas de implantação na parede abdominal, sempre objetivando um melhor resultado. A problemática criada com isso é a dificuldade que os cirurgiões têm demonstrado a cerca do tipo, do momento e do melhor local para implantação da malha para cada caso específico.

Tang e Eaton (1995) afirmam que o uso de implantes requer que o cirurgião conheça os seus efeitos na interface implante-hospedeiro, pois todos os biomateriais, mesmo os considerados inertes, atóxicos e não imunogênicos desencadeiam uma sequência idêntica de eventos, com variações na intensidade da mesma. Estes fatos justificam a procura incessante por biomateriais que cumpram os vários requisitos clínicos, mecânicos e econômicos tão necessários na Medicina Veterinária.

Nas hernioplastias, as malhas poliméricas representam uma alternativa em casos de difíceis correções e de recidivas. Uma das maiores complicações relacionada ao uso destas telas é a adesão das vísceras na superfície do implante. (BRITO E SILVA, 2009). A tela de polipropileno é a que mais tem sido utilizada. Entretanto, a experiência clínica tem demonstrado uma série de complicações, como sepse, erosão de órgãos intra-abdominais, aderências levando a obstruções intestinais, intussuscepções, volvo e fístulas enterocutâneas. (KIST et al., 2012). Somando-se ainda ao fato de que, as telas de polipropileno e outras malhas sintéticas, são para a Medicina Veterinária consideradas ainda de alto custo e difícil aquisição.

Sabe-se que a pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, permeabilidade seletiva, propriedades modulatórias da secreção de insulina e já foi utilizada para realização de curativos biológicos (ARAÚJO LEITE, 2010). A pele de rã apresenta textura maleável, elasticidade e resistência, além de ser considerada material de descarte nos ranários, baixando seu custo de produção. Contudo, apesar dessas aplicações são escassas as informações sobre sua utilização como reparo na parede abdominal.

O Polietileno de Baixa Densidade (PEBD) laminar bolhoso (Plástico Bolha) utilizado rotineiramente para envolver eletrodomésticos, pode ser uma nova alternativa para herniorrafias ou correções de defeitos congênitos, sendo aplicado com as bolhas voltadas para dentro, reduz em aproximadamente 45% a superfície de contato das vísceras com o implante e conseqüentemente reduz a possibilidade de formação de aderências abdominais.

Para ser efetivo em promover a cicatrização da parede abdominal em uma hernioplastia o implante ideal deve ser biocompatível, ser durável o bastante para suportar o estresse físico e

fisiológico, promover o crescimento do tecido do hospedeiro e não induzir a formação de aderências às vísceras. Para se pesquisar todos esses requisitos são necessários estudos pré-clínicos *in vivo* em modelos animais.

Considerando-se que a literatura sobre o uso de PEBD laminar bolhoso e de pele de rã-touro como próteses para hernioplastias e suas relevâncias como novos biomateriais é escassa, associado a sua facilidade de obtenção e seu baixo custo, a realização deste trabalho se justifica e pretende colaborar para a ampliação do conhecimento na área de biomateriais.

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a eficácia e reação inflamatória local do implante utilizando PEBD laminar bolhoso e pele de rã-touro para correção de defeitos em parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar. Esta avaliação foi realizada através da análise de parâmetros clínicos, termográficos, macroscópicos, histológicos e histopatológicos em todos os animais que receberam o implante de PEBD e de pele de rã-touro aos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

Os objetivos específicos compreenderam a avaliação clínica dos animais, avaliação do processo inflamatório e tamanho da prótese através de termografia infravermelha, avaliação macroscópica das aderências abdominais quanto à incidência e gravidade e avaliação histológica e histopatológica da reação tecidual nos períodos pós-operatórios pré-estabelecidos.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Hernioplastias**

Defeitos da parede abdominal normalmente se estabelecem em consequência de traumas, queimaduras, debridamento de infecções necrosantes, tratamento de síndrome compartimental, remoção de telas infectadas, ressecção de tumores, entre outros (SHULMAN et al., 1992; RICCIARDI et al., 2012).

As técnicas clássicas de correção de hérnias realizam uma simples sutura da parede abdominal, sendo acompanhadas de recidivas em 10-30% dos casos. O emprego de materiais protéticos para a correção dos defeitos herniários diminui a chance de recidivas para 1 a 2%. Os tipos de materiais utilizados para reparar estes defeitos têm evoluído com o tempo, sendo que todos buscam evitar a formação de aderências e se adaptarem bem a parede abdominal (GARCIA-MORENO et al., 2014).

A prática clínica para o tratamento de hérnias a partir do uso de telas cirúrgicas vem se desenvolvendo desde 1963, quando foi aplicada a tela de polipropileno monofilamentar para o tratamento da herniação. Desde então, outros tipos de malha têm sido utilizados em muitos estudos para a reparação de hérnias, sendo as telas a de polipropileno e a de politetrafluoretileno (PTFE) mais comumente utilizadas (RICCIARDI et al., 2012). Aproximadamente, mais de 70 tipos de telas estão disponíveis para hernioplastias, sendo classificadas como sintéticas, biológicas ou mistas (base sintética e arcabouço biológico) (LIU et al., 2011).

A correção dos defeitos da parede abdominal com o uso de biomateriais sintéticos não é livre de riscos. Diversos problemas podem surgir com a utilização desses materiais como a formação de aderências (BRITO E SILVA, 2009). O tipo do material, sua estrutura e porosidade também influenciam diretamente a quantidade de aderências e a intensidade da reação inflamatória, além da consistência e organização tecidual do neoperitônio (GOLDSTEIN, 1999; BELLÓN et al., 2001; KLOSTERHALFEN et al., 2005; YEO e KOHANE, 2008).

A tela de polipropileno, em diferentes apresentações, é a mais utilizada na reparação de hérnias desde sua formulação por possuir boa resistência tênil apesar de causar reação inflamatória pronunciada e persistente. A associação destas características ao fato de possuir estrutura macroporosa permite que a prótese seja englobada por tecido fibroso cicatricial resultando em reparo mais consistente. Contudo, as mesmas características que conferem a este

material sua capacidade de incorporação também induzem à formação de aderências resultantes do processo cicatricial, levando a uma série de complicações graves como erosão de órgãos intra-abdominais, dor crônica, obstruções intestinais, fístulas e sepse (LONTRA et al., 2010; RICCIARDI et al., 2012).

## **2.2 Biomateriais**

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos utilizados na área de saúde, estimados em cerca de 300 mil há cerca de 10 anos. Dentre eles, podem ser citados como exemplos dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, entre outros (PIRES et al., 2015).

Conceitualmente, biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e retalhos de pele humana tratados para uso como implantes (PIRES et al., 2015).

Os primeiros materiais utilizados nas aplicações de implantes eram metais e ligas (soluções homogêneas, misturas ou compostos contendo dois ou mais elementos metálicos que não se separam naturalmente). Os relatos sobre tais materiais tem início por volta de 1860, quando as técnicas cirúrgicas assépticas começaram a ser adotadas (GREER e PEARSON, 1998).

O tipo de biomaterial depende se sua aplicação e sua associação com tecido mole ou rígido. A força e a resistência à corrosão e a compatibilidade tornam-se parâmetros importantes, que devem ser considerados. Os metais e cerâmicas tendem a ter aplicação nos tecidos rígidos, enquanto que os polímeros são amplamente utilizados em dispositivos para os tecidos moles. Os usos destes materiais estão relacionados à sua força relativa e diferenças de textura, podendo não haver necessidade de grande força. Por exemplo, novos tipos de curativos para ferimentos

baseiam-se em polímeros relativamente fracos, com propriedades de superfície desejáveis, que são utilizados como revestimentos de substratos mais resistentes (GREER e PEARSON, 1998).

Para avaliação de qualquer produto com utilização pela medicina, o Instituto de Padrões Nacionais Americanos (American National Standards Institute) preconiza testes em animais de experimentação com o objetivo de avaliar a toxicidade sistêmica, a hipersensibilidade cutânea e a implantação intramuscular durante 30 e 365 dias (PURCHIO, 1993).

## **2.2.1 Malhas sintéticas**

### **2.2.1.1 Polímeros**

Dentre os biomateriais usados na área médica, destacam-se os metais, as cerâmicas, os polímeros e as próteses biológicas (STURION et al., 1999).

Nos últimos anos, ocorreu grande avanço no campo de biopolímeros, tais como o polietileno de alta e baixa densidade, polimetilmetacrilato, cloreto de polivinila (PVC), o polímero de óleo da mamona (*Ricinus comunis*) e outros. Todos esses polímeros revelaram vasta aplicação nas áreas médica, odontológica e biológica. Apesar das vantagens e desvantagens, esses polímeros tem seu campo de aplicação determinado e restrito, não existindo um biopolímero ideal (STURION et al., 1999)

Os polímeros de carbono e muitos outros polímeros são adequados para dispositivos que mantém contato com o sangue. Os principais materiais poliméricos de implante são a borracha de silicone (amplamente utilizada), polietileno, Dacron (tetraftalato de polietileno), Teflon (politetrafluoretileno), poliuretano, polimetilmetacrilato (PMMA) e polipropileno. Constantemente, vem se investindo na melhoria dos biomateriais convencionais e muitos polímeros, relativamente novos, tem sido aplicados como biomateriais (GREER e PEARSON, 1998).

Miranda et al. (1997) utilizaram a bolsa plástica de cloreto de vinila (PVC), utilizada na transferência de hemoderivados, como prótese na confecção do silo para o tratamento cirúrgico, por sete dias, da gastrosquise em quatro recém-nascidos. Os autores consideraram o PVC como excelente alternativa para confecção de prótese para o tratamento cirúrgico estadiado das anomalias congênitas da parede abdominal, como gastrosquise e onfalocele. Esclareça-se que a gastrosquise é um defeito da parede abdominal localizado na porção lateral, à direita, do cordão

umbilical intacto, enquanto que a onfalocele é uma modificação da parede abdominal, permitindo que as vísceras saiam, formando uma hérnia para dentro do âmnio e peritônio.

Para evitar a formação de aderências em anastomoses cólicas de ratos, Mochizuki (2005) utilizou uma película de PVC para recobrir a anastomose, garantindo que o PVC não se adere às alças intestinais e às outras vísceras abdominais.

- **Polietileno de baixa densidade (PEBD)**

A unidade química que compõe o polietileno é  $-\text{[CH}_2\text{ CH}_2\text{]}_n$  onde "n" representa o número de unidades de repetição (meros). Os polietilenos podem ser classificados como de baixa densidade (ou ramificados) e de alta densidade. Esta nomenclatura é devida às características dos plásticos em decorrência dos diversos processos utilizados para a sua polimerização (GREER e PEARSON, 1998).

O polietileno de baixa densidade (PEBD) é utilizado como material de implante em situações sem sustentação de cargas (material de reconstrução oftálmica, cateteres e reparo de tendões), enquanto que o polietileno de alta densidade (PEAD) é mais resistente e útil para aplicações em articulações ou nos ossos (GREER e PEARSON, 1998).

Polímeros, como o polietileno, são utilizados como implantes ou cateteres, sendo hidrofóbicos e revela reação tecidual mínima. Com menos de 5 segundos após o contato do PEBD com o sangue, a superfície do polímero se reveste por delgada película de proteína, que passa a funcionar como a superfície que entra em contato com o sangue (GREER e PEARSON, 1998).

Segundo Garcia (2006), ao realizar a análise citológica de aspirado abdominal após a cirurgia de implante intracavitário de próteses de PEBD, verificou haver reação tecidual aguda semelhante ao náilon, quando implantada na cavidade abdominal de roedores.

Mendes (2006), ao analisar o aspirado abdominal após implante da prótese de PEBD bolhosa e da tela de polipropileno em *Rattus norvegicus albinus*, não encontrou diferença significativa entre a citologia desses aspirados nas respostas inflamatórias agudas. O autor afirmou que, durante o período de nove dias, a prótese de PEBD não revelou reação inflamatória ao contrário do que ocorreu com o grupo que recebeu implante de tela de polipropileno.

### **2.2.2 Malhas biológicas**

A finalidade de se utilizar a malha biológica é promover a sustentação à parede abdominal até que novo e saudável tecido seja produzido pelo próprio paciente, substituindo a malha e estabilizando sua parede abdominal. As malhas biológicas comercializadas são normalmente removidas de cadáveres ou animais, sendo transformadas em tecido acelular. O objetivo é proporcionar um arcabouço rico em fatores de crescimento para a formação natural do tecido (MONTGOMERY, 2013).

Para Montgomery (2013), a integração biológica da prótese é importante e desejável e ocorre devido ao aumento do número de células mononucleares seguido da proliferação de novos vasos sanguíneos e novos fibroblastos, com formação de colágeno novo no interior da malha. Para que ocorra este processo grandes mudanças são necessárias. Para o autor, todas as malhas colocadas no hospedeiro representam um corpo estranho e desencadeiam uma resposta, que deve ser balanceada com o objetivo de produzir uma regeneração tecidual normal. Além disso, as substâncias químicas que tornam as malhas acelulares podem ficar retidas no interior da malha, causando tanto reação tóxica quanto reação inflamatória no hospedeiro.

Montgomery (2013) acrescenta ainda que existem muitas etapas que podem levar ao fracasso na utilização de determinada prótese biológica, como a degradação precoce da prótese pela colagenase.

Com relação aos diferentes métodos de processamento das malhas biológicas, a suplementação das ligações cruzadas tem sido bastante discutida. O colágeno nativo forma ligações cruzadas covalentes naturais com a função de estabilizar a estrutura da proteína do colágeno para promover a resistência mecânica e proteger a malha da ação da colagenase. Portanto, todo enxerto baseado em tecidos colagenosos formam naturalmente ligações cruzadas (*cross-linked*). A suplementação dessas ligações cruzadas em implantes cirúrgicos à base de colágeno pode ocorrer por tratamento com agentes químicos ou por alguns processos de esterilização como, por exemplo, a radiação gama. Embora cada um desses agentes forme ligações covalentes entre moléculas, eles atuam de forma diferente, dependendo das moléculas que agem. Como resultado desta variação, o uso de diferentes agentes para suplementação das ligações cruzadas pode revelar diferenças entre resistência mecânica ou funcionamento biológico das diferentes matrizes colagenosas (SMART et al., 2012).

Próteses são consideradas *cross-linked*, quando são à base de colágeno de diferentes tipos e ainda recebem suplementação das ligações cruzadas, estas suplementações foram introduzidas

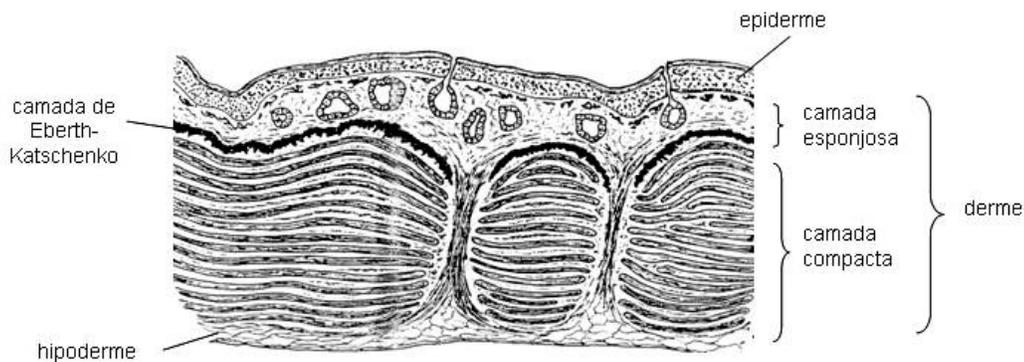
para prolongar a vida útil destas malhas. Em animais, tem sido sugerido que um atraso entre a integração/remodelagem pode causar placa cicatricial ou encapsulamento da malha em comparação com o processo gerado pelas próteses sintéticas, principalmente no centro do defeito herniário. As próteses *non-cross-linked* (sem suplementação das ligações cruzadas naturais do colágeno) demonstram ser mais favoráveis no que se refere à remodelagem devido à degradação do colágeno ser mais rápida (CASTRO BRÁS et al., 2012; MONTGOMERY, 2013).

#### **2.2.2.1 Pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**

A pele dos anfíbios demonstra ser um sistema orgânico variado e adaptável que pode desempenhar variadas funções como, por exemplo, proteção mecânica. A organização estrutural do colágeno na derme desse anuro é responsável por conferir esta capacidade de proteção mecânica (AZEVEDO et al., 2006).

A estrutura geral da pele dos anfíbios adultos, incluindo a da rã-touro, é formada pela epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é constituída por um epitélio pavimentoso estratificado, fracamente queratinizada, estando suportada pela derme que é estruturada em derme esponjosa e derme compacta. A derme esponjosa é formada por tecido conjuntivo frouxo com glândulas exócrinas mucosas e granulosas, enquanto que a derme compacta é composta por camadas de fibras colágenas dispostas em feixes de fibras colagenosas que se inter cruzam entre si (BRITO-GITIRANA e AZEVEDO, 2005). O colágeno é o principal componente do tecido conjuntivo, sendo sua organização estrutural, responsável por conferir força tênsil da pele dos anfíbios (AZEVEDO et al., 2006). Entre a camada esponjosa e a compacta da derme existe uma camada acelular, denominada camada Eberth-katschenko (EK), que contém cálcio coexistindo com uma matriz de gliconjugado ácido e sulfatado (AZEVEDO et al., 2006), sendo o dermatansulfato o glicosaminoglicano predominante nessa região (PELLI et al., 2010). Abaixo da derme compacta encontra-se a hipoderme constituída de tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos e nervos (Figura 1).

Segundo Azevedo et al. (2006), a quantidade, a disposição e a organização das fibras colagenosas variam de acordo com o tecido conjuntivo onde ocorrem devido à diversidade das necessidades mecânicas e estruturais de cada tecido.



**Figura 1:** Esquema geral do tegumento de anuros (modificado de Elkan, 1968)

Os curativos biológicos, utilizando a pele de rã-touro, foram testados e revelaram resultados não muito satisfatórios no reparo de lesões cutâneas em cães (FALCÃO et al., 2002; ARAÚJO LEITE, 2010). Entretanto, o uso da pele da rã-touro vem sendo amplamente empregado no tratamento dermatológico da pele em humanos no Instituto Nelson Picolo, local de referência de tratamento de queimados no Estado de Goiás (<http://www.grupopiccolo.com.br/>).

A literatura relata que a pele da rã-touro apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes (QIAN et al., 2008) e antimicrobianas (HASUNUMA et al., 2010), além de modular a secreção de insulina (OJO et al., 2011). Outra propriedade importante da pele da rã-touro é a permeabilidade seletiva (WILLENS et al., 2006). Seu uso como curativo biológico em lesões crônicas se beneficiaria das propriedades inerentes à pele. Além disso, a permeabilidade seletiva permitiria a administração concomitante de fármacos para auxiliar a cicatrização da lesão sem a necessidade de trocas frequentes de curativos (FALCÃO et al., 2002).

### 2.3 Reações do Organismo Frente aos Implantes

Uma característica comum dos materiais é que eles induzem o desenvolvimento de fina "cápsula" fibrosa que separa o tecido receptor do implante. Se o material implantado for de baixa reatividade tecidual, a cápsula é a única evidência de que o implante degradável esteve presente no tecido do hospedeiro (OREFICE et al., 2006). Todavia, se o material reativo induz a formação de cápsula fibrosa muito espessa (YEO e KOHANE, 2008), o que pode resultar em área de concentrações de tensão, essa fibrose causa dano mecânico para o tecido do hospedeiro (BOWMAN et al., 1998; OREFICE et al., 2006). Nos casos em que a interface do biomaterial

com a área fibrosa é insuficiente, ou mesmo inexistente, pode ocorrer movimentação do implante dentro da "cápsula", ocorrendo aumento da espessura da mesma. Esse aumento da área fibrosa pode interferir com o suprimento de sangue aos tecidos no local, favorecendo o acúmulo de subprodutos bioquímicos potencialmente tóxicos (OREFICE et al., 2006).

Um dos grandes problemas relacionado ao implante de biomateriais é a infecção que ocorre devido ao baixo fluxo de sangue através da cápsula. Esse fato dificulta a migração leucocitária, retardando o processo de fagocitose no foco infeccioso (BOWMAN et al., 1998; GREER e PEARSON, 1998). Além disso, os produtos de decomposição tecidual podem se acumular no local do implante devido à falta de circulação celular. Produtos da corrosão de metais ou da deterioração de polímeros podem se reunir dentro da cápsula ou na interface cápsula-implante (GREER e PEARSON, 1998; KLOSTERHALFEN et al., 2005).

Segundo Sturion et al. (1999), as diferenças nas reações teciduais não se devem ao polímero, mas sim ao tipo de plastificante, aos estabilizantes e a outros aditivos agregados ao composto.

A resposta tecidual ao implante pode ocorrer tanto de forma direta no local adjacente ao material implantado, quanto produzir efeitos sistêmicos. Neste último caso, produtos de degradação do material podem atuar em tecidos distantes do local do implante. É variável a influência do material estranho, não considerando a carcinogênese ou a infecção, assim, é possível observar quatro tipos de respostas locais: (1) se o material é tóxico, o tecido ao redor perece (por exemplo, no caso de metais pesados como chumbo); (2) se o material não é tóxico mas biologicamente inativo ("inerte"), ocorre a formação de cápsula de tecido fibroso com espessura variável (por exemplo, implante de silicones); (3) se o material não é tóxico mas biologicamente ativo ocorre a formação de uma interface de adesão contínua entre tecido e implante (por exemplo, implante de polietileno poroso e vitrocerâmicas); (4) se o material não é tóxico e se dissolve, os tecidos ao seu redor o substituem (por exemplo, malhas biológicas) (GREER e PEARSON, 1998; TURRER e FERREIRA, 2008).

Para a avaliação de sua adequabilidade para as aplicações do implante são efetuados ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo*, onde as avaliações de biocompatibilidade categorizam o tipo e grau de resposta (GREER e PEARSON, 1998).

Segundo Greer e Pearson (1998), o material de implante ideal não deve desnaturar as proteínas plasmáticas, nem induzir a formação de trombos ou lesão dos elementos sanguíneos,

além de não exibir instabilidade, nem produzir respostas imunes adversas ou estimular o câncer, e nem produzir efeitos tóxicos ou teratológicos, não deve ter propriedades mecânicas inadequadas, nem diminuir os eletrólitos e não ser alterado pela esterilização.

Quando implantes são usados para substituição fascial da parede abdominal, o processo cicatricial normal que ocorre ajuda na ancoragem do material nos tecidos. Quando uma malha não absorvível é implantada ocorre à deposição de colágeno ao redor e dentro dos filamentos da malha, resultando em cicatriz encapsulante e formação de aderências peritoneais (PREVEL et al.,1995)

#### **2.4 Aderências Peritoneais**

Aderências são faixas fibrosas ou fibrinosas que formam uniões anormais entre duas ou mais superfícies revestidas por serosas que não estejam originalmente aderidas umas às outras. (CROWE JR e BJORLING, 1998).

Após lesão peritoneal, aderências fibrinosas e reversíveis podem ser observadas dentro de 24 a 48 horas durante o estágio inflamatório da cicatrização. Essas aderências tendem a desaparecer de 48 a 72 horas, com a dissipação da fase inflamatória. Se a fase inflamatória persiste e se a rede de fibrina for substituída por capilares e fibroblastos, então se dá a formação de aderências irreversíveis. Portanto, aderências fibrinosas que permanecem até o quinto dia e contenham fibroblastos comumente persistem como aderências fibrosas permanentes (DEL CARLO et al., 1997).

As causas da formação de aderências são divididas em três tipos principais: por anóxia tecidual, por lesão à serosa e pela presença de material estranho. No período pós-operatório, as aderências podem ser decorrentes do ressecamento das superfícies serosas, infecção, manipulação traumática e presença de material estranho (BRITO E SILVA, 2009).

Del Carlo et al. (1997) citam que a abrasão causada pelas próteses sintéticas nos folhetos peritoneais parietal e visceral pode provocar uma maior resposta exudativa e consequente deposição de fibrina que se permanecer neste local leva a formação de aderências. Afirmando também que áreas isquêmicas incrementam a formação de aderências visto que a fibrina permanece mais tempo nessas regiões sem sofrerem fibrinólise.

Clinicamente, as aderências são classificadas como restritivas ou não restritivas. As restritivas têm consistência firme, se ligam firmemente as estruturas envolvidas e têm tendência a causar estrangulamento ou obstrução visceral. As aderências restritivas pós-operatórias se formam semanas após a cirurgia (CROWE JR e BJORLING, 1998).

Normalmente, a correção de hérnias abdominais com próteses induz a formação de aderências peritoneais. Telas de polipropileno (Marlex®), quando em contato direto com as vísceras, não são recomendadas por induzir a formação de aderências entre as vísceras e a formação de fístulas em 80-90% dos pacientes (GAERTNER et al., 2010).

Aramayo et al. (2013) avaliaram a cicatrização de hérnias incisionais em coelhos, usando três diferentes materiais, tendo observado que todos os tipos de malhas causaram aderências. Os autores relatam que o grupo que utilizou malha de polipropileno de alta densidade foi aquele que apresentou maior área de aderências e maior processo inflamatório agudo e crônico.

## **2.5 Termografia infravermelha**

Com o avanço da tecnologia, diferentes métodos para auxiliar o diagnóstico tornaram-se mais acessíveis aos profissionais da área da saúde, inclusive o médico veterinário. Dentre todos os exames existentes, as tecnologias de imagem ópticas, incluindo o método da Termografia Infravermelha, têm sido utilizadas. Na termografia, basicamente, a imagem infravermelha passa a ser um procedimento diagnóstico realizado por intermédio de mensuração da energia infravermelha emitida pelo corpo do animal examinado transformando-as em um mapa térmico, onde as variações anormais de temperatura representam o problema (CALKOSINSKI et al., 2015).

A termografia por infravermelho é um exame complementar de imagem ainda emergente utilizado para diagnóstico, monitorização e prognóstico na medicina humana. No entanto, é um campo já bem estabelecido e de uso rotineiro na engenharia. A principal razão para esse contraste é a falta de métodos precisos de utilização clínica para associar as leituras de temperatura da pele aos fenômenos fisiológicos anormais, uma vez que a temperatura da superfície corporal exposta é altamente dependente das condições ambientais, do metabolismo do indivíduo e do processo patológico (BRIOSCHI, 2011).

A termografia infravermelha permite registrar as condições tróficas dos tecidos, assim como, os mecanismos termorregulatórios, áreas alteradas de metabolismo tecidual e resposta inflamatória. O aumento do suprimento sanguíneo e do catabolismo tecidual que acompanha a reação inflamatória causa aumento significativo na temperatura local (CALKOSINSKI et al., 2015).

Uma característica positiva das medidas termográficas é a taxação sutil de suprimento sanguíneo em determinadas áreas, o que é percebida por aumento ou diminuição da temperatura local (FERNANDES et al., 2012).

O diagnóstico da inflamação em sua fase precoce é difícil de ser realizado quando feito através de análises bioquímicas, já que as alterações são restritas ao local da lesão e ainda não podem ser percebidas de modo sistêmico. Assim, a termografia infravermelha permite, de modo rápido, sem contato direto e não invasivo, mensurar a temperatura em tecidos corpóreos, evidenciando de maneira precoce a inflamação tecidual (CALKOSINSKI et al., 2015).

### 3 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFESO na 63ª reunião ordinária realizada no dia 07/05/2015 sob o protocolo de nº 435/15.

#### 3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar, sendo todos machos, adultos jovens, pesando em média 300 gramas e provenientes do Biotério do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO), localizado em Teresópolis, RJ.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, cada grupo com 4 subgrupos (Quadro 1) aos quais foram eutanasiados em diferentes períodos temporais, após serem submetidos, à cirurgia para colocação de implante em substituição à parede abdominal. Grupo PEBD - ratos submetidos à cirurgia de hernioplastia com colocação de implante de PEBD laminar bolhoso na parede abdominal. Grupo RÃ - ratos submetidos à cirurgia de hernioplastia com colocação de implante da pele de rã-touro na parede abdominal.

Os animais de cada grupo foram separados em diferentes gaiolas, devidamente identificadas, e alimentados *ad libitum*.

**Quadro 1:** Divisão em grupos e subgrupos de estudo e períodos de avaliação pós-operatória.

| Período pós-operatório | 7 dias             |                  | 15 dias             |                   | 30 dias             |                   | 90 dias             |                   |
|------------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|                        | PEBD <sub>7d</sub> | RÃ <sub>7d</sub> | PEBD <sub>15d</sub> | RÃ <sub>15d</sub> | PEBD <sub>30d</sub> | RÃ <sub>30d</sub> | PEBD <sub>90d</sub> | RÃ <sub>90d</sub> |
| Quantidade de animais  | 5                  | 5                | 5                   | 5                 | 5                   | 5                 | 5                   | 5                 |

Estes animais foram operados e mantidos no Biotério do Centro Universitário Serra dos Órgãos (UNIFESO).

## **3.2. Protocolo Anestésico**

O protocolo anestésico utilizado foi idêntico para todos os animais, tendo sido feita a indução anestésica com Quetamina e Xilazina 90 mg/kg + 09 mg/kg, por via, intraperitoneal (IP), respectivamente. Para analgesia foi usado Tramadol 30mg /kg por via subcutânea (FLECKNELL et al., 2007). Quando necessário, foi realizada manutenção anestésica com Isoflurano, em anestesia inalatória e circuito aberto por máscara (LEE et al., 1994).

Os animais foram colocados para se recuperar separadamente, em ambiente aquecido. Quando completamente despertos da anestesia, os animais foram transferidos para suas gaiolas de origem, sendo oferecida ração comercial padronizada para a espécie e água à vontade.

## **3.3 Protocolo Cirúrgico**

### **3.3.1 Aquisição e preparo das próteses**

O PEBD laminar bolhoso foi adquirido em papelaria, sendo todos de um mesmo lote e submetido ao processo de desinfecção à frio através de imersão em solução aquosa de clorexidina a 2% por 30 minutos, lavado abundantemente com solução fisiológica 0,9% estéril e estava pronto para uso.

As rãs-touro foram adquiridas de ranário comercial em Niterói (Ranit; <http://www.ranit.com.br/>) e transportados para o Laboratório de Histologia Integrativa da Universidade Federal do Rio de Janeiro, onde foram devidamente eutanasiadas por descerebração conforme preconiza a Resolução nº 714 de 20 de Junho de 2002, promulgada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária cuja atribuição lhe foi conferida pelo art. 16, alínea “f” da Lei nº 5.517186 de 23 de Outubro de 1968.

Após a eutanásia das rãs, segmentos contínuos da pele da região abdominal e dorsal foram removidos. Os fragmentos foram imersos em solução aquosa de clorexidina a 2% por 30 minutos, lavados abundantemente com solução fisiológica 0,9% estéril e congelados. Após um período, aproximado, de 24 horas, os fragmentos foram transportados em isopor com gelo para o Biotério do Centro Universitário Serra dos Órgãos, onde permaneceu congelada por no máximo até cinco dias até sua utilização. A pele de rã foi utilizada *in natura* sendo, no momento do uso, descongelada em solução salina estéril (Figura 2).

Por se tratar de um material biológico e, portanto passível de deterioração, pequenas amostras da prótese de pele de rã, foram coletadas imediatamente antes da sua implantação e enviadas para o Laboratório do Núcleo Biomédico, do Centro de Ensino Superior de Valença, da Fundação Educacional Dom André Arcoverde – Valença-RJ para realização de exame microbiológico e micológico, sob o número de registro 618.

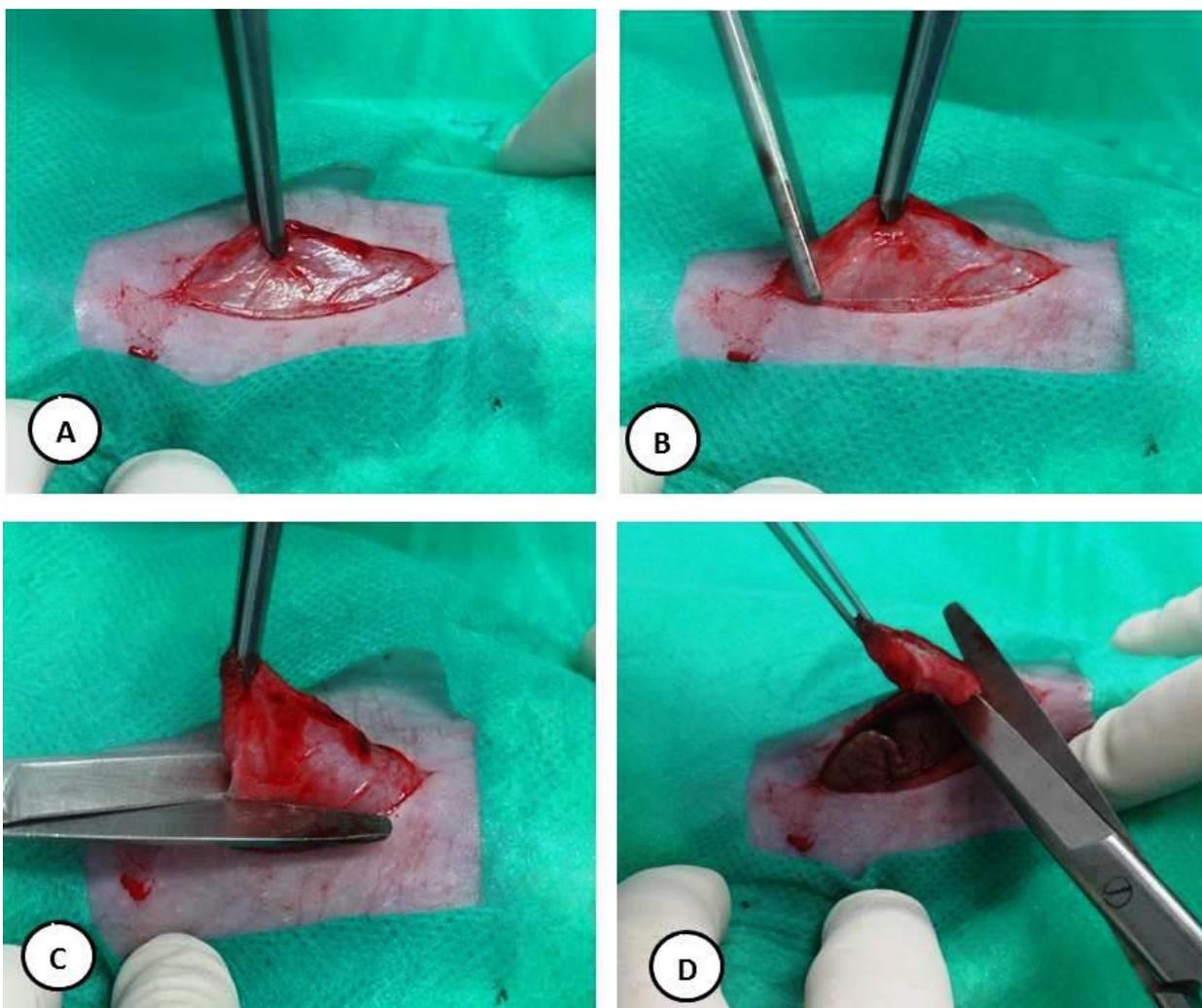


**Figura 2:** Fotomicrografia mostrando segmento da pele de Rã-touro, após descongelamento em solução fisiológica 0,9% estéril, imediatamente antes de sua implantação em parede abdominal dos ratos.

### 3.3.2 Técnica cirúrgica

Após realizada tricotomia cuidadosa, evitando formação de lesões, e ampla da região abdominal ventral, antissepsia com álcool 70% e com solução fisiológica estéril com posterior secagem e colocação de panos de campo estéreis, foi realizada incisão na linha média da pele, na região xifo-púbica, com dissecação de tecido subcutâneo. Foi criada uma falha em toda a espessura da parede abdominal, incluindo aponeuroses musculares, músculos e peritônio de 1,0cm no eixo transversal por 3,0 cm no eixo longitudinal, a partir da linha média em direção ao lado esquerdo da parede abdominal (Figura 3 e 4).

De acordo com o material utilizado na prótese de cada grupo, foi feito o implante no tamanho correspondente a falha criada. A prótese de PEBD laminar bolhoso foi colocada com a superfície bolhosa voltada para dentro da cavidade peritoneal, com o objetivo de reduzir a superfície de contato da prótese com as vísceras abdominais. A pele da rã-touro foi introduzida com a epiderme voltada para o subcutâneo do rato (superfície externa) objetivando deixar em contato com as vísceras abdominais a superfície dérmica, mais lisa e que produzisse menor atrito e consequentemente menos aderências peritoneais.

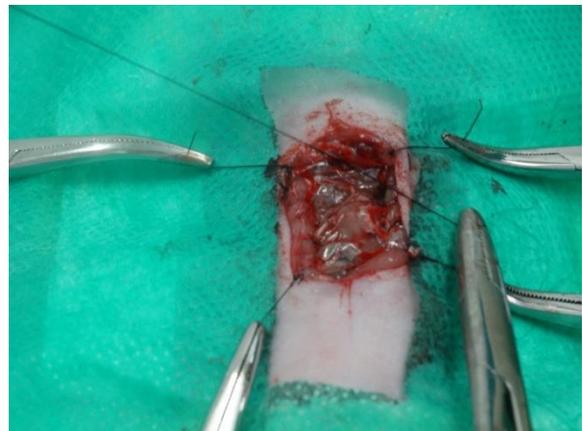


**Figura 3:** Fotomacrografia mostrando a sequência da confecção da falha em parede abdominal de rato Wistar. **A:** Primeira incisão, longitudinal, na linha alba, de aproximadamente 3cm; **B:** Segunda incisão, transversal a linha alba de aproximadamente 1,0cm. **C:** Terceira incisão, longitudinal paralela a linha alba. **D:** Última incisão fechando o retângulo criado.



**Figura 4:** Fotomacrografia mostrando a falha criada em toda a espessura da parede abdominal, incluindo aponeuroses musculares, músculos e peritônio de aproximadamente 1,0 cm no eixo transversal por 3,0 cm no eixo longitudinal.

A técnica para a implantação das próteses no defeito abdominal foi adaptada de Ricciardi et al., (2012), onde fragmentos foram suturados à musculatura da parede abdominal remanescente em seus quatro lados com sutura contínua simples e fio de náilon 4-0, reconstituindo a anatomia local. O subcutâneo e a pele foram fechados em plano único com pontos simples separados e fio de náilon 4-0.



**Figura 5:** Fotomacrografia mostrando a colocação das próteses de pele de rã-touro (à esquerda) e de PEDB (à direita).

### **3.4 Análises Pós-operatórias**

As avaliações pós-operatórias foram realizadas ao final dos períodos pré-estabelecidos para cada subgrupo, sendo aos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

#### **3.4.1 Avaliação clínica**

A avaliação clínica foi realizada baseada em dois aspectos: (1) comparação da média de peso dos grupos imediatamente antes do procedimento anestésico-cirúrgico e no dia da eutanásia e (2) avaliação clínica da ferida cirúrgica.

Os pesos dos animais foram aferidos individualmente no início e no fim do experimento, ou seja, no momento imediatamente antes da anestesia e no momento imediatamente antes da eutanásia. Para verificar se houve diferença entre as médias do peso de cada grupo entre após a colocação das próteses.

A ferida cirúrgica foi avaliada clinicamente durante o pós-operatório quanto à presença de edema, seroma, hematoma, secreção serosa, abscesso, fístula, deiscência de sutura e necrose. Para todos esses parâmetros foram estipulados níveis de gravidade: ausente [0], leve [1 (+)], moderado [2 (++)], grave [3 (+++)] e muito grave [4 (++++)].

A deiscência de sutura cutânea foi avaliada adaptando-se a classificação utilizada por Aramayo et al. (2013), sendo: Grau 0 - ausente, Grau 1 - deiscência de sutura parcial sem exposição da prótese, Grau 2 - deiscência de sutura total sem exposição da prótese, Grau 3 - deiscência de sutura parcial ou total com exposição da prótese e Grau 4 - deiscência de sutura com evisceração (Quadro 2).

#### **3.4.2 Avaliação da temperatura cutânea por termografia infravermelha**

##### **3.4.2.1 Obtenção das imagens infravermelhas**

Com a termografia infravermelha avaliou-se o comportamento com relação ao tamanho das próteses, assim como, o processo inflamatório que as mesmas produziram.

Primeiramente, cabe ressaltar que este é o primeiro estudo que utilizou técnica termográfica em animais para identificação de processos inflamatórios em hernioplastia, de

forma que a metodologia aqui apresentada se trata da primeira tentativa de estabelecimento de um protocolo de procedimento para aplicação desta técnica.

A mensuração da variação de temperatura cutânea foi realizada através da termografia infravermelha, utilizando um termógrafo da marca Flir®, modelo T420, Danderyd, Suécia, resolução 320 x 240, com uma sensibilidade termal de 0.045°C e emissividade 0,99.

Todo procedimento foi realizado em sala climatizada, com temperatura variando entre 21 e 24 graus, onde os animais eram deixados por uma hora antes da termografia, aclimatando. O termógrafo foi posicionado a uma distância vertical de, aproximadamente, 1m dos animais, que estavam sob contenção física, sem nenhum tipo de tranquilização. Os animais foram contidos e mantidos em decúbito dorsal, com o abdome devidamente tricotomizado.

O imageamento termográfico atinge basicamente a região cutânea do animal. Desta forma, cabe ressaltar que, o procedimento de tricotomia foi e deve ser realizado de forma cuidadosa para evitar qualquer tipo de lesão de pele, no abdome, que viesse a comprometer as imagens termográficas.

Uma vez tricotomizados e contidos, os animais foram mantidos sobre uma superfície com isolamento térmico com o intuito de evitar a influência da temperatura da mesa onde foram realizados os procedimentos de obtenção das imagens termográficas.

#### **3.4.2.2 Processamento das imagens infravermelhas**

As imagens obtidas pelo equipamento foram observadas com o auxílio do programa fornecido pelo fabricante, *Flir Tools*, utilizando a palheta de cores *Iron* para visualização da variação da temperatura. Nestas imagens era possível observar as variações de temperatura no abdome do animal, mas não foi possível distinguir, com clareza, regiões ou locais que, por ventura, viessem apresentar alterações de temperatura decorrentes de processos inflamatórios oriundos dos implantes das próteses.

Todo o procedimento para a identificação dos processos inflamatórios decorrente da implantação das próteses no abdome do rato partiu do princípio que estes processos seriam observados nas margens da prótese suturada na musculatura da parede abdominal. Como se trata de uma região muito estreita, o imageamento termográfico, tal qual obtido pelo equipamento, não foi o suficiente para distinguir tais processos. Desta forma, optou-se por trabalhar com o

gradiente de temperatura, onde o mesmo, por definição, ressaltaria os locais onde haveriam maiores e menores variações de temperatura.

Todo processo inflamatório gera um aumento da temperatura no local da lesão, criando, assim, um aumento do gradiente de temperatura entre as regiões circunvizinhas. O gradiente é definido pela diferença de temperatura entre dois pontos em relação à distância entre os mesmos ( $\nabla^{\circ}\text{C} = T_1 - T_2 / pxl$ ). Assim, a unidade do gradiente dependerá da unidade de medida de distância entre os pontos considerados. Neste trabalho, optou-se por calcular o gradiente em relação aos pixels da imagem. Desta forma, a unidade de medida do gradiente de temperatura calculado é expressa em  $^{\circ}\text{C pxl}^{-1}$ .

Ainda que a prótese tenha sido implantada no sentido longitudinal em relação ao abdome do rato, esperando-se, desta forma, que as maiores variações de temperatura seriam no sentido transversal à prótese, optou-se por calcular o gradiente de temperatura nos dois sentidos: longitudinal e transversal ao abdome do rato ( $\nabla^{\circ}\text{C} = |\nabla_x| + |\nabla_y|$ ). Neste caso, estaríamos considerando todas as variações de temperatura que houvesse em qualquer direção.

Para calcular o gradiente, segundo a fórmula descrita no parágrafo acima, as informações de temperatura por pixel foram obtidas a partir das imagens termográficas utilizando o programa *Flir Tools*, gerando uma matriz regular desta propriedade, sendo, em seguida, processadas no MatLab para a obtenção dos gradientes de temperatura (Figura 6 e 7).

### **3.4.2.3 Dimensionamento das áreas da prótese e inflamadas**

Uma vez determinadas as imagens do gradiente de temperatura, as mesmas foram processadas no programa Image J para o cálculo da área da prótese, quando possível sua identificação, e dos processos inflamatórios, quando presentes. Como não foi possível calibrar a imagem a qualquer unidade de medida de distância, as medidas de área foram determinadas por pixels.

Os critérios utilizados para a identificação da área da prótese e dos processos inflamatórios oriundos da sua implantação da mesma foram determinados a partir da observação e análise de todos os resultados obtidos nesta análise, quais sejam:

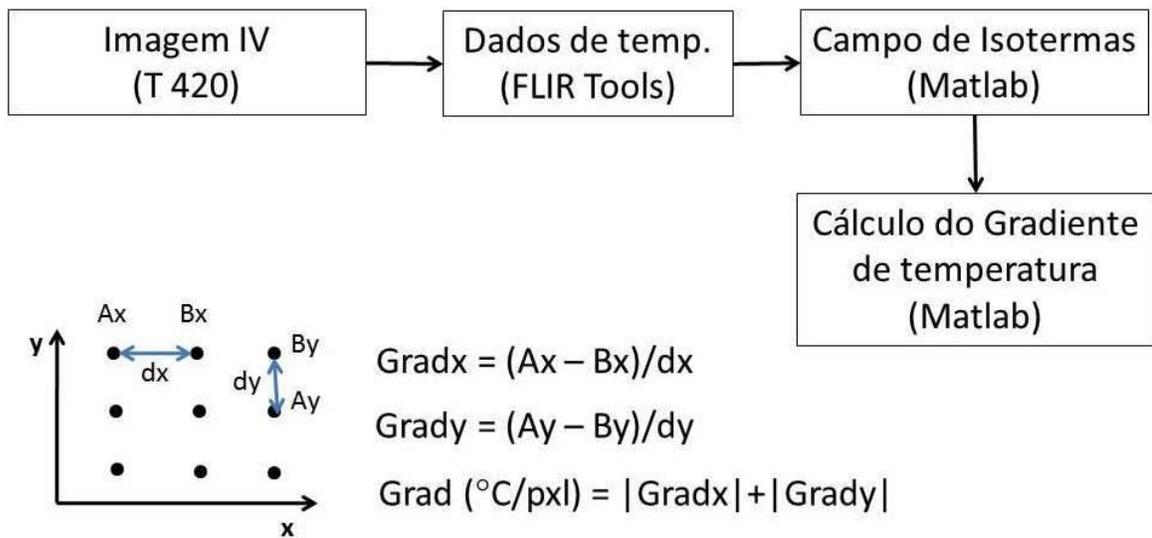
- Fotografias de alta definição do abdome do rato, após tricotomia cuidadosa, em todos os períodos estabelecidos para as análises;

- Análise das imagens termais obtidas pelo equipamento;
- Análise do comportamento das isotermas no abdome do rato;
- Gráficos de linhas de temperatura transversais ao abdome do rato e, por conseguinte, do posicionamento do implante da prótese;
- Estabelecimento, com base nas análises acima, do gradiente de temperatura entre 0,2 e 0,4 °C  $\text{pxl}^{-1}$  como determinantes para a identificação da posição da prótese e dos processos inflamatórios.
- A identificação da prótese se deu com base nos valores de gradiente de temperatura referidos acima, junto a continuidade lateral dos pixels com tais valores. Uma vez interpretada a localização da prótese, a área foi calculada no programa ImageJ;
- A área de inflamação oriunda do implante foi identificada com gradientes a partir de 0,35 °C  $\text{pxl}^{-1}$ , aproximadamente, sempre acompanhando o posicionamento da prótese que foi percebida com gradientes de 0,2°C  $\text{pxl}^{-1}$ . Assim como a área da prótese, a área do processo inflamatório também foi interpretada e calculada com o auxílio do programa ImageJ.

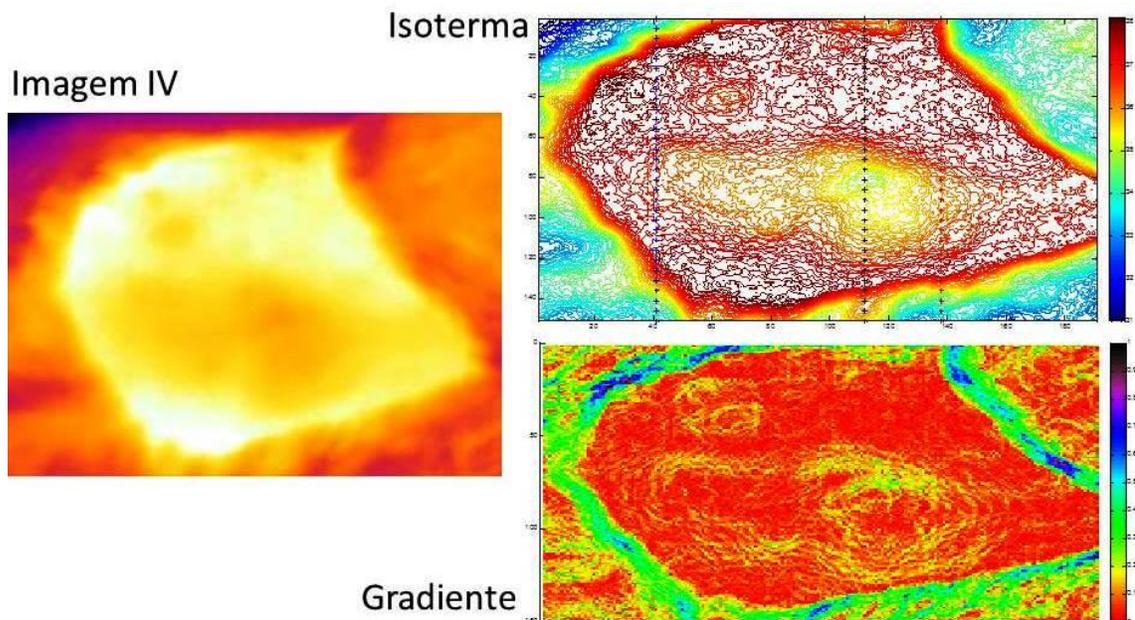
A fim de evitar uma super ou subestimação das dimensões da área da prótese e dos processos inflamatórios, em virtude das distorções das imagens, algumas com visões mais aproximadas que outras, optou-se por criar uma medida normalizada da área das medidas de interesse. Desta forma, as dimensões das medidas de interesse foram determinadas no programa ImageJ, como mencionado acima, e normalizadas pela área da imagem total ( $A_N = A_{prt \text{ ou } infl} / A_{img}$ , onde  $A_N$  – área normalizada;  $A_{prt \text{ ou } infl}$  – área da prótese ou processo inflamatório;  $A_{img}$  – área da imagem).

Todo o procedimento de processamento das imagens termográficas foi realizado nos grupos de ratos nos dias 7, 15, 30 e 90 dias de experimento.

Cabe ressaltar que a avaliação e determinação das áreas de interesse nas imagens foram realizadas em duplo cego por um único observador sendo todos os valores tabelados e as medianas de cada grupo estabelecidas.



**Figura 6:** Fluxograma de processamento do imageamento infravermelho.



**Figura 7:** Imagem infravermelha; Isoterma e Gradiente de temperatura.

### 3.4.3 Análise macroscópica

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 7º, 15º, 30ª e 90º dia do período pós-operatório, em câmara fechada com dióxido de carbono, para coleta de parede abdominal. Entretanto, antes da coleta foi realizada análise macroscópica da cavidade para verificação da presença de aderências peritoneais.

Foi realizada incisão em forma de "U" ao longo da parede abdominal. O defeito foi reparado em ambos os lados e foi avaliada a taxa de adesão e as vísceras envolvidas nas aderências abdominais à tela em questão (KIST et al., 2012).

Esta análise foi realizada adaptando-se a classificação utilizada por Diogo-Filho et al. (2004). As aderências foram classificadas em diferentes graus: Grau 0 - ausência de aderências; Grau 1 - número reduzido ( $\leq 3$ ) de aderências, de caráter fibrinoso, facilmente desfeitas pela manipulação, sem lesionar a víscera envolvida; Grau 2 - aderências firmes ( $>3$ ), resistentes à manipulação entre a parede abdominal e órgão ou estrutura; Grau 3 - aderências firmes, resistentes à manipulação, entre alças intestinais, mas não envolvendo parede abdominal; Grau 4 - aderências firmes, resistentes à manipulação entre alças e entre alças e a parede abdominal, com fístula entérica (Quadro 2).

**Quadro 2:** Gradação baseada em escores atribuídas a parâmetros clínicos e análises macroscópicas.

| Parâmetros           | Escores | 0       | 1 (+)   | 2 (++)   | 3 (+++)  | 4(++++)  |
|----------------------|---------|---------|---|--|--|--|
| Análises Clínicas    | Ausente | Ausente | Leve  | Moderado   | Grave  | Muito Grave  |
| Deiscência de sutura | Ausente | Ausente | Parcial sem exposição da prótese  | Total sem exposição da prótese   | Parcial ou total com exposição da prótese  | Evisceração  |
| Aderências           | Ausente | Ausente | Número reduzido de aderências ( $\leq 3$ ), de caráter fibrinoso, facilmente desfeitas pela manipulação | Aderências firmes ( $>3$ ) resistentes à manipulação, entre a parede abdominal e um órgão ou estrutura | Aderências firmes, resistentes à manipulação, entre alças intestinais, porém não envolvendo parede abdominal | Aderências firmes, resistentes à manipulação, entre alças e entre alças e a parede abdominal, com fístula entérica |

### **3.4.4 Análise microscópica**

O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Histologia Integrativa da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **3.4.4.1 Análise estrutural em microscopia de luz**

Fragmentos de parede abdominal, contendo interface implante-hospedeiro, foram coletados após análise macroscópica e mantidos fixados esticados presos a peças de plástico rígidas e fixados em solução de formol 10% tamponada por 72 horas.

Os fragmentos foram submetidos ao procedimento da técnica histológica para inclusão em parafina, que inclui as seguintes etapas: desidratação (concentração crescentes de álcool etílico: álcool 70%, 90% e 100% (2 banhos), 40 minutos cada), clarificação em xilol (2 banhos sucessivos de 30 min. cada), inclusão em parafina líquida (dois banhos à 60°C, à vácuo) e emblocamento em parafina. Todo esse procedimento foi feito no processador automático de tecidos da marca Leica, modelo TP1020. Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos com o auxílio de um micrótomo manual da marca Leica, modelo RM2125RTS.

Os cortes foram submetidos à diferentes tipos de coloração.

##### **3.4.4.1.1 Coloração pela hematoxilina-eosina**

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, hidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico (álcool 100%, 90%, 80% e 70%) e lavados em água destilada. Procedeu-se à coloração pela hematoxilina de Harris, por 10 segundos, que foi seguida de lavagem em água corrente por 6 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos à coloração pela eosina, durante 10 segundos. Após rápida lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados em álcool etílico (álcool 70%, 90% e 100%), clarificados em dois banhos de xilol e montados com lamínulas, usando-se entellan (Entellan® new, Merck) (LILLIE e FULLMER, 1976).

Neste método, as estruturas basófilas, como o núcleo, coram-se em azul e as estruturas acidófilas, como citoplasma, coram-se em róseo.

#### **3.4.4.1.2 Técnica de coloração pelo Tricrômico de Mallory**

Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, hidratados e lavados em água destilada. Os cortes foram corados pela fucsina ácida à 1% por 2 minutos, lavado em água destilada e submetidos ao ácido fosfomolibdico à 1% por 2 minutos e rapidamente lavado com água destilada. Posteriormente, os cortes foram codados pela solução com orange G 2%, azul de metila à 0,5% em ácido oxálico à 2%. Depois os cortes foram lavados em água destilada, desidratados, clarificados e montados com lamínulas, usando-se entelan (Entellan® new, Merck) (LILLIE e FULLMER, 1976).

Os núcleos coram-se em azul, as fibras colagenosas em azul e o tecido muscular em laranja.

#### **3.4.4.1.3 Técnica de coloração pelo Picrossírius red com posterior observação ao microscópio de polarização**

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados e em seguida corados por 1 hora pelo picrossírius red (solução 0,1% de Sirius Red F3BA em solução aquosa saturada de ácido pícrico). Posteriormente, os espécimes foram imersos em solução de ácido clorídrico 0,1N por 2 minutos, visando retirar o excesso de corante, e logo a seguir em água destilada. Depois os cortes foram corados pela hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavados em água corrente por 20 minutos, seguindo-se com desidratação, clarificação e montagem das lâminas utilizando-se entelan (Entellan® new, Merck) e lamínula (JUNQUEIRA et al., 1979).

Feixes de fibras colagenosas espessas, em arranjo compacto, são evidenciados em vermelho, fortemente birrefringente, enquanto que as fibras colagenosas em arranjo frouxo apresentam-se verde-amareladas, fracamente birrefringentes.

#### **3.4.4.2 Imuno-histoquímica**

Os cortes destinados ao estudo pela imuno-histoquímica foram coletados em lâminas silanizadas para evitar o desprendimento do corte durante o procedimento da técnica. Os cortes foram desparafinizados e hidratados. Em seguida, os cortes foram tratados com uma solução de bórax 1% por 15 minutos para inibição dos grupamentos aldeídicos. Após lavagem com água destilada, a peroxidase endógena foi bloqueada com 1 banho de 20 minutos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 15% em metanol. Posteriormente, os cortes foram lavados duas vezes em tampão fosfato salina (PBS) e

colocados em solução de soro de albumina bovina (BSA) a 3% em PBS por 1 hora e lavado novamente em PBS por 5 minutos. Em seguida, o material foi incubado com anticorpo primário, relacionados abaixo, “overnight”, e lavado em solução de tripsina 0,01% em tampão PBS. Após esta lavagem, o material foi então incubado com anticorpo secundário (Envision, anti-mouse – DAKO) por 1 hora e lavado em tampão PBS. Para revelar a reação, os cortes foram incubados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos e lavados com água corrente seguida de lavagem em PBS. Finalmente, os cortes foram contracorados com hematoxilina, diferenciados em água corrente por 4 minutos, desidratados, clarificados em xilol e montados com lamínulas, usando-se Entellan®.

Os Anticorpos Monoclonais anti-humanos utilizados foram: Citoqueratina (pancitoqueratina) – clone AE1/AE3, fornecedor DAKO cat. n<sup>o</sup> M3515, na diluição de 1:50 e Actina de músculo liso – clone HH35, fornecedor DAKO cat. n<sup>o</sup> M0635 na diluição 1:50.

A imuno-histoquímica com citoqueratina foi realizada para podermos acompanhar a desintegração da epiderme da prótese composta de pele de rã ao longo dos diferentes períodos estudados. E a imuno-histoquímica com alfa-actina foi realizada com objetivo de se acompanhar a neovascularização próxima aos implantes também ao longo dos diferentes períodos estudados.

As imagens histológicas foram obtidas com o auxílio de um microscópio Leica DMLS 30 e capturadas através de uma câmera digital Leica DFC425.

#### **3.4.4.3 Análise histopatológica**

Nas lâminas coradas com Hematoxilina-eosina foi realizada a análise histopatológica, sendo a leitura das lâminas realizada de forma descritiva e semi-quantitativa, onde se observaram aspectos como a interação entre a pele do rato e as próteses utilizadas, o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório, assim como, a localização histológica da inflamação. Realizou-se análise de características histológicas secundárias, dentre elas, edema, hemorragia, congestão e a presença de formação de novos vasos (angiogênese).

A intensidade da inflamação foi avaliada através de escores, estabelecidos em duplo cego por um único observador, que em menor aumento, no aumento de 4x, considerou como processo inflamatório leve se 10% do fragmento histológico observado for de células inflamatórias, como processo inflamatório moderado se 10-50% do fragmento histológico observado for de células

inflamatórias e processo inflamatório acentuado acima de 50% do fragmento histológico constituído de inflamação.

As características secundárias foram avaliadas quanto à presença ou ausência e suas respectivas localizações histológicas nas amostras. Para a análise de formação de novos vasos (angiogênese) foi realizada a média do número de vasos em 10 campos de observação aleatórios em objetiva de 40x.

### **3.4.5 Análise estatística**

Na comparação do peso dos animais antes e após a colocação das próteses foi utilizado o teste “t” de Student.

Após testada normalidade, para verificar se houve diferença entre as medidas de escores de processo inflamatório, decência de sutura e presença e grau de aderências foram aplicados os Testes Não paramétricos de Kruskal-Wallis para comparação entre grupos (Rã e PEBD), relativos aos períodos pós-operatório estabelecidos nas análises. Quando encontrada diferença significativa entre os grupos com o teste anterior, foi aplicado o Teste Mann-Whitney entre os dois grupos considerando o mesmo período pós-operatório estudado.

## 4 RESULTADOS

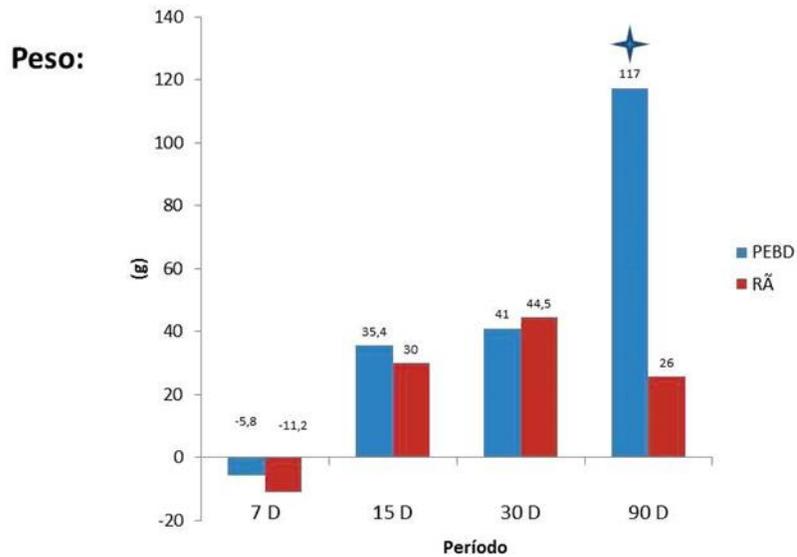
Durante o procedimento cirúrgico, a partir do manuseio de ambas as próteses, foram possíveis identificar algumas características do material implantado. A pele de rã-touro se mostrou um material de fácil manuseio, flexível, elástico, resistente à ruptura e que se adapta bem ao defeito criado. Apresentou textura compatível para a passagem da agulha e do fio de sutura, sem necessidade de força excessiva no momento da passagem da agulha e não se rompendo após esta passagem.

O PEBD laminar bolhoso se apresentou como um material de fácil manuseio, flexível, sem elasticidade, frágil à ruptura, que se rompe com facilidade na passagem da agulha traumática e fio de sutura, tendo sido colocado sempre com tamanho um pouco maior que o defeito existente na parede abdominal para evitar excesso de tensão e consequente ruptura do plástico.

Os resultados dos exames microbiológico e micológico dos fragmentos de pele de Rã-touro submetidos à clorexidina à 2% revelou que não houve crescimento bacteriano e nem fúngico.

### 4.1 Avaliação Clínica

Como uma primeira avaliação clínica geral do experimento, observou-se que nenhum animal expulsou a prótese implantada até o final do período máximo do experimento. Apenas um animal, do grupo com implante de pele de rã do Grupo RÃ<sub>30d</sub>, veio a óbito no 24º dia pós-operatório, sem causa definida e sem apresentar sinais clínicos prévios de infecção local ou rejeição a prótese. Além disso, ressalta-se que nenhum animal necessitou de antibioticoterapia e, tampouco, de administração de anti-inflamatórios no período pós-operatório. Com relação ao peso, todos os animais eutanasiados com 7 dias de pós-operatório apresentaram perda de peso. O grupo PEBD<sub>7d</sub> perdeu em média de 5,8 gramas, enquanto que o grupo RÃ<sub>7d</sub> perdeu 11,2 gramas. Nos períodos de 15, 30 e 90 dias de pós-operatório, os animais dos grupos PEBD e rã, apresentaram ganho de peso (Figura 8).



**Figura 8:** Variação dos pesos no momento imediatamente anterior ao procedimento cirúrgico de colocação das próteses e no momento imediatamente anterior a eutanásia dos grupos do experimento.

Quando comparados estatisticamente observou-se que: os animais do grupo Rã<sub>7d</sub> e PEBD<sub>7d</sub>, perderam peso sem diferença significativa entre o momento anterior a cirurgia e o dia da eutanásia, os grupos Rã<sub>15d</sub>, PEBD<sub>15d</sub>, Rã<sub>30d</sub>, PEBD<sub>30d</sub> e Rã<sub>90d</sub> ganharam peso sem diferença significativa entre o momento imediatamente anterior a cirurgia e o momento da eutanásia, ou seja, entre o início e o fim do experimento. Nos animais do grupo PEBD<sub>90d</sub> houve ganho ponderal significativo ( $p_t=0,014$ ;  $p<0,05$ ).

Nenhum animal de ambos os grupos apresentou seroma, hematoma, abscesso, fístula, necrose, eventração ou evisceração. Todavia, alguns animais apresentaram edema e/ou deiscência de sutura cutânea (Quadro 3).

**Quadro3:** Número de animais com alterações clínicas nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.

| Período de Pós -<br>operatório | 7 dias |    | 15 dias |    | 30 dias |    | 90 dias |    |
|--------------------------------|--------|----|---------|----|---------|----|---------|----|
|                                | PEBD   | Rã | PEBD    | Rã | PEBD    | Rã | PEBD    | Rã |
| Edema                          | 2      | -  | -       | -  | -       | -  | 1       | -  |
| Deiscência de sutura           | -      | 2  | -       | 3  | 1       | 2  | 1       | 1  |

Nos grupos que receberam a prótese de pele da rã-touro, 40% dos animais apresentaram deiscência de sutura nos períodos avaliados, enquanto que no grupo PEBD, 10% dos animais revelaram deiscência de sutura nos períodos avaliados (Quadro 4).

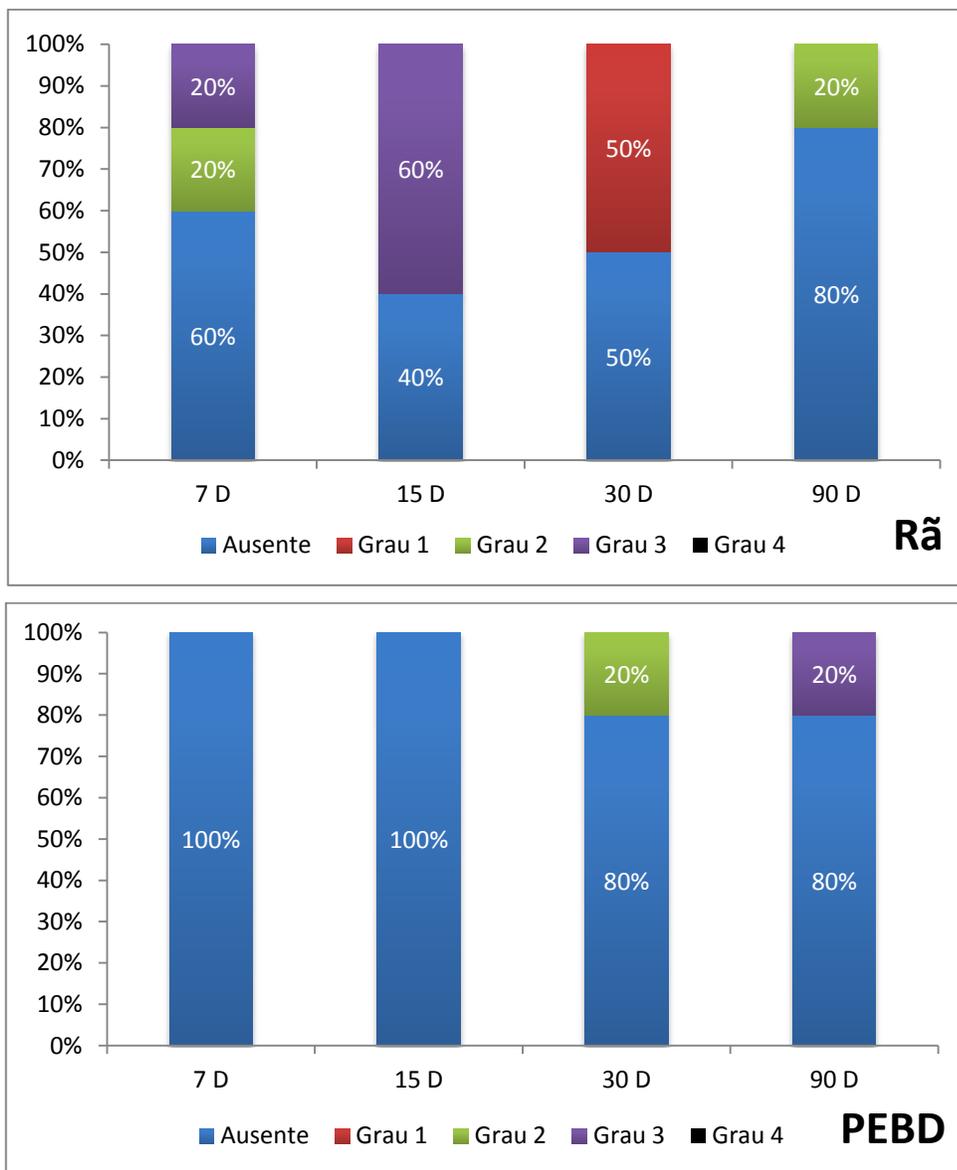
**Quadro 4:** Graduação das deiscências de sutura apresentadas nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório. **0 – Ausente; + - Parcial sem exposição da prótese; ++ - Total sem exposição da prótese; +++ - Parcial ou total com exposição da prótese; ++++ - Evisceração.**

| Grupos   | PEBD <sub>7d</sub> | RÃ <sub>7d</sub> | PEBD <sub>15d</sub> | RÃ <sub>15d</sub> | PEBD <sub>30d</sub> | RÃ <sub>30d</sub> | PEBD <sub>90d</sub> | RÃ <sub>90d</sub> |
|----------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Animal 1 | 0                  | +++              | 0                   | +++               | ++                  | +                 | +++                 | ++                |
| Animal 2 | 0                  | ++               | 0                   | +++               | 0                   | +                 | 0                   | 0                 |
| Animal 3 | 0                  | 0                | 0                   | +++               | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 4 | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 5 | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | -                 | 0                   | 0                 |

Nos grupos que receberam implante da pele de rã-touro, os animais com deiscência de sutura e exposição da prótese (Grau 3) não apresentaram evisceração, sem sinais clínicos de infecção local (supuração e/ou abscesso), não tendo sido observado peritonite em nenhum momento do pós-operatório. Na avaliação clínica aos 90 dias de pós-operatório, os animais com deiscência de sutura já apresentavam tecido de granulação recobrimo a prótese.

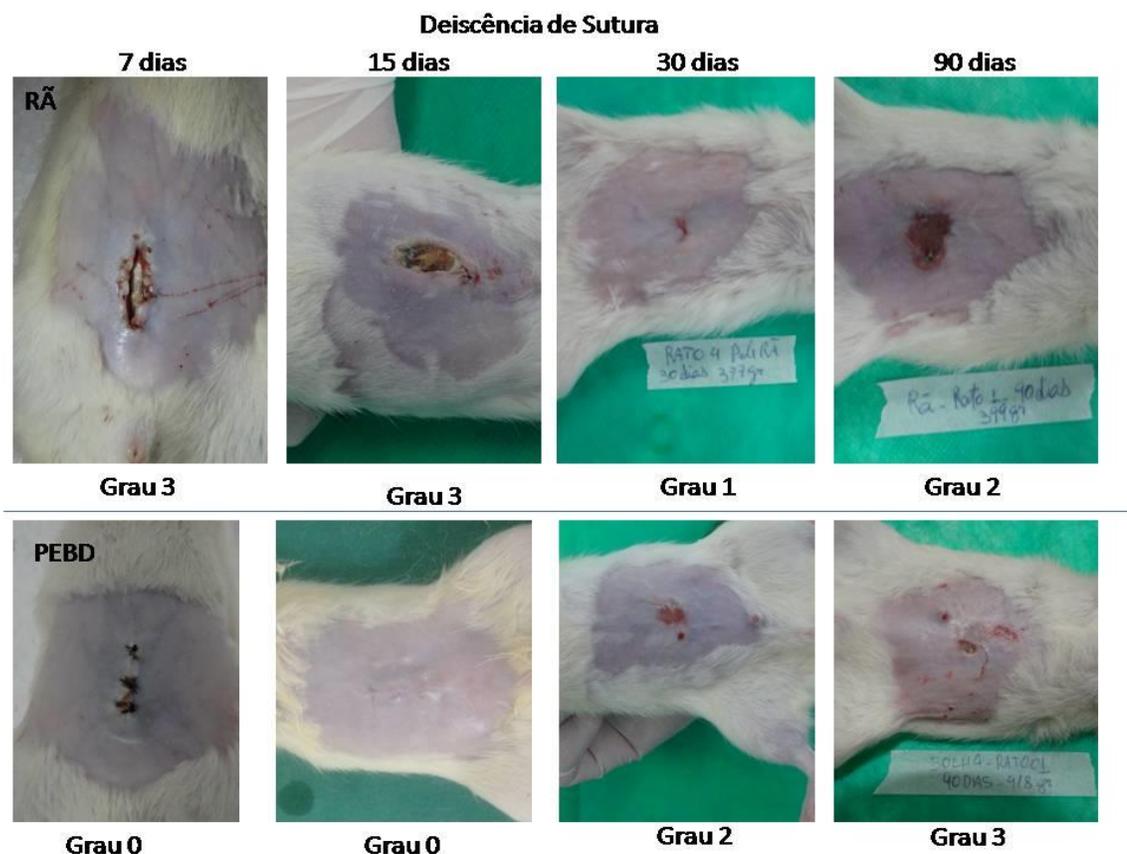
No Grupo RÃ<sub>7d</sub> 40% dos animais mostraram deiscência de sutura, sendo metade de grau 3 e metade de grau 2. No grupo Rã<sub>15d</sub>, 60% dos animais apresentaram deiscência de sutura, sendo todas de Grau 3 com exposição da prótese. No grupo Rã<sub>30d</sub>, 50% dos animais mostraram deiscência de sutura, sendo todas de Grau 1 sem exposição da prótese. No grupo Rã<sub>90d</sub>, 20% dos animais revelaram deiscência de sutura, sendo de Grau 1 parcial e sem exposição da prótese conforme mostram as figuras 9 e 10.

Nos Grupos PEBD a deiscência de sutura ocorreu aos 30 e 90 dias de pós-operatório, sendo que aos 30 dias de pós-operatório 20% dos animais mostraram deiscência de Grau 2, enquanto que aos 90 dias 20% dos animais tiveram deiscência de Grau 3, com exposição da prótese (figura 9 e 10).



**Figura 9:** Gráfico mostrando o percentual de animais que apresentaram deiscência de sutura nos períodos de 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório e o grau destas deiscências.

Nenhum animal dos dois grupos do experimento expeliu a prótese. Todavia, um animal do grupo PEBD<sub>90d</sub> apresentou deiscência de sutura, exteriorizando o plástico parcialmente.



**Figura 10:** Fotomacrografia mostrando diferentes graus de deiscência de sutura nos diferentes períodos pós-operatórios estudados no grupo Rã e no grupo PEBD.

Três animais do grupo PEBD<sub>7d</sub> formaram edema moderado, mas em nenhum outro animal foi visualizado edema (Quadro 5).

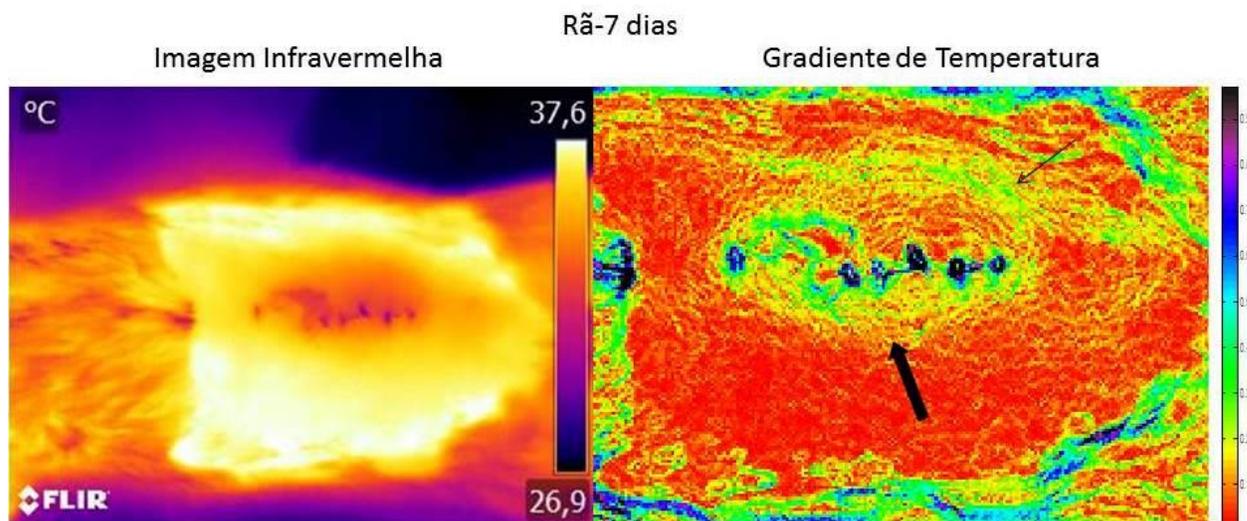
**Quadro 5:** Graduação dos edemas apresentados nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.

| Grupos   | PEBD <sub>7d</sub> | Rã <sub>7d</sub> | PEBD <sub>15d</sub> | Rã <sub>15d</sub> | PEBD <sub>30d</sub> | Rã <sub>30d</sub> | PEBD <sub>90d</sub> | Rã <sub>90d</sub> |
|----------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Animal 1 | +++                | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 2 | +++                | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 3 | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 4 | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 | 0                   | 0                 |
| Animal 5 | 0                  | 0                | 0                   | 0                 | 0                   | -                 | 0                   | 0                 |

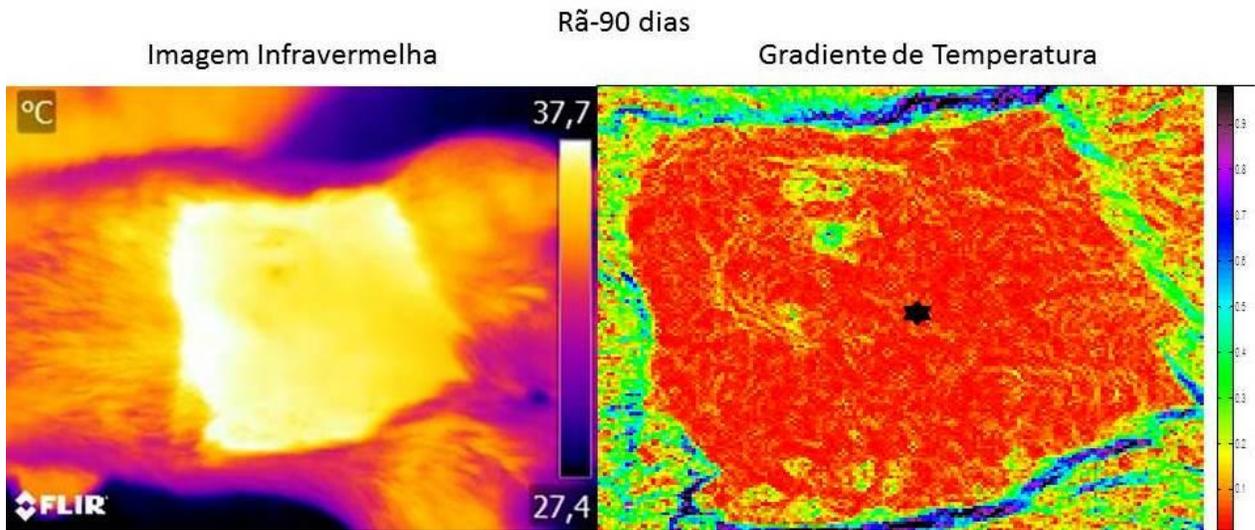
## 4.2 Termografia Infravermelha

Na análise da imagem infravermelha observou-se que a temperatura do abdome dos ratos variou de 37,5 a 38°C em todas as regiões que não sofreram nenhum tipo de intervenção, apenas a tricotomia. Na região da cicatriz cirúrgica a temperatura se apresentou mais baixa que em qualquer outra região do abdome do rato, variando de 33,5 a 34,5°C. Na região onde se encontravam as próteses, tanto do grupo Rã quanto no grupo PEBD, a temperatura ficou em torno de 35°C (Figuras 11 e 13).

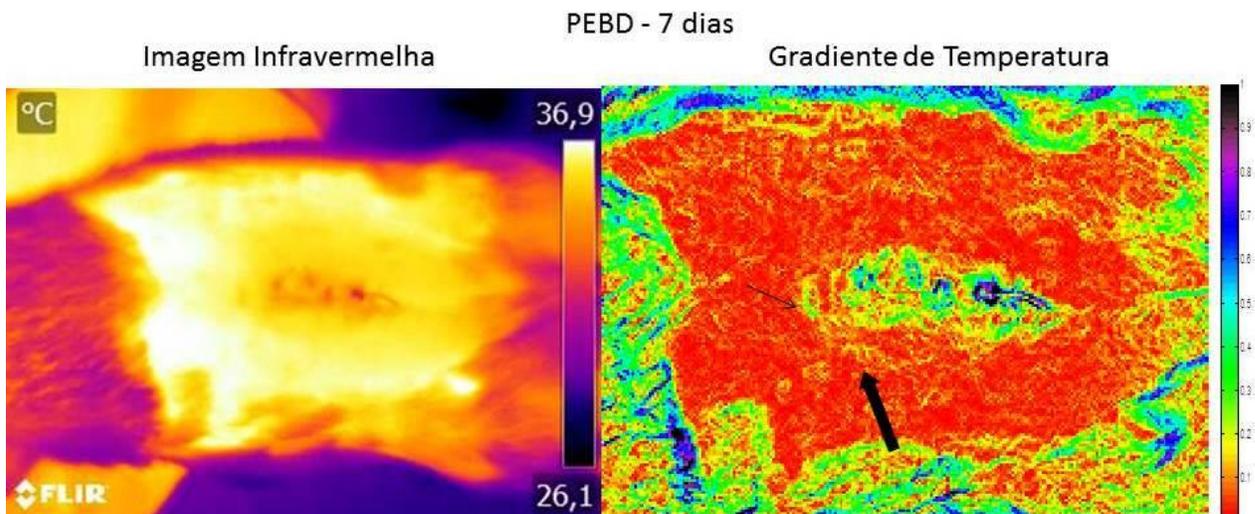
Após processamento matemático e geração do gradiente de temperatura observou-se que as regiões onde o gradiente formado era próximo de  $0,2^{\circ}\text{C pxl}^{-1}$  (amarelo) e estava na região onde havia sido implanta a prótese, a interpretação desta área correspondia à prótese. Assim como a região que apresentou gradiente em torno de 0,3 a  $0,4^{\circ}\text{C pxl}^{-1}$  (verde) e estava margeando a prótese correspondia ao processo inflamatório gerado por ela conforme mostram as figuras 11, 12, 13 e 14.



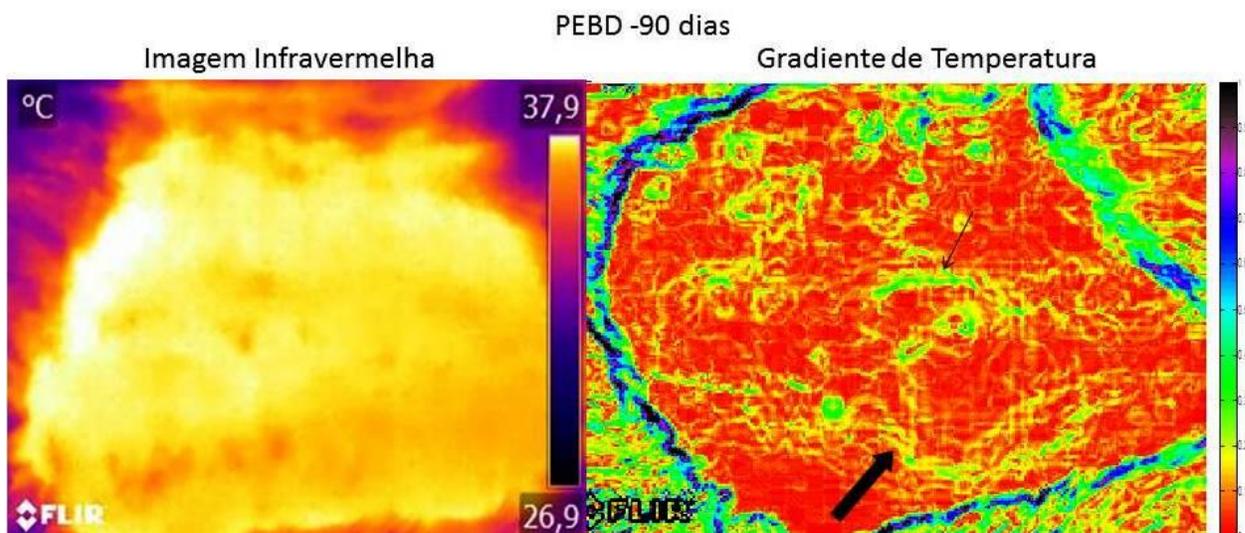
**Figura 11:** Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo Rã<sub>7d</sub>. Notar no gradiente a presença de imagem correspondente à prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde (seta fina).



**Figura 12:** Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo Rã<sub>90d</sub>. Notar no gradiente a ausência de imagem correspondente à prótese e/ou ao processo inflamatório por este gerado (estrela).

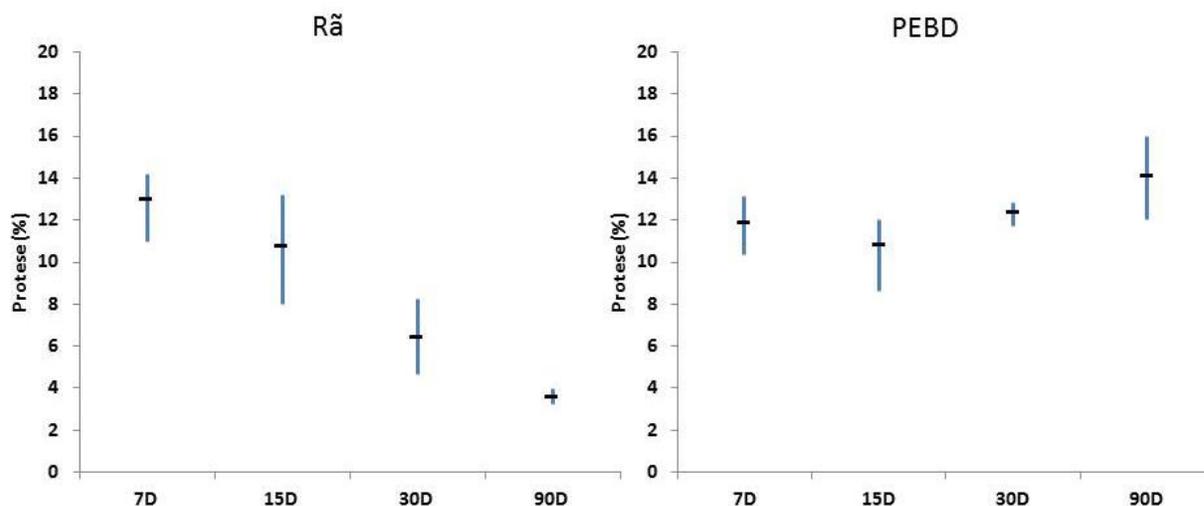


**Figura 13:** Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo PEBD<sub>7d</sub>. Notar no gradiente a presença de imagem correspondente à prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde (seta fina).



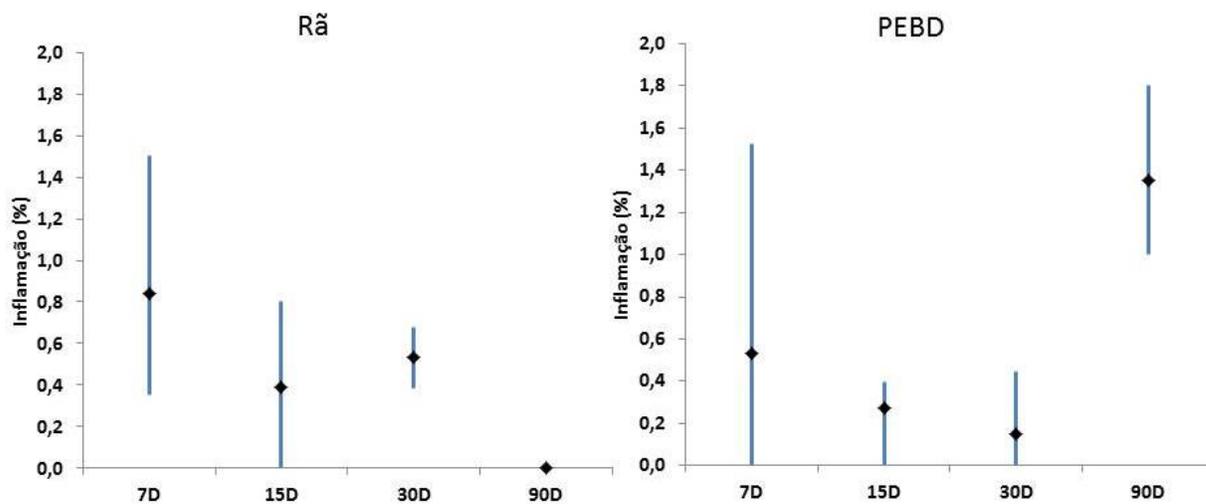
**Figura 14:** Imagem infravermelha (Esquerda) e Gradiente de temperatura (Direita) de abdome de rato Wistar pertencente ao grupo PEBD<sub>90d</sub>. Notar no gradiente a presença de imagem correspondente à prótese em tons de amarelo (seta larga) e a presença de imagem correspondente a processo inflamatório em tons de verde (seta fina).

Após a geração dos gradientes e mensuração das áreas através do Software Image J nota-se, com relação ao tamanho da prótese, que nos animais que receberam prótese de pele de Rã esta contraiu, com sete dias de pós-operatório a prótese mediu em média 12,7% de área normalizada analisada, com 15 dias 10,7%, com 30 dias 6,4% e com 90 dias 3,6% (Figura 15). Nos animais que receberam a prótese de PEBD o tamanho da prótese se manteve constante. Com sete dias de pós-operatório a prótese mediu em média 11,8% da área analisada, com 15 dias 10,5%, com 30 dias 12,3% e com 90 dias 12,6% (Figura 15).



**Figura15:** Gráficos demonstrando o comportamento, com relação à área, da prótese de Rã e PEBD, mensurado através da termografia infravermelha, nos diferentes períodos pós-operatórios estudados.

O processo inflamatório esteve presente em quase todos os períodos pós-operatórios estudados. O grupo que recebeu a prótese de pele de Rã apresentou um comportamento diferente do grupo que recebeu prótese de PEBD. A inflamação no grupo Rã, aos sete dias de pós-operatório ocupou, em média, de 0,9% da área analisada; com 15 dias 0,4%; com 30 dias 0,53% chegando a zero com 90 dias de pós-operatório. No grupo que recebeu prótese de PEBD a inflamação ocupou, em média, de 0,68% da área analisada, 0,22% aos 15 dias, 0,2% aos 30 dias e 1,25% aos 90 dias de pós-operatório (Figura 16), evidenciando um aumento brusco neste último período analisado.



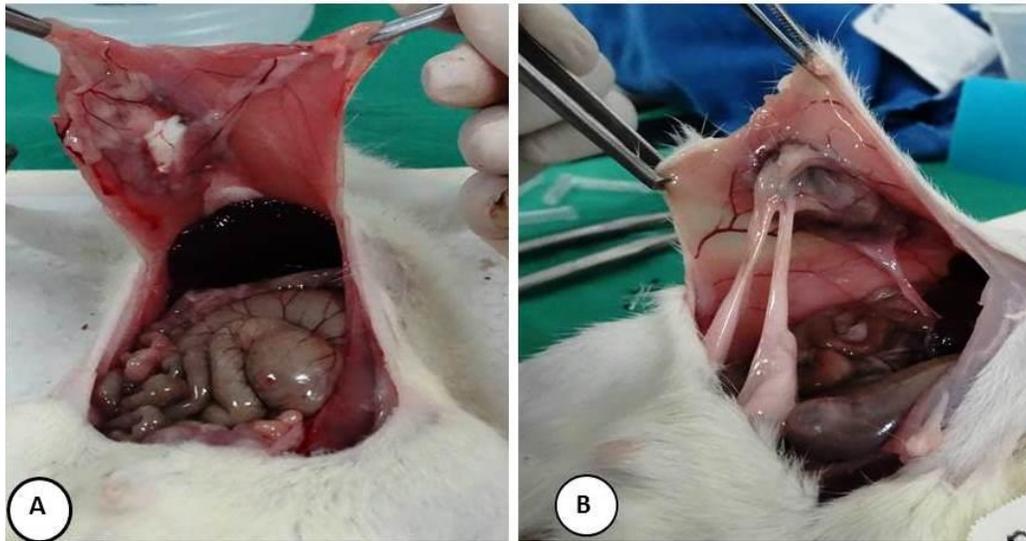
**Figura 16:** Gráfico demonstrando o percentual de área inflamada, mensurada através de termografia infravermelha, na região analisada nos grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios estudados.

### 4.3 Avaliação Macroscópica

Todos os animais deste estudo apresentaram aderências em todos os períodos pós-operatórios estudados, 7 dias (Figura 17), 15 dias (Figura 18), 30 dias (Figura 19) e 90 dias (Figura 20). No grupo PEBD<sub>7d</sub>, todos os animais exibiram uma massa intraperitoneal recobrindo toda a área do implante (Figura 17B).

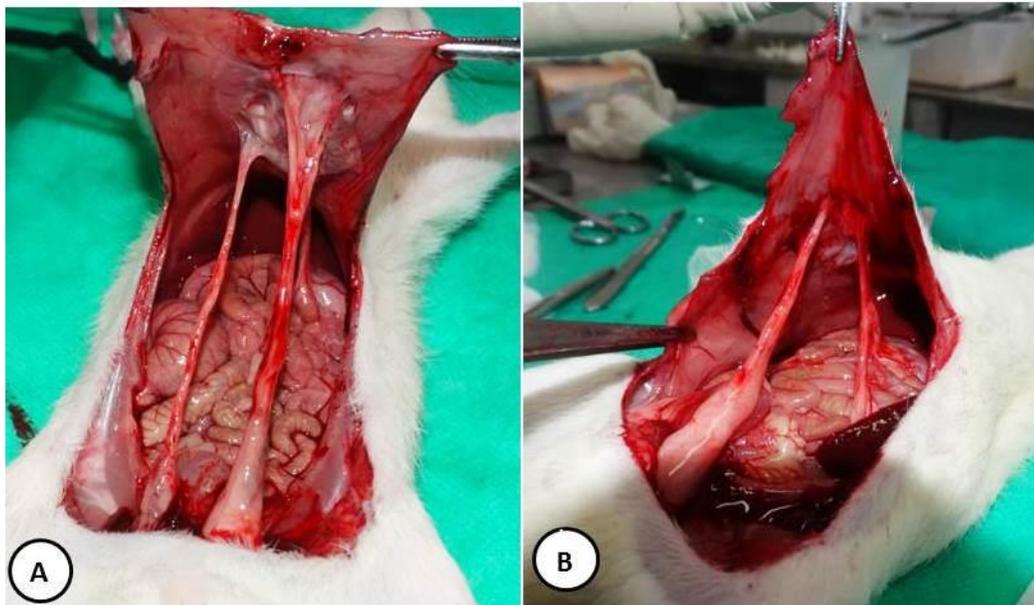
Todas as aderências foram facilmente desprendidas manualmente. As estruturas envolvidas nestas aderências foram: omento, testículo direito, testículo esquerdo e fígado, que aderiram principalmente nas linhas de sutura das próteses.

Avaliação Macroscópica – 7 dias



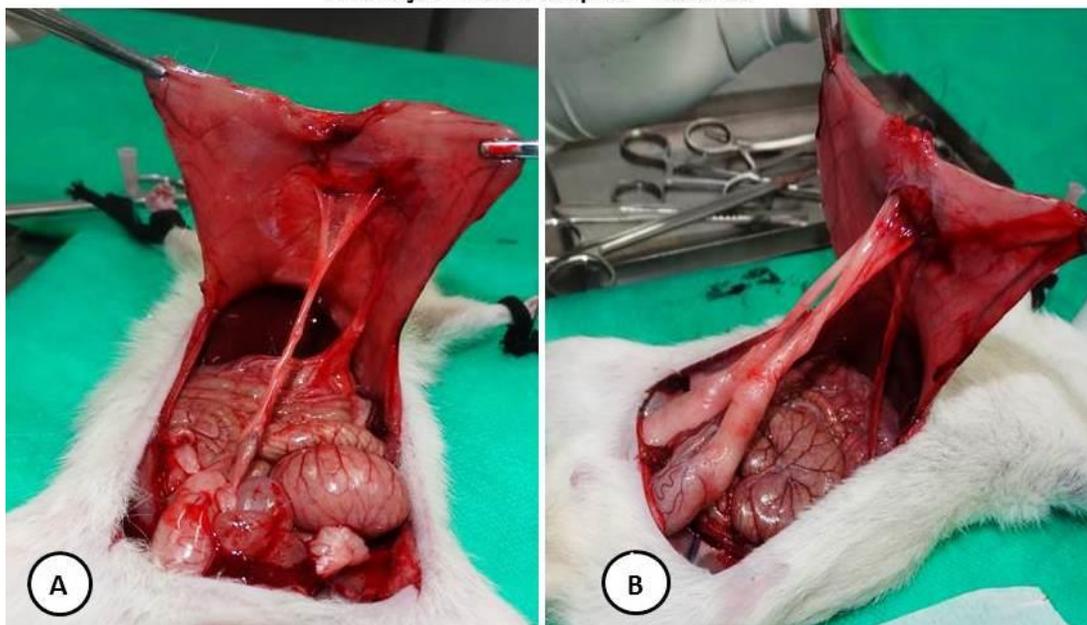
**Figura 17:** Fotomacrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>7d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>7d</sub>.

Avaliação Macroscópica – 15 dias



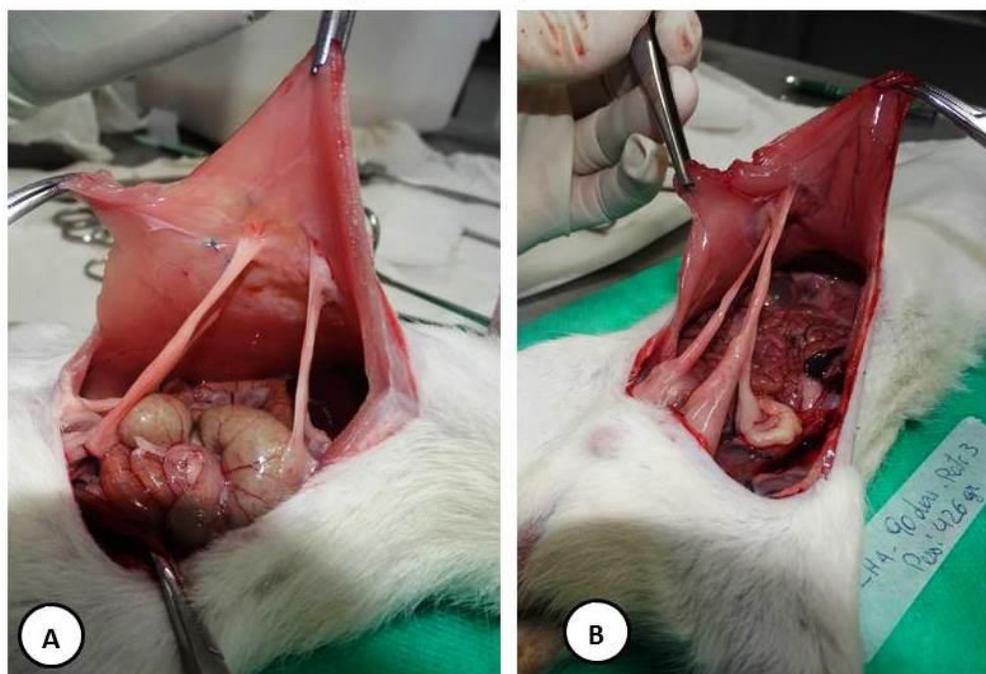
**Figura 18:** Fotomacrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>15d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>15d</sub>.

Avaliação Macroscópica – 30 dias



**Figura 19:** Fotomacrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>30d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>30d</sub>.

Avaliação Macroscópica – 90 dias



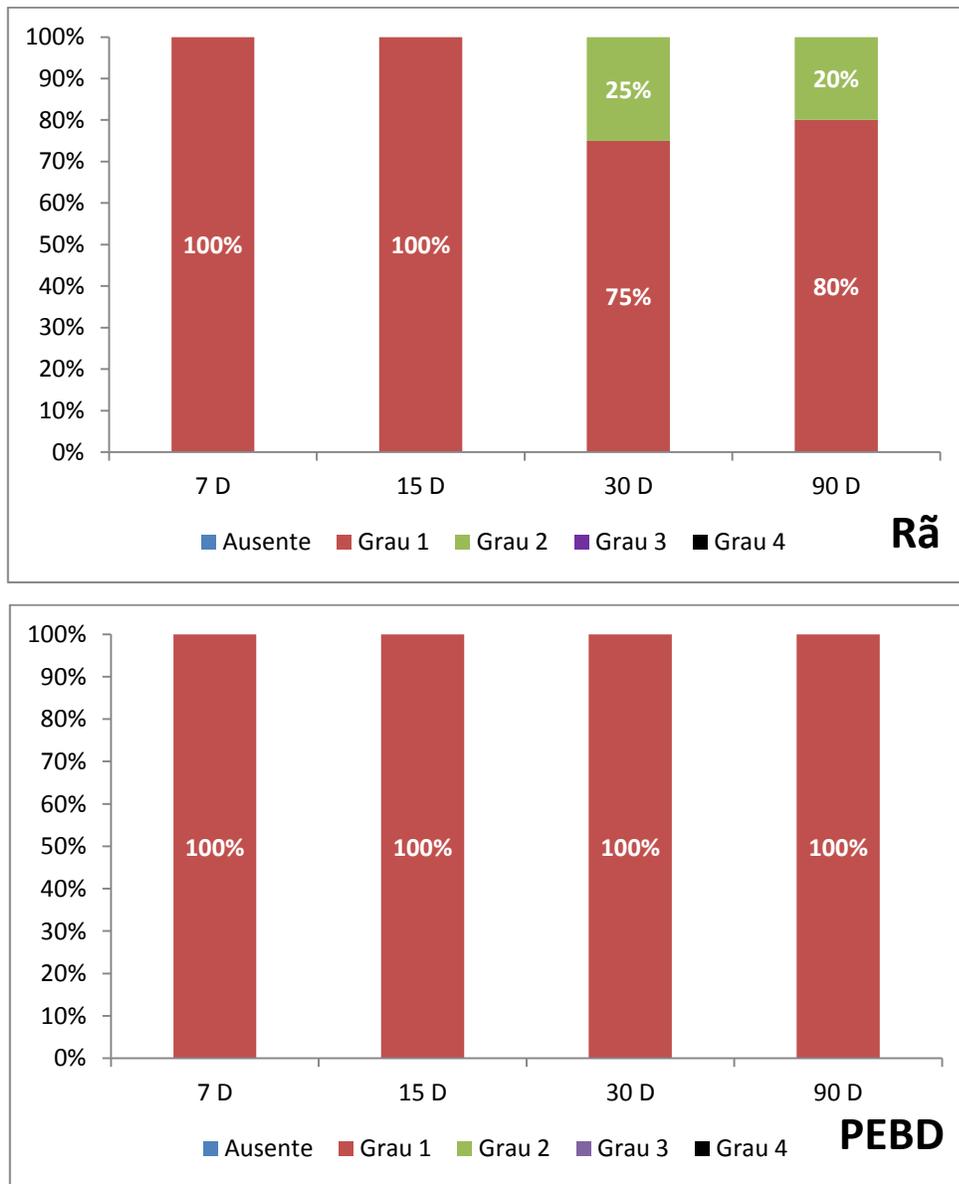
**Figura 20:** Fotomacrografia da análise macroscópica da cavidade abdominal, com aderências pós-operatórias. **A:** Animal do grupo Rã<sub>90d</sub>. **B:** Animal do grupo PEBD<sub>90d</sub>.

No Grupo Rã, 100% dos animais apresentaram aderências, sendo que 90% das aderências eram de Grau 1 e 10% de Grau 2. Um rato do Grupo Rã<sub>30d</sub> apresentou Grau 2 de aderências, com 4 aderências, sendo, uma de fígado, uma de testículo direito, uma de testículo esquerdo e uma de omento, todas foram desprendidas facilmente com manipulação. No Grupo Rã<sub>90d</sub>, um animal revelou Grau 2 de aderências, sendo quatro aderências formadas: duas de omento, uma de testículo direito e uma de testículo esquerdo; todas desprendidas facilmente com manipulação conforme mostra o quadro 6 e a figura 21.

No Grupo PEBD, 100% dos animais apresentaram aderências de grau 1 incluindo omento, testículo direito e esquerdo, em todos os períodos estudados (quadro 6, vide figuras 17, 18, 19 e 20).

**QUADRO 6:** Classificação em graus das aderências nos diferentes grupos em diferentes períodos de pós-operatório.

| Grupos   | PEBD <sub>7d</sub> | RÃ <sub>7d</sub> | PEBD <sub>15d</sub> | RÃ <sub>15d</sub> | PEBD <sub>30d</sub> | RÃ <sub>30d</sub> | PEBD <sub>90d</sub> | RÃ <sub>90d</sub> |
|----------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| Animal 1 | 1                  | 1                | 1                   | 1                 | 1                   | 2                 | 1                   | 2                 |
| Animal 2 | 1                  | 1                | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 |
| Animal 3 | 1                  | 1                | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 |
| Animal 4 | 1                  | 1                | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 | 1                   | 1                 |
| Animal 5 | 1                  | 1                | 1                   | 1                 | 1                   | -                 | 1                   | 1                 |



**Figura 21:** Gráfico demonstrando a incidência e o grau de aderências nos grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios estudados.

## **4.4 Avaliação Microscópica**

### **4.4.1 Análise qualitativa**

Grupo RÃ<sub>7d</sub>

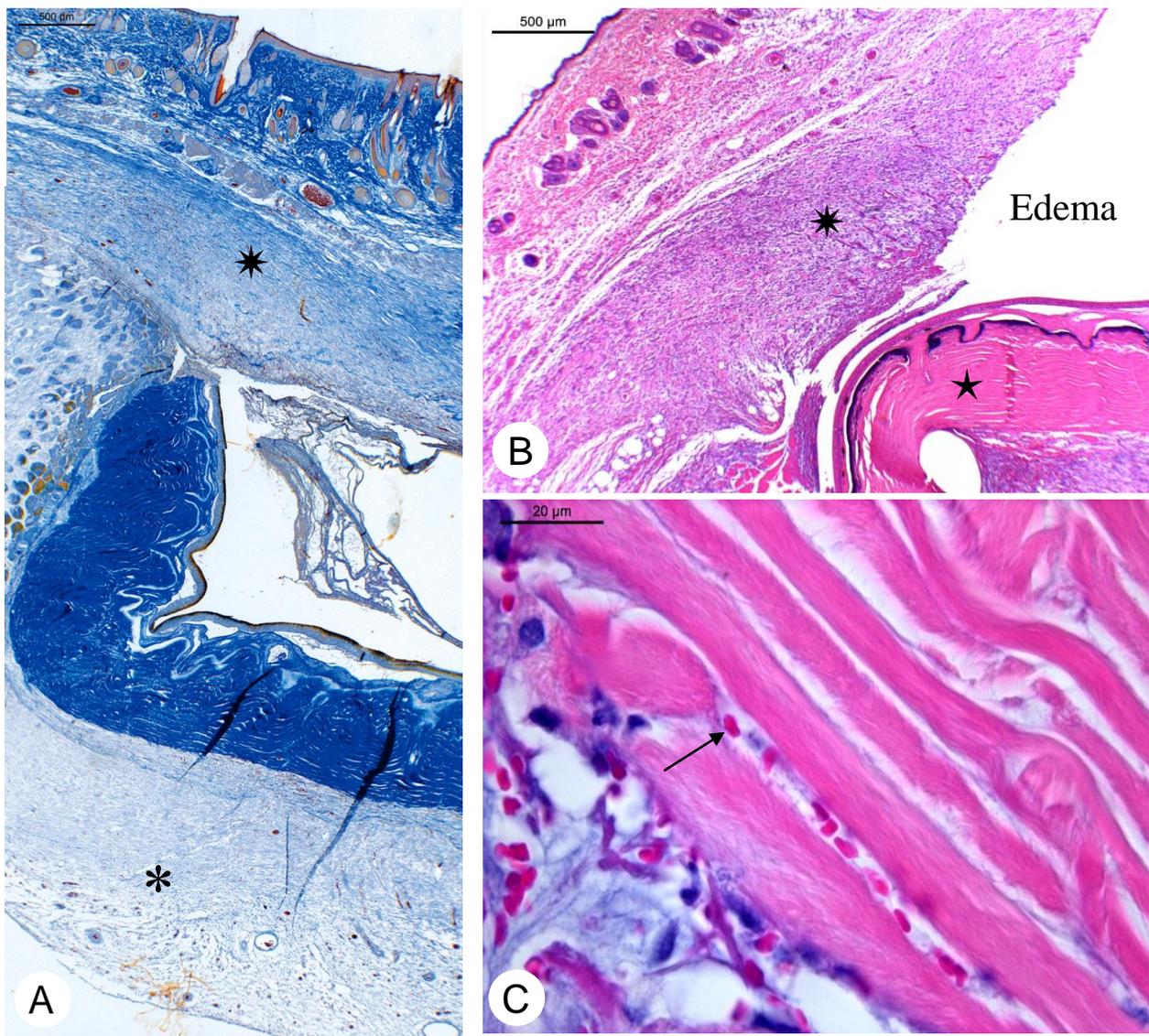
A análise histológica do tecido dos ratos que receberam a pele da Rã-touro revelou que é possível observar claramente a estrutura da pele de rã com sua epiderme e derme. Nos animais relativo ao período de 7 dias não há interação da epiderme da pele de rã-touro com os tecidos do rato (Figura 22A, B).

Ao redor do implante da pele da rã-touro nota-se tecido inflamatório (Figura 22A, B) com um predomínio de células mononucleares em todas as amostras avaliadas. Esse tecido é observado ao redor do implante, que é reconhecido através da típica organização da derme compacta da pele da rã-touro. Não há interação da epiderme da rã com o tecido do hospedeiro, existindo um grande espaço, provavelmente devido à formação de edema e congestão (Figura 22B).

No tecido conjuntivo frouxo abaixo do implante é possível observar grande quantidade de pequenos vasos sanguíneos, denotando a existência de intensa atividade angiogênica.

Vasos sanguíneos do hospedeiro (rato) podem ser observados por entre os feixes de fibras colagenosas da derme compacta (Figura 22C), que mostram manter sua integridade estrutural. A penetração de vasos sanguíneos indica que o implante não está sendo rejeitado, mas incorporado ao tecido do hospedeiro. As hemácias do rato são facilmente reconhecidas pelo fato de ser uma estrutura anucleada, enquanto que nos anfíbios, têm-se verdadeiros eritrócitos, já que são estruturas nucleadas, verdadeiras células.

Verificou-se formação de novos vasos (Angiogênese) variando de 6,8 a 12,4 vasos em 10 campos de 40x, principalmente na região em contato com a cavidade abdominal do rato. Observou-se ausência de hemorragia em todas as amostras analisadas deste grupo.

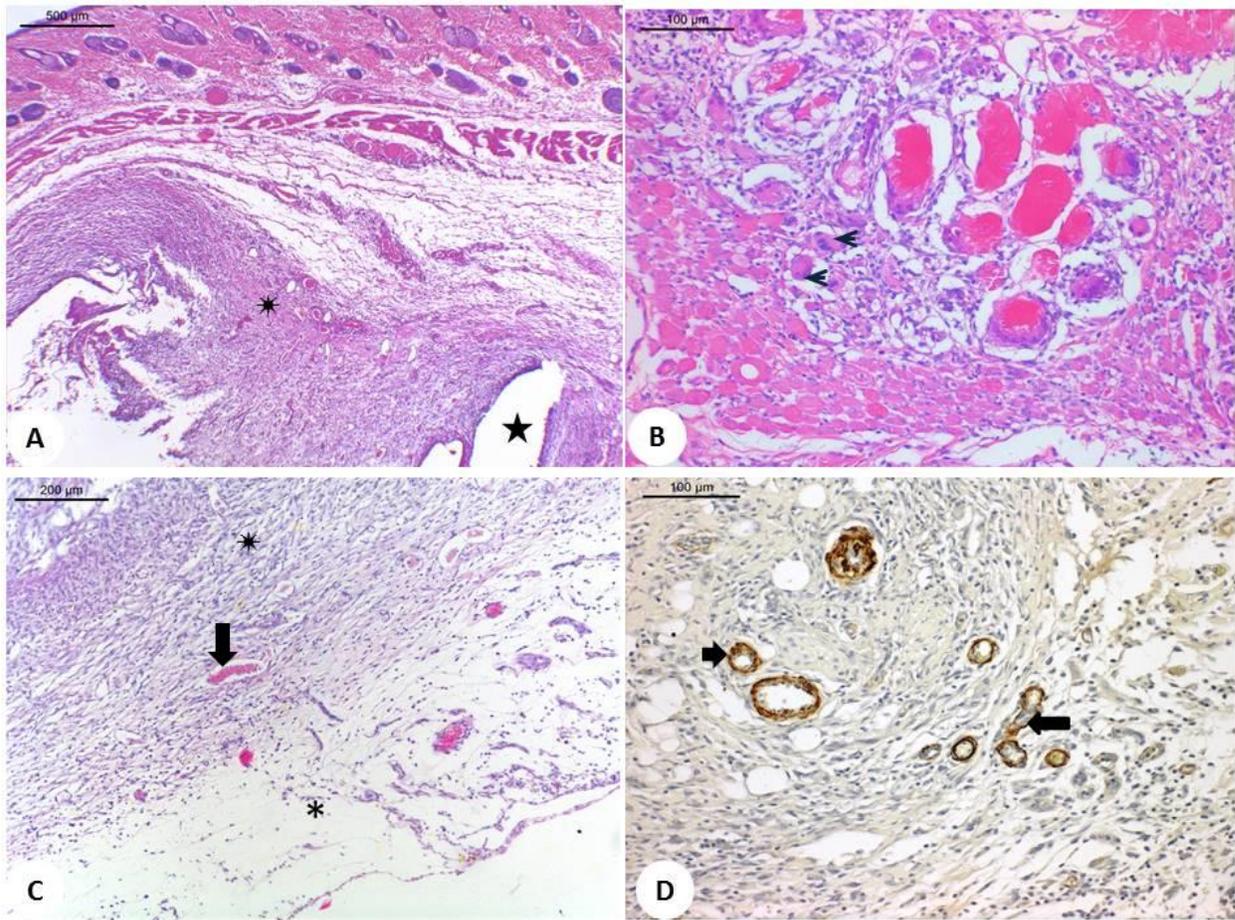


**Figura 22:** Fotomicrografias da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>7d</sub>. **A:** O implante é claramente observado através do arranjo das fibras colagenosas da derme compacta da pele da rã (★). Ao redor do implante é possível observar área de inflamação (★). Tecido de aderência (asterisco). Tricrômico de Mallory. Barra = 500 µm. **B:** Notar aumento da quantidade de células (★) no tecido conjuntivo abaixo da derme reticular da pele do rato. O edema separa a pele do rato da pele da rã-touro (★). HE. **C:** Observe hemácias (→) do hospedeiro percorrendo vasos sanguíneos localizados por entre os feixes de fibras colagenosas da derme compacta da rã. HE.

#### PEBD<sub>7d</sub>

Nesses animais não houve interação histológica entre a pele dos ratos e o PEBD (Figura 23A). Todavia, notou-se que a intensidade de inflamação em todos os cortes avaliados foi acentuada (+++), ocorrendo intensa população de células mononucleadas, tais como linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos, além de células gigantes multinucleadas, todas localizadas na derme superficial e/ou profunda, na musculatura regional e ao redor do espaço gerado pela implantação do PEBD (Figura 23B e C). Em todas as amostras foram observados edema e congestão na derme do rato e/ou na região de contato do implante com a cavidade abdominal. Assim como, foi observada a presença de aderências na região em contato com a cavidade abdominal (Figura 23C).

Nos animais desse grupo, na região da derme superficial e profunda e/ou na região em contato com a cavidade abdominal foi observado aumento de novos vasos, sugerindo o processo de angiogênese (figura 23D). Os vasos variavam de 7,2 a 10 vasos por campo. Em dois animais foi observado foco hemorrágico no local onde foi inserido o PEBD e na derme profunda.



**Figura 23:** Fotomicrografias da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>7d</sub>. **A:** Observar o espaço negativo da prótese (★). Ao redor do implante é possível observar área de inflamação (\*). HE. **B:** Notar acentuada inflamação com a presença de células gigantes (cabeça de seta). HE. **C:** Observe infiltrado inflamatório (\*), congestão (seta) e aderência (\*). HE. **D:** Imuno-histoquímica para alfa-actina mostrando a presença de novos vasos (setas).

#### Grupo RÃ<sub>15d</sub>

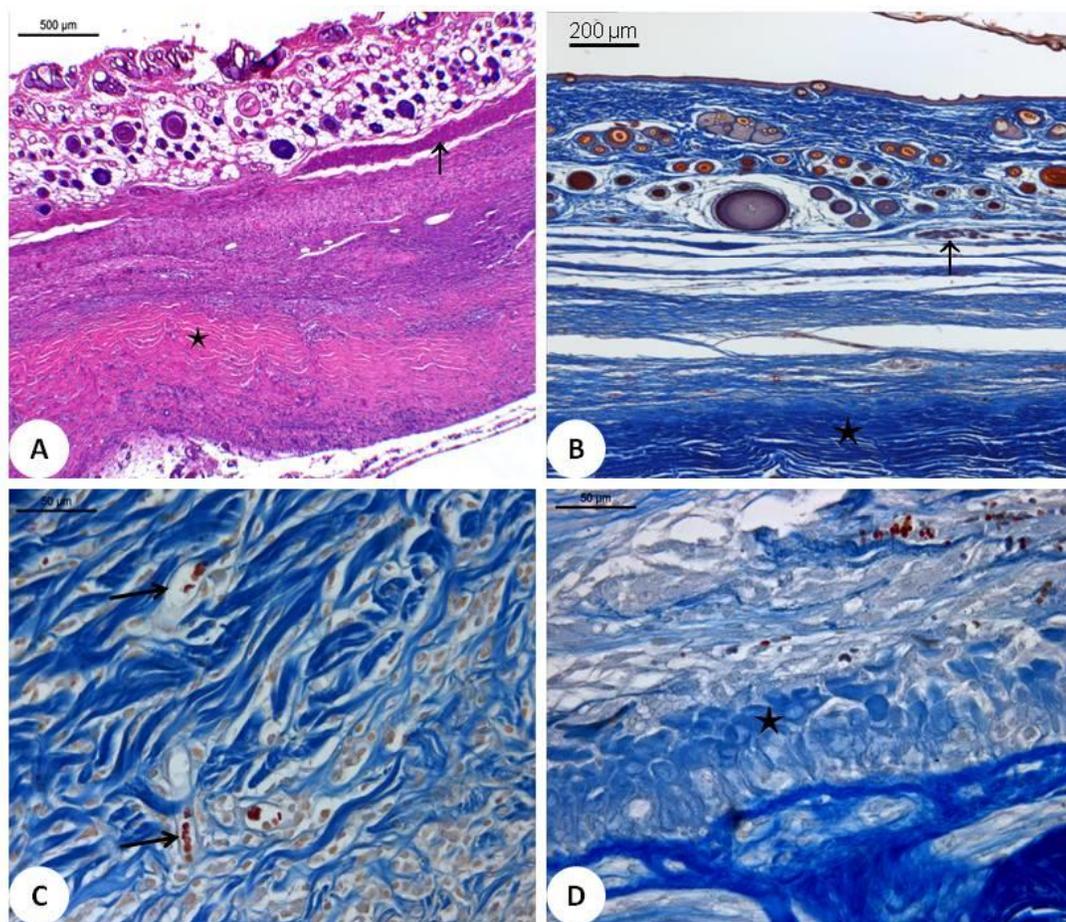
Nos animais desse grupo, não foi observado espaço entre o implante e o tecido conjuntivo da pele do hospedeiro em 80% dos animais (Figuras 24A e B).

Os vasos sanguíneos do hospedeiro já penetravam o implante (Figura 24C). A epiderme da pele da rã inicia um processo de desintegração. Entretanto, a derme permanece íntegra com arranjo padrão do colágeno da rã (Figura 24D).

Na derme superficial e/ou na profunda da pele do hospedeiro observa-se reação inflamatória, com predomínio de células mononucleares, que variou entre os animais.

Em alguns animais foi possível detectar focos de fibrose de intensidade leve a moderada. Nota-se ainda a formação de novos vasos, já que esses vasos são bem frequentes, variando de 4 a 11 vasos em 10 campos, principalmente na região de tecido conjuntivo voltada para a cavidade abdominal.

Focos de hemorragia foram observados em dois animais na interface do implante, com o tecido conjuntivo da derme reticular do hospedeiro e/ou com tecido conjuntivo voltado para a cavidade abdominal.



**Figura 24:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>15d</sub>. **A:** A pele da rã ainda pode ser reconhecida pelo arranjo das fibras colagenosas (★). É possível observar que o músculo cutâneo começa a restaurar (→). Coloração: HE. **B:** Observe o arranjo das fibras colagenosas (★) da pele da Rã. Notar o músculo cutâneo, que começa a restaurar (→). Tricrômico de Mallory. **C:** Observar os vasos sanguíneos do hospedeiro (com hemácias anucleadas), infiltrados na derme compacta da Rã (→). Tricrômico de Mallory. Barra = 50 μm. **D:** Nesse período, nota-se que as células epidérmicas (★) começam a perder sua estruturação própria. Tricrômico de Mallory. Barra = 50 μm.

## PEBD<sub>15d</sub>

Neste grupo verificou-se predomínio de formação de um espaço (lacuna) entre a pele do rato e o PEBD nas amostras estudadas. (Figura 25A).

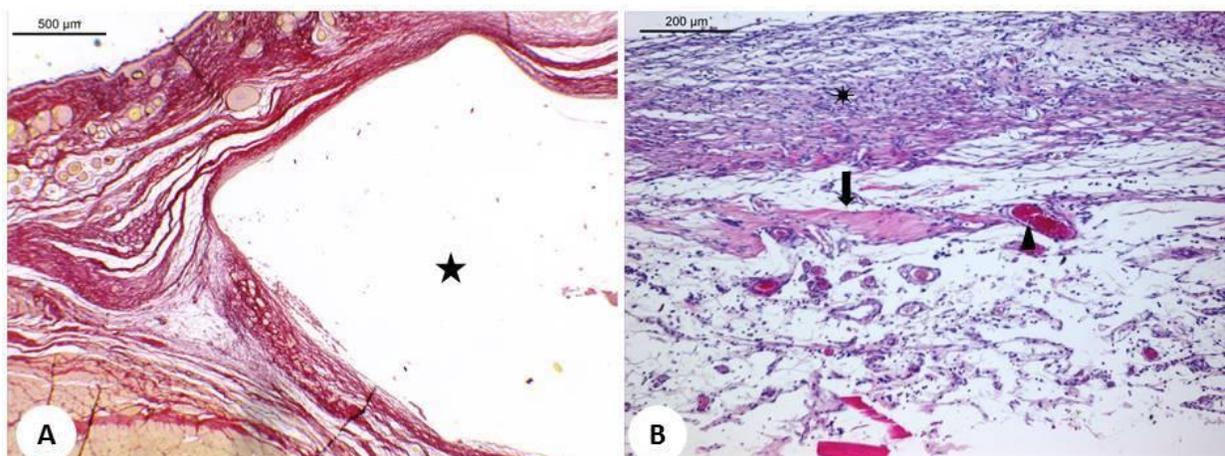
Ao redor do implante do plástico bolha, na derme e/ou na região em contato com a cavidade abdominal, nota-se intensa reação inflamatória com intensidade variando para cada animal, ou seja, de leve (+) em dois animais, moderada (++) em dois animais e acentuada (+++) em um animal (Figura 25B).

Verificou-se congestão em três animais na região em contato com a cavidade abdominal do rato.

Observou-se a presença de foco de fibrose em região adjacente à implantação do plástico em um animal (Figura 25B).

No tecido conjuntivo ao redor do implante observou-se maior frequência de vasos sanguíneos, indicativo de angiogênese. A quantidade de vasos sanguíneos variou 0,9 a 7,1 vasos em 10 campos de 40x, na derme profunda e/ou na região em contato com a cavidade abdominal.

Em todas as amostras teciduais dos animais desse grupo verificou-se ausência de hemorragia.

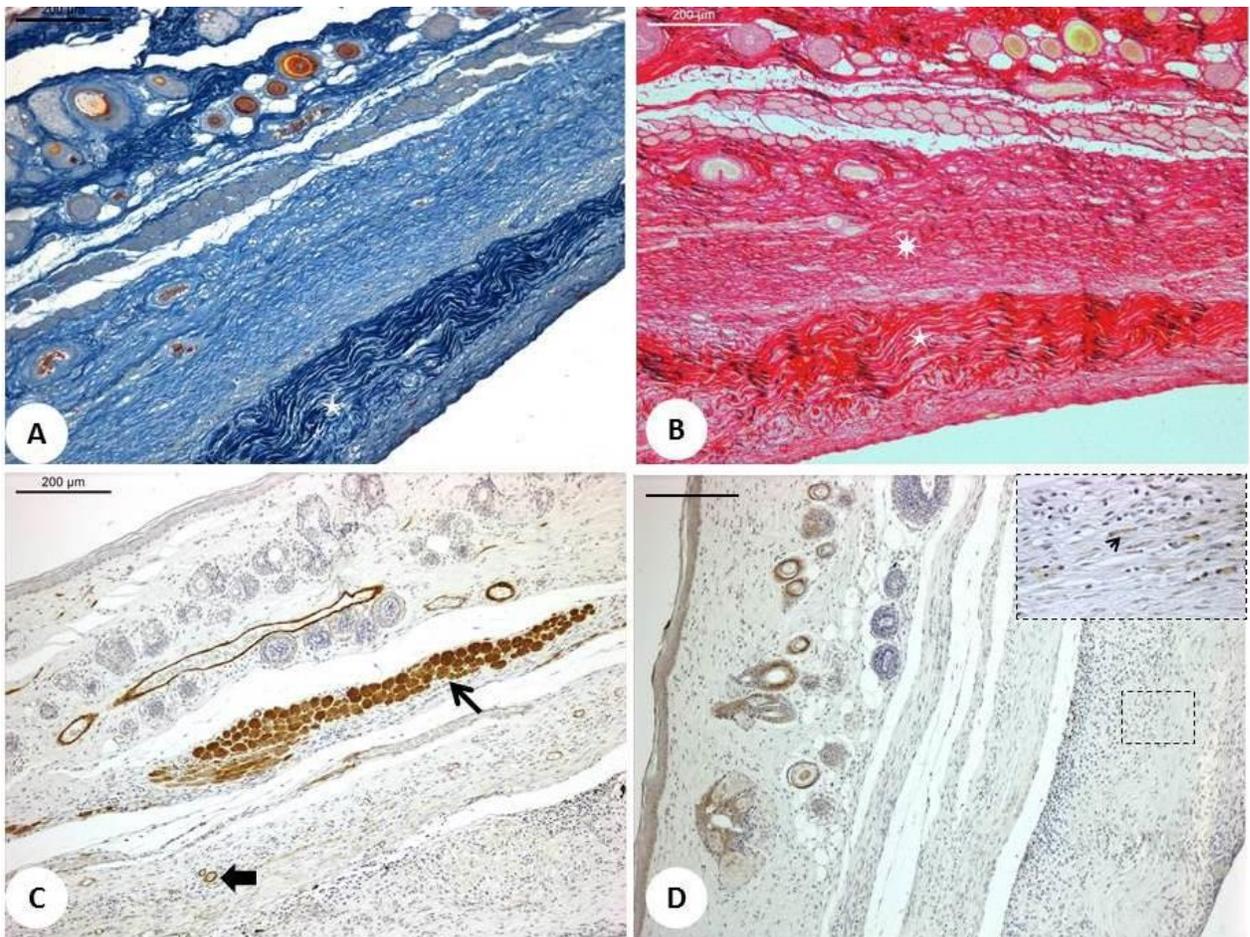


**Figura 25:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>15d</sub>. **A:** Notar lacuna ocupada pelo PEBD (★). Picrosirius red **B:** Reação inflamatória (★), área de congestão (cabeça de seta) e foco de fibrose (seta). HE.

### RÃ30<sub>d</sub>

Neste grupo de animais, verificou-se no intervalo de 30 dias, uma interação histológica entre as peles sobrepostas em todos os animais estudados (figuras 26A). A derme da rã perde seu arranjo característico, representado pelas colunas dérmicas e passou a apresentar um arranjo linear, levando a uma reorganização destas espessas fibras colagenosas observadas no Picrosirius red com polarização (Figura 26B). A intensidade de inflamação observada nas amostras avaliadas foi de leve (+) a moderada (++) e composta por macrófagos, fibroblastos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos localizados, ora na derme profunda da pele do rato, ora entremeada na derme da rã. Edema foi verificado em dois animais na derme do rato e na região em contato com a cavidade abdominal do mesmo, respectivamente. Havia congestão em dois animais, na região em contato com a cavidade abdominal de ambos os animais. Verificou-se formação de novos vasos (Angiogênese) variando de 1,2 a 13 vasos em 10 campos de 40x, localizados na região em contato com a cavidade abdominal do rato. Presença de hemorragia foi verificada em apenas um animal na região em contato com a cavidade abdominal.

Na imuno-histoquímica para  $\alpha$ - actina observa-se o músculo cutâneo se reestruturando acima da pele da rã, indicando uma integração do implante com o hospedeiro (Figura 26C). Na imunomarcção para citoqueratina foi observado que as células (citoqueratina +) estão dispostas esparsas no tecido conjuntivo propriamente dito ao redor do implante e não no estrato basal da epiderme da rã (Figura 26D).

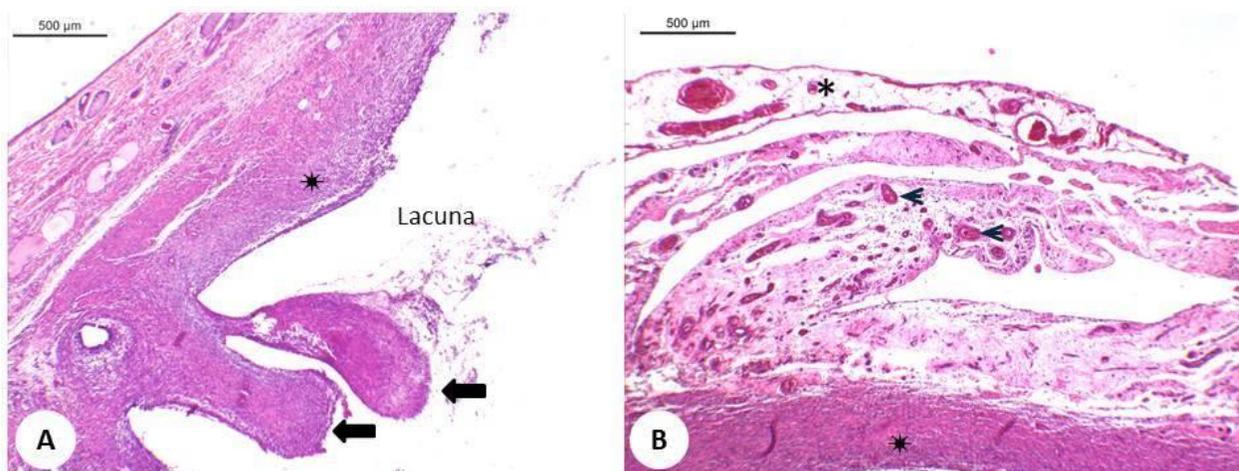


**Figura 26:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>30d</sub>. **A:** A pele da rã aparece integrada a derme do hospedeiro (★).Tricrômico de Mallory. **B:** Observar o arranjo das fibras colagenosas espessas (★) da pele da rã em comparação as fibras do hospedeiro (\*). Picrosirius red.**C:** Observar os vasos sanguíneos do hospedeiro próximos a área do implante (seta larga), neovascularização. Notar o músculo cutâneo restaurado (seta fina) α-actina. **D:** Nesse período, nota-se a presença de esparsos queratinócitos (detalhe) no implante. Citoqueratina. Barra = 100 µm.

#### PEBD<sub>30d</sub>

No grupo dos animais tratados com o PEBD, verificou-se no intervalo de 30 dias predomínio de formação de um espaço (lacuna) entre a pele do rato e o PEBD em todos os animais estudados. Observaram-se projeções de tecido inflamatório do hospedeiro nos espaços que estariam entre as bolhas do PEBD (Figura 27A). A intensidade de inflamação observada foi leve (+) em quatro animais, e moderada (++) em um animal, e composta por macrófagos,

fibroblastos, células gigantes multinucleadas, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos, localizados ora em derme profunda e/ou em musculatura regional, ora ao redor da lacuna gerada pela inserção do PEBD. Havia focos de fibrose em cinquenta por cento dos animais estudados de leve a moderado. Havia focos de edema em todos os animais estudados ora em derme do rato e/ou na região em contato com a cavidade abdominal do rato. Presença de congestão foi verificada em dois animais, localizada ao redor da lacuna de inserção do PEBD e na parte em contato com a cavidade abdominal do Rato. Verificou-se formação de novos vasos (Angiogênese) variando de 1,2 a 11,4 vasos em 10 campos de 40x, na região em contato com a cavidade abdominal do Rato e/ou na região da lacuna gerada pela inserção do PEBD ou na derme profunda da pele do rato (Figura 27B). Havia hemorragia em um animal, na região em contato com a cavidade abdominal do rato.

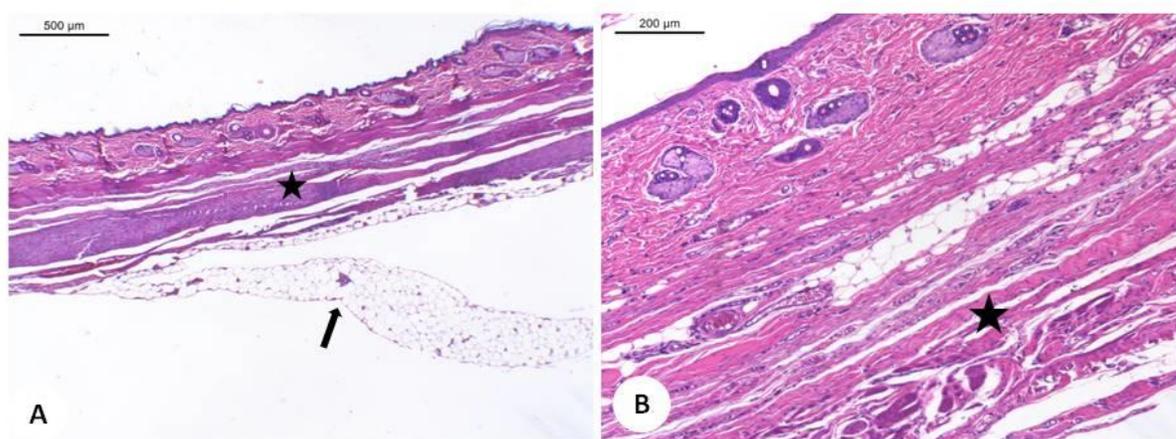


**Figura 27:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>30d</sub>. **A:** Notar lacuna ocupada pelo plástico bolha com projeções de tecido inflamatório do hospedeiro entre as bolhas do PEBD (setas). Reação inflamatória (\*). HE. **B:** Nota-se acentuada formação de novos vasos- Angiogênese (cabeça de seta) entremeados a edema na região de contato com a cavidade abdominal do rato, com formação de aderências (\*) e células inflamatórias (\*). HE.

#### RÃ<sub>90d</sub>

No grupo dos animais tratados com a pele de rã, verificou-se no intervalo de 90 dias interação histológica entre as peles sobrepostas em 4 animais estudados (Figura 28A e B) e presença de formação de lacuna em um animal. A intensidade de inflamação observada nas amostras avaliadas foi leve (+) em 4 animais e acentuada (+++) em um animal, e composta por

macrófagos, fibroblastos, linfócitos, plasmócitos, e com focos de fibrose em três animais, localizados ora na derme profunda da pele do rato, musculatura regional e/ou região em contato com a cavidade abdominal do Rato. Presença de edema foi verificada em dois animais, ora em derme profunda do rato ora perianexial, respectivamente. Ausência de congestão nas amostras dos animais analisados. Verificou-se formação de novos vasos (Angiogênese) variando de 2 a 17 vasos em 10 campos de 40x, localizados na região em contato com a cavidade abdominal do rato e/ou derme profunda da pele do mesmo. Presença de hemorragia foi observada em um animal, na região em contato com a cavidade abdominal do rato. Foi observada a formação de aderências peritoneais (Figura 28A).



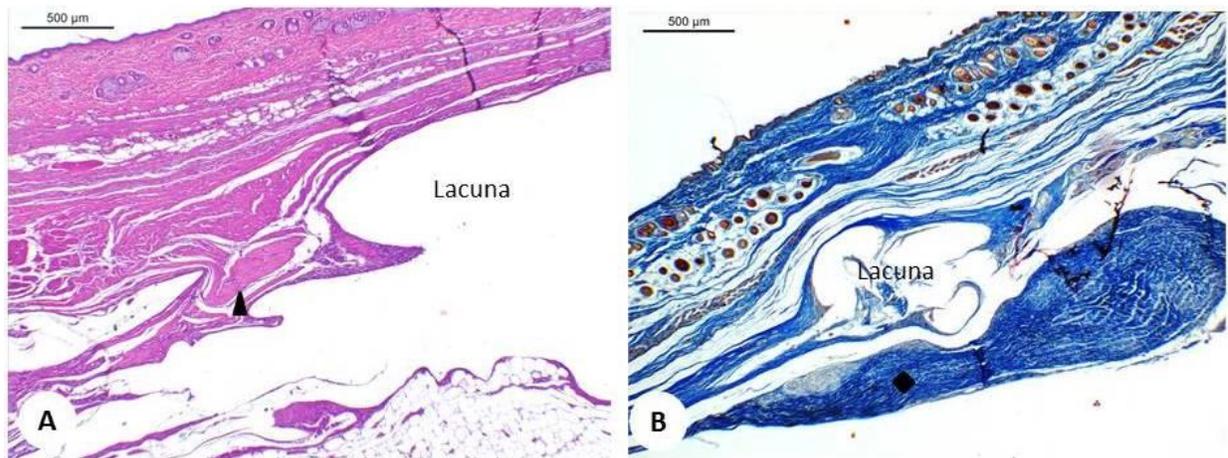
**Figura 28:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo RÃ<sub>90d</sub>. **A:** A pele da rã aparece integrada a derme do hospedeiro (★). Notar a presença de aderência peritoneal (seta). HE. **B:** Observar parede abdominal com aspecto uniforme (★). HE.

#### PEBD<sub>90d</sub>

No grupo dos animais tratados com o PEBD, verificou-se no intervalo de 90 dias, desde discreta formação de lacuna entre a pele do rato e o PEBD em quatro animais, e ausência de formação de lacuna entre a pele do rato e o PEBD em um animal. A intensidade de inflamação observada foi leve (+) em um animal e acentuada (++) em 4 animais, e composta por fibrócitos, fibroblastos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, mastócitos e neutrófilos, localizados ora em derme superficial e/ou profunda e em musculatura regional. Presença de focos de fibrose nas amostras de todos os animais analisados (Figura 29A). Presença

de edema perianexial em apenas um animal. Havia congestão em apenas um animal, localizado na derme profunda da pele do rato.

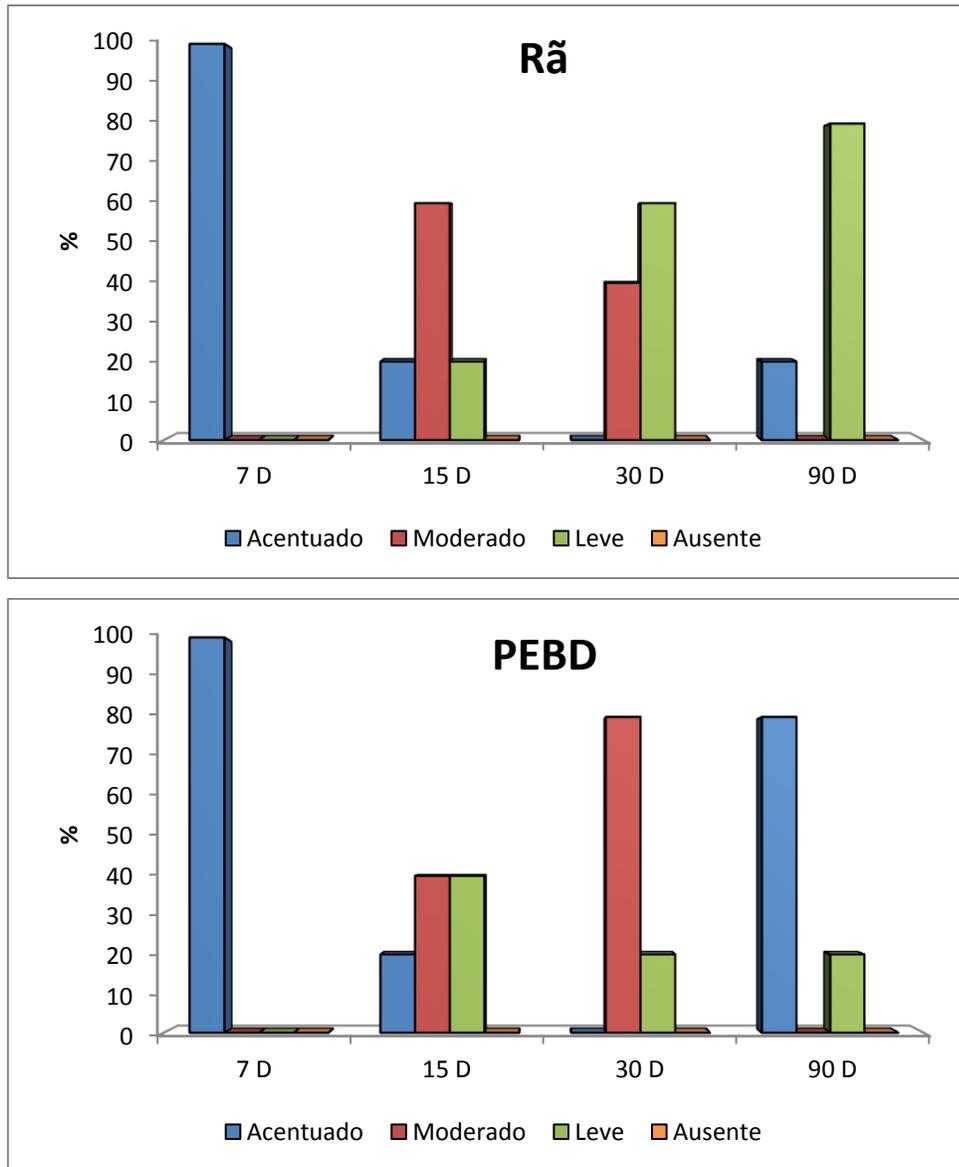
Verificou-se formação de novos vasos (Angiogênese) variando de 4 a 19 vasos em 10 campos de 40x, localizada na derme profunda da Pele do rato e/ou na região da lacuna gerada pela inserção do PEBD. Havia hemorragia em três animais, localizada na derme superficial ou profunda da pele do rato, entremeado a focos de fibrose e de tecido de granulação na região em contato com a cavidade abdominal do rato (Figura 29B). Em um animal, pôde-se observar em derme profunda área delimitada por epitélio estratificado queratinizado rompido, circundado por acentuado infiltrado inflamatório, havia extensa área de ulceração com formação de crostas serocelulares associada a acentuado infiltrado inflamatório composto por neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos se estendendo da derme superficial a profunda da pele do rato.



**Figura 29:** Fotomicrografia da parede abdominal dos animais do grupo PEBD<sub>90d</sub>. **A:** Notar focos de fibrose (cabeça de seta) ao redor da lacuna. HE. **B:** Nota-se tecido de granulação na região em contato com a cavidade abdominal do rato (losango). Tricrômico de Mallory.

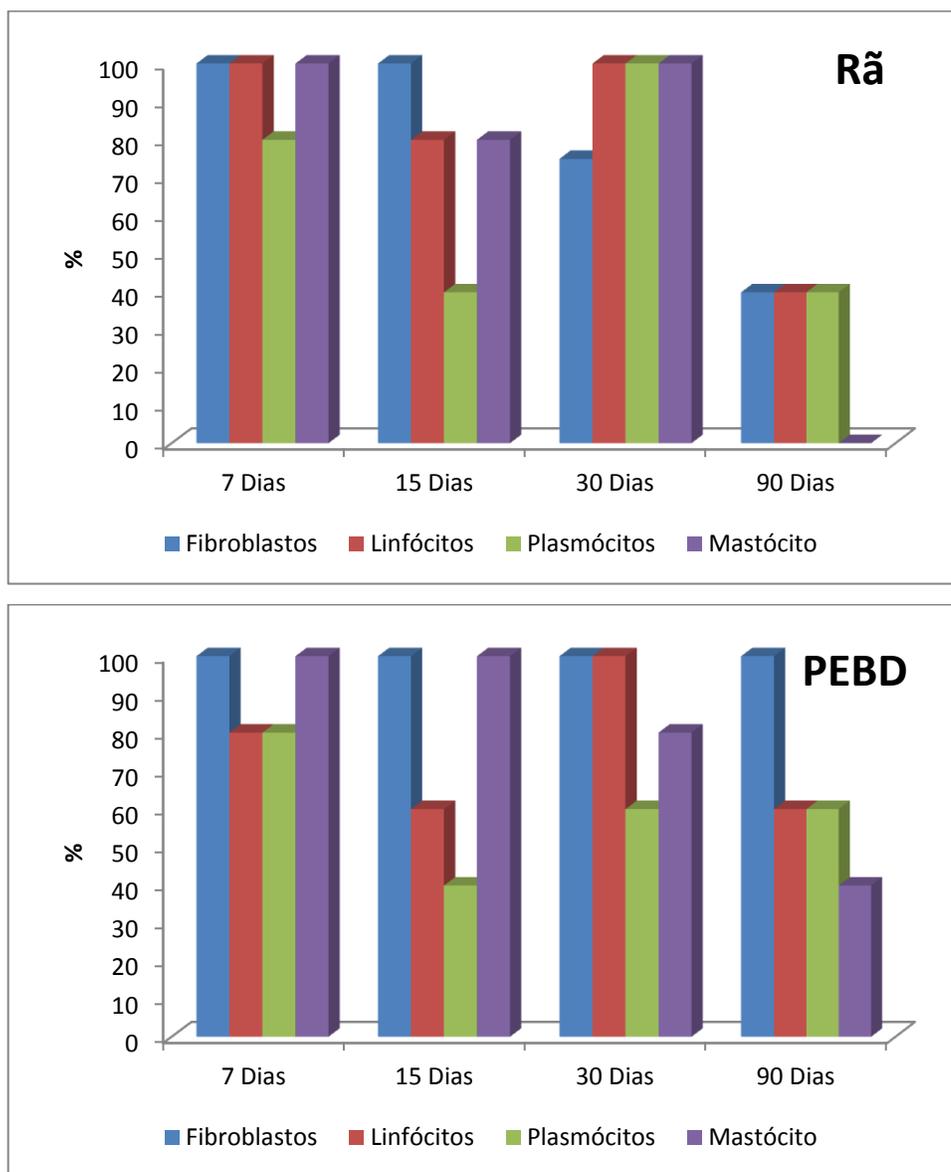
#### **4.4.2 Análise semi-quantitativa**

Considerando os achados histopatológicos semi-quantitativos em nosso experimento observamos que, aos sete dias de pós-operatório, tanto o grupo Rã quanto o grupo PEBD apresentaram resposta inflamatória baseada em escores com 100% dos animais em grau 3, considerada acentuada. Esta inflamação aos quinze dias de pós-operatório reduziu em ambos os grupos que passaram a apresentar apenas 20% dos animais em escore acentuado. No grupo Rã<sub>15d</sub> 60% dos animais apresentaram grau moderado contra 40% do grupo PEBD e 20% grau leve contra 40% do grupo PEBD. Aos 30 dias de pós-operatório observou-se que o processo inflamatório concentrou-se apenas nos escores moderado e leve, sendo no grupo Rã 40% moderado e 60% leve e no grupo PEBD 80% moderado e 20% leve. Aos noventa dias de pós-operatório os grupos apresentaram escores de inflamação opostos sendo no grupo Rã 80% dos animais com grau leve e no grupo PEBD 80% dos animais com grau acentuado (Figura 30).

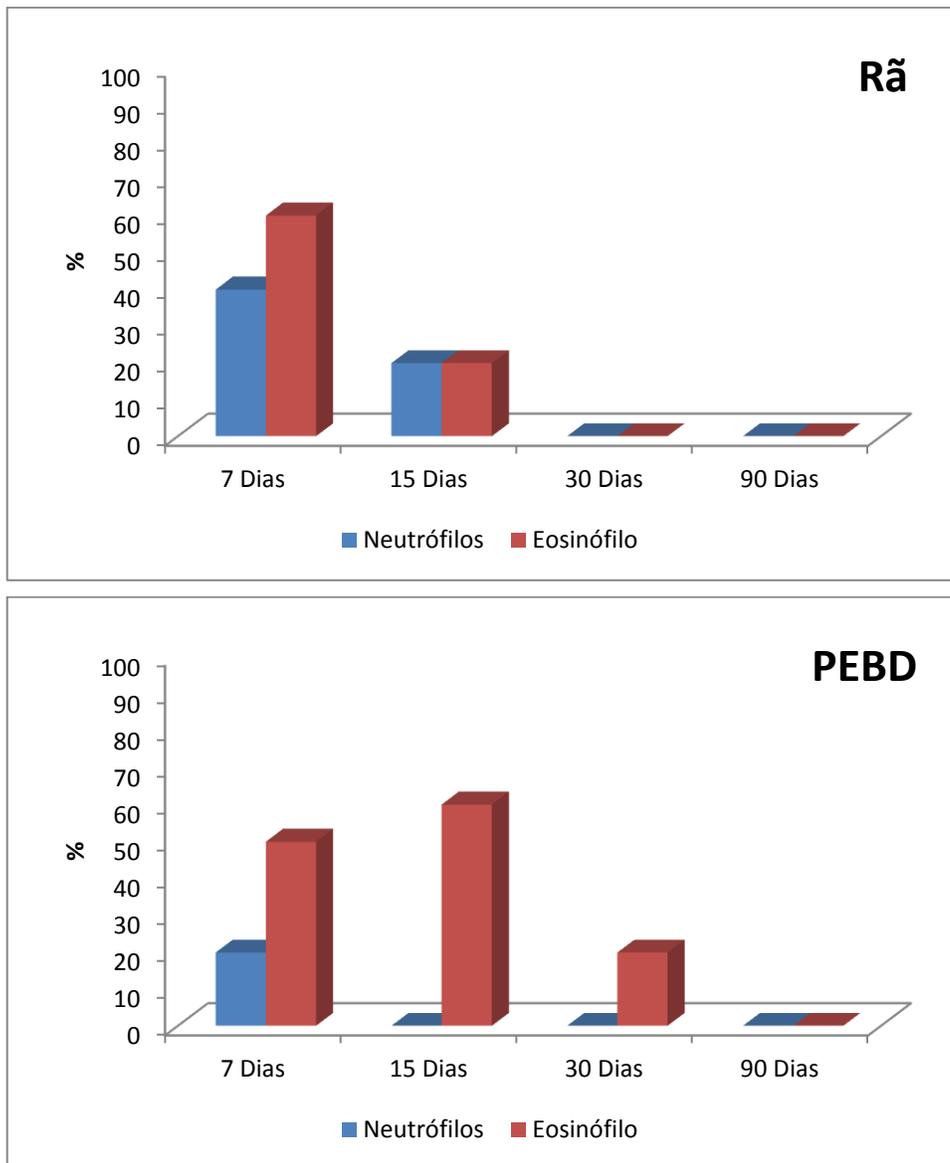


**Figura 30:** Gráficos demonstrando a intensidade do processo inflamatório nos animais dos Grupos Rã e PEBD nos diferentes períodos pós-operatórios.

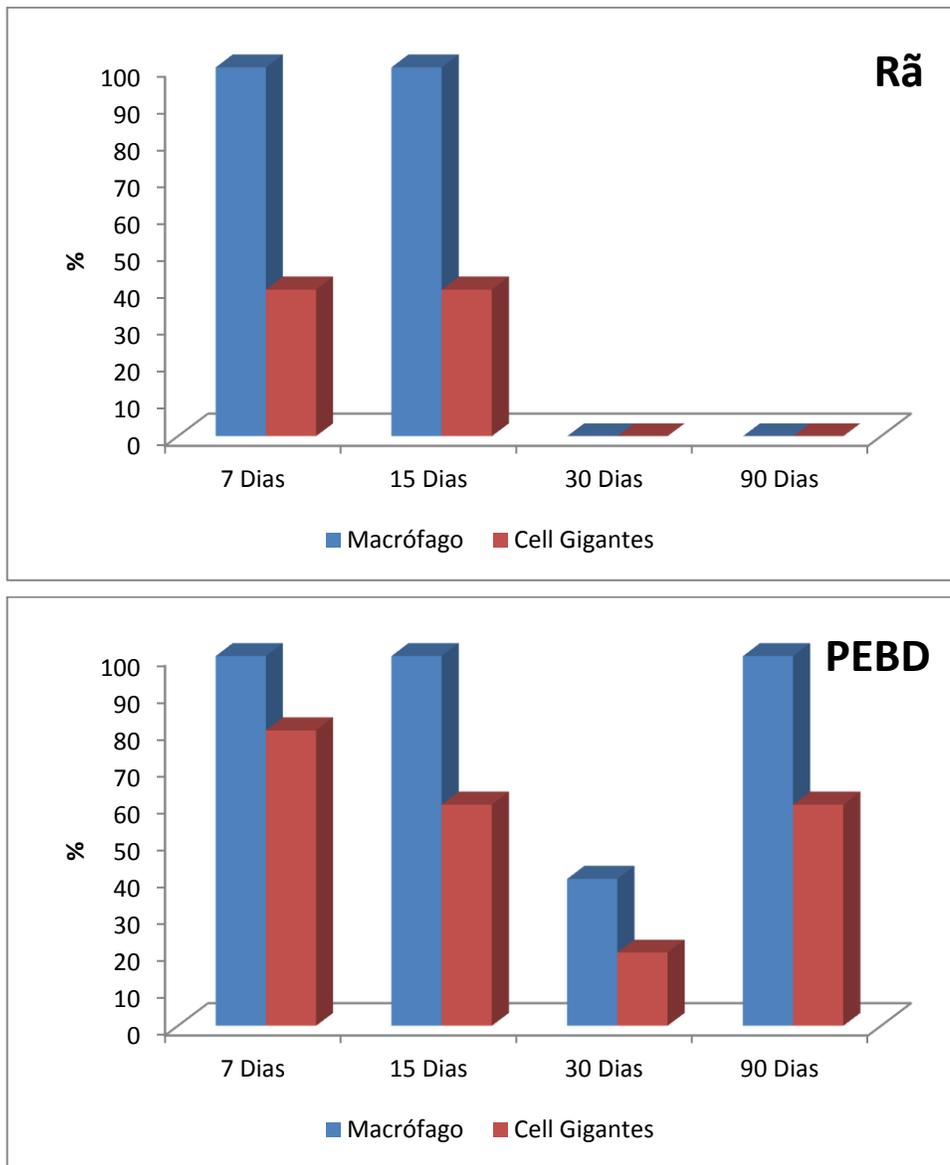
Com relação aos tipos celulares encontrados observou-se a presença de mononucleares, polimorfonucleares, fibroblastos e células gigantes nos diferentes períodos pós-operatórios estudados conforme apresentado nas figuras 31, 32 e 33.



**Figura 31:** Gráficos demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, fibroblastos e mononucleares, nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

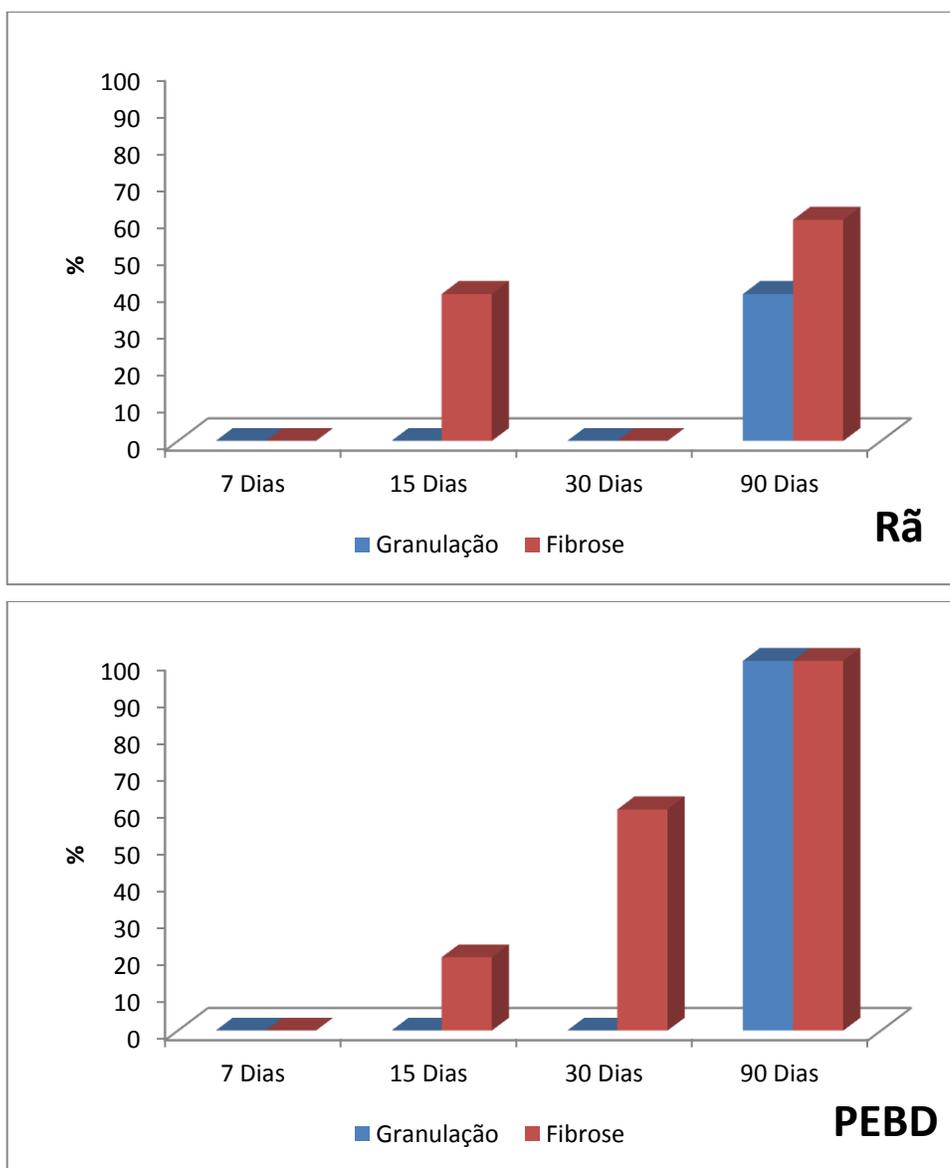


**Figura 32:** Gráficos demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, polimorfonucleares, neutrófilos e eosinófilos nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.



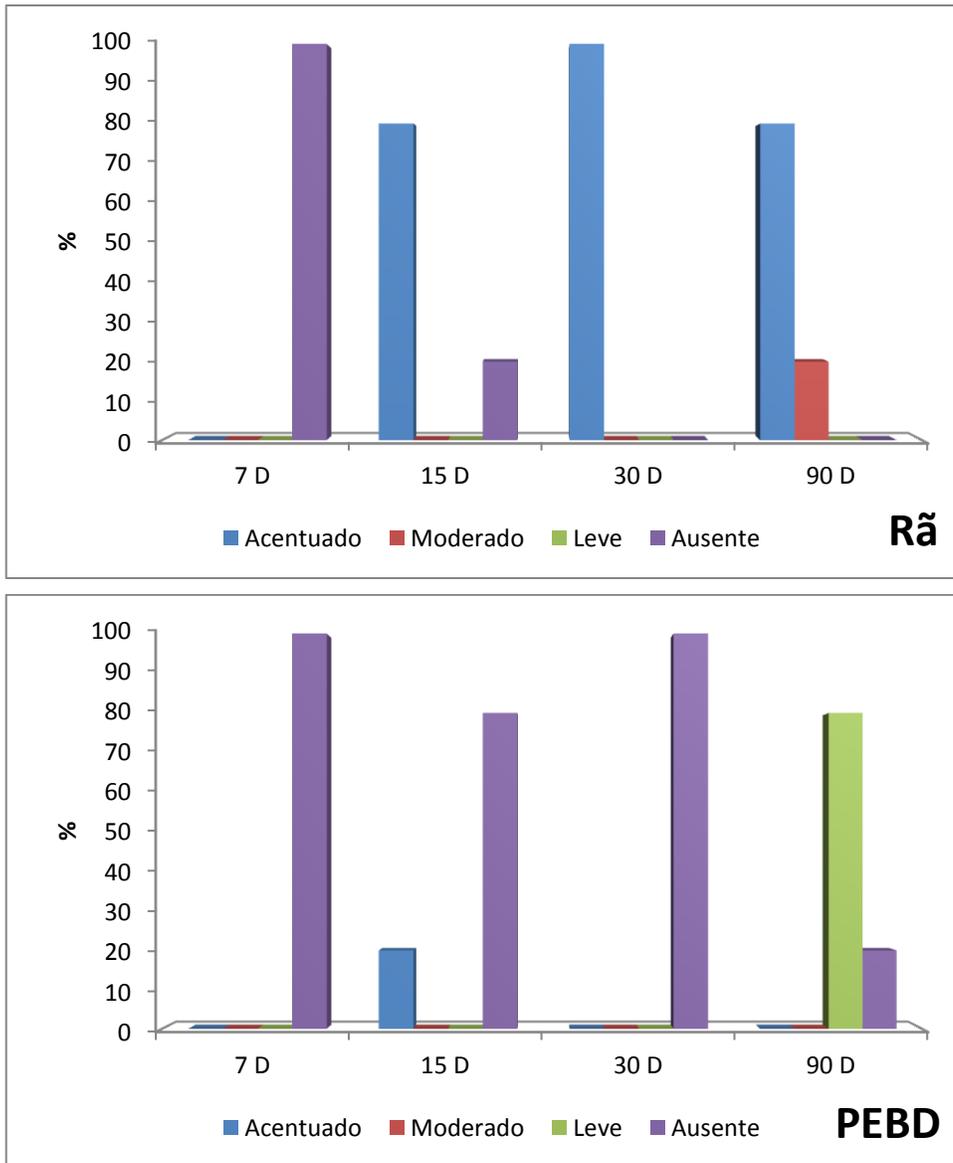
**Figura 33:** Gráficos demonstrando a porcentagem de aparecimento dos diferentes tipos celulares, macrófagos e células gigantes, nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

A presença de tecido e granulação foi observada nos animais que receberam implante de pele de Rã aos 90 dias de pós-operatório em 40% dos animais e a fibrose apareceu aos 15 dias de pós-operatório em 40% dos animais e aos 90 dias de pós-operatório em 60% dos animais. No grupo que recebeu a prótese de PEBD o tecido de granulação foi observado aos 90 dias de pós-operatório em 100% dos animais e a fibrose ocorreu aos 15, 30 e 90 dias de pós-operatório com taxas de 20%, 60% e 100% respectivamente (Figura 34).



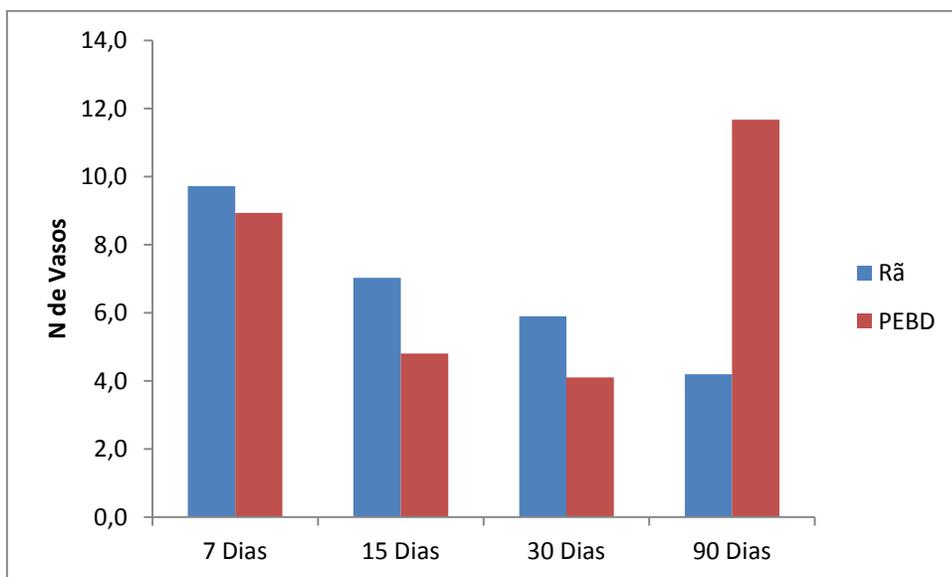
**Figura 34:** Gráficos demonstrando a porcentagem de aparecimento de tecido de granulação e fibrose nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

A interação entre a prótese e o hospedeiro foi avaliada de acordo com a presença de lacuna entre a prótese e a derme do rato. Com sete dias de pós-operatório, os dois grupos estudados apresentaram ausência de interação em 100% dos animais. Com 15 dias de pós-operatório no grupo pele de Rã 80% dos animais apresentaram ausência de lacuna entre a prótese e a pele do hospedeiro e 20% apresentou lacuna entre a prótese e a pele do hospedeiro. No grupo PEBD deste período, 20% dos animais apresentaram ausência de lacuna entre a prótese e a pele do hospedeiro e 80% apresentou lacuna entre a pele do rato e a prótese. Com 30 dias de pós-operatório no grupo Rã 100% dos animais apresentaram total interação entre a prótese e a derme do rato e o grupo PEBD apresentou 100% dos animais com ausência de interação da prótese com a derme do rato. Com 90 dias de pós-operatório o grupo Rã apresentou 80% dos animais com interação total entre a prótese e a derme do rato e 20% dos animais com moderada interação entre a prótese e a derme do rato. O grupo PEBD apresentou 80% dos animais com interação leve entre a prótese e a derme do hospedeiro e 20% dos animais com ausência de interação entre a prótese e a derme do rato, conforme mostra na figura 35.



**Figura 35:** Gráficos demonstrando a porcentagem de interação entre as próteses e a pele do hospedeiro nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

A neovascularização esteve presente ao redor do implante em todos os períodos pós-operatórios estudados. Apresentou um comportamento decrescente no Grupo Rã até os 90 dias de pós-operatório e no Grupo PEBD o número de vasos sanguíneos reduziu até o trigésimo dia de pós-operatório e aumentou aos 90 dias de pós-operatório (Figura 36).



**Figura 36:** Gráfico demonstrando a média do número de novos vasos (Angiogênese) em 10 campos de 40x nas amostras estudadas nos 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório.

## 5 DISCUSSÃO

A tela ideal para herniorrafia deve causar o mínimo de reação tecidual local e sistêmica e manter o máximo possível à integridade da parede abdominal permitindo perfeita movimentação do indivíduo e total proteção às vísceras abdominais (ARAMAYO et al., 2013). Em nosso estudo as duas próteses se mostraram eficazes em proteger às vísceras abdominais visto que nenhum animal apresentou recidiva da herniação ou evisceração em nenhum período estudado. A movimentação abdominal se mostrou perfeita em todos os períodos estudados, nenhum animal apresentou dificuldade em movimentar-se, assim como, não apresentaram perda de peso nos períodos de 15, 30 e 90 dias de pós-operatório. Com sete dias de pós-operatório, a perda ponderal não significativa, provavelmente ocorreu pelo trauma cirúrgico recente e não por reação às próteses.

O padrão de sutura contínua simples com fio de náilon 4.0 utilizado para fixação da prótese na parede abdominal mostrou-se satisfatório visto que as próteses ficaram bem fixadas, não se deslocaram e nenhum animal apresentou peritonite, eventração ou evisceração, diferentemente de Gianlupi e Trindade (2004) que utilizando tela de polipropileno para correção de hérnias abdominais em ratos suturadas com pontos em “U” interrompidos obtiveram uma taxa de 12,5% de recidivas das hérnias.

A prótese biológica, pele de rã, talvez devido a densa e organizada camada colagenosa associada à epiderme queratinizada, demorou em torno de 90 dias para sofrer integração total ao tecido do hospedeiro, fato este observado através da termografia (pela redução do tamanho da prótese) e confirmado através das análises histológicas. Este tempo demonstrou ser suficiente para o organismo formar novo tecido de arquitetura similar a parede abdominal do rato hígado, sustentando adequadamente as vísceras abdominais e permitindo perfeita movimentação do abdome. Corroborando com Montgomery (2013) que afirma ser a absorção precoce das próteses biológicas um ponto falho em sua indicação de uso.

A deiscência de sutura observada no Grupo Rã foi maior que no grupo PEBD aos 7 (40%), 15 (60%) e 30 dias de pós-operatório, ainda que a análise estatística tenha mostrado que não houve diferença significativa entre os dois grupos em todos os períodos pós-operatórios estudados ( $p_{k-w} = 0,26$ ;  $p < 0,05$ ). Este fato pode ser atribuído, a dois fatores, um deles à presença de infecção local que, embora não tenha causado supuração ou abscessos, pode ter exacerbado o

processo inflamatório desencadeando um maior desconforto na região da sutura levando os animais a retirarem os pontos de pele. A prótese composta pela pele de Rã foi utilizada *in natura*, sem esterilização pré-operatória, tendo sido apenas desinfetada com clorexidina 2%, assim como o PEBD. Entretanto, a pele de Rã é um material biológico passível de deterioração seguida de inflamação e infecção diferentemente de materiais inorgânicos como o PEBD (VENTER, 2005), que por ser sintético, não biodegradável, não poroso e de camada única, tem maior probabilidade de obter na desinfecção pré-operatória com clorexidina a 2% um maior sucesso com a profilaxia da infecção. Um segundo fator que pode ter causado a deiscência de sutura maior no grupo Rã seria o fato da epiderme queratinizada da Rã, que ficou voltada para a pele do rato e demorou entre 15 e 30 dias para se desintegrar, ter provocado um atraso na cicatrização cutânea facilitando assim a deiscência de sutura.

A deiscência de sutura, entretanto foi apenas cutânea e não esteve associada à presença de secreção purulenta, abscesso, evisceração ou peritonite. Em estudo para hernioplastia em ratos utilizando peritônio de paca, Leal et al. (2014) obtiveram um índice de, aproximadamente, 30% de desenvolvimento de abscessos na parede abdominal, cujos autores associaram a fistulação cutânea, que permitiu a contaminação da prótese com dejetos dos animais predispondo, assim, o desenvolvimento desta patologia.

A prótese de pele de rã se manteve íntegra e bem integrada à musculatura abdominal dos animais, mesmo com deiscência de sutura cutânea. Este fato foi observado em todos os animais e mesmo nos animais onde a prótese esteve exposta, a proteção às vísceras e a movimentação do abdome foi perfeitamente mantida, fato este comprovado com a observação clínica dos animais que não perderam peso, mantiveram seu comportamento e movimentação normal dentro da colônia e pela análise macro e microscópica pós-operatória que demonstrou a ausência de abscessos, fístulas ou reações do organismo tentando expulsar a prótese.

Aos 90 dias de pós-operatório, apenas um animal (20%) do grupo pele de Rã apresentou deiscência de sutura, sendo esta considerada de Grau 1, visto que já havia tecido de granulação cobrindo a prótese e nenhuma parte desta apresentava-se exposta. No grupo PEBD assim como no grupo rã, um animal (20%) apresentou deiscência de sutura sendo esta de grau 3 visto que parte do PEBD estava exposto, sem presença de tecido de granulação cobrindo o plástico.

Montgomery (2013) cita que a utilização de produtos químicos para tornar próteses biológicas em próteses acelulares podem intoxicar o hospedeiro ou incrementar a reação

inflamatória do mesmo. Em nosso estudo a prótese biológica de pele de rã-touro foi usada *in natura*, sem adição de qualquer produto químico conservante, estabilizante ou para torná-la acelular. Em nosso estudo nenhum animal demonstrou sinais de intoxicação ou perda de peso em nenhum dos períodos pós-operatórios estudados, confirmando que a prótese biológica *in natura* é bem tolerada pelo organismo do hospedeiro não causando reações sistêmicas.

Temperaturas menores que o restante do abdome dos ratos observadas pela termografia no centro do defeito herniário criado, até o trigésimo dia de pós-operatório, comprova que a malha biológica de pele de rã-touro não havia sido absorvida totalmente até esta data. Fato este considerado bom no que diz respeito à efetividade no uso de uma prótese biológica. Segundo Montgomery (2013), quando as malhas biológicas são absorvidas precocemente elas podem deixar de ser efetivas.

Aderências peritoneais em superfície de próteses utilizadas para corrigir defeitos herniários acontecem em 80-90% dos pacientes (GAERTNER et al., 2010). A avaliação da formação de aderências nas próteses abdominais inclui incidência, extensão e qualidade das mesmas. A qualidade das aderências é determinada comumente através da utilização de escores que consideram o número de aderências, os órgãos envolvidos, a espessura e resistência destas aderências e se estas estão ou não associadas a fistulas entéricas ou obstruções intestinais (DIOGO-FILHO et al., 2004; BRITO E SILVA, 2009; COSTA, 2009; GAERTNER et al., 2010; KIST et al., 2012; RICCIARDI et al., 2012; GARCIA-MORENO et al., 2014; NOWACKI et al., 2014).

Todos os animais deste estudo apresentaram aderências peritoneais, concordando com Diogo-Filho et al. (2004) que relatam que estas aderências ocorrem em 90% ou mais nas grandes cirurgias abdominais. Em seu estudo, todos os animais que utilizaram uma prótese sintética (tela de polipropileno sem nenhum tipo de preparo) para hernioplastia apresentaram aderências peritoneais. Em outros estudos, como o de Leal et al. (2014) e o de Vidor et al. (2013), onde foram utilizadas próteses biológicas compostas de peritônio de paca e pericárdio bovino, respectivamente, a taxa de formação de aderências de omento às próteses foi de 100%, conforme encontrado no nosso experimento.

Ainda que tenham sido encontradas aderências, tanto nos animais com implante de pele de rã-touro como nos de implante com PEBD, segundo a classificação das aderências, estas se apresentaram em pequeno número (até 3), frouxas, facilmente desprendidas por manipulação,

sendo classificadas como de grau 1 (leves), em 95% dos animais. Todas as aderências na região cranial do abdome foram de omento maior no terço proximal da prótese e as aderências abdominais caudais foram de testículo direito e/ou esquerdo. A presença das aderências testiculares provavelmente esta associada ao fato dos roedores serem mantidos em biotério climatizado, com temperatura controlada e por um mecanismo termorregulatório manterem seus testículos a maior parte do tempo intra-abdominais, em contato direto com a porção caudal das próteses.

Muitas das aderências apresentaram-se situadas na zona de sutura entre a prótese e o hospedeiro, o que pode ser justificado pela presença de maior inflamação nesta região de transição devido à presença do material de sutura, já que este também atua como corpo estranho que pode incitar a formação das aderências.

Não houve diferença significativa entre os grupos, pele de Rã e PEBD, com relação a incidência e/ou gravidade de aderências ( $p_{k-w} = 0,43$ ;  $p < 0,05$ ), demonstrando que os dois biomateriais não estimulam a formação de aderências moderadas ou graves quando comparados com a tela de polipropileno sozinha, conforme os estudos de Diogo-Filho et al. (2004) ou coberta de filme de ácido láctico em estudo de Lontra et al. (2010), onde apresentaram a maioria das aderências, de grau 4, envolvendo grande omento, alças intestinais e fígado.

A formação de aderências foi considerada igual em todos os períodos pós-operatórios estudados. Nos dois grupos, com 7, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório as aderências demonstraram a mesma incidência e o mesmo escore de gravidade, discordando de Aramayo et al. (2013) que relatam que as aderências podem demorar entre 5 e 7 semanas, após a agressão peritoneal, para se formarem completamente e concordando com Gaertner et al. (2010) que afirmam que as aderências peritoneais não aumentam além dos 7 dias de pós-operatório.

Apesar do uso da imagem infravermelha ser de aplicação bem estabelecida na engenharia, na medicina a termografia ainda é um exame complementar em estudo e considerado, ainda por alguns, como método experimental (BRIOSCHI, 2011).

A termografia infravermelha é utilizada em Medicina Humana e Veterinária para diferentes fins, como: diagnóstico de câncer de mama (KENNEDY et al., 2009), patologias articulares, síndromes fibromiálgicas/ dores miofasciais, glaucoma, função glandular (BRIOSCHI, 2011), avaliação da profundidade de queimaduras precocemente (MASON et al., 1981), avaliação de viabilidade de enxerto ósseo (NÓBREGA et al., 2014), entre outros. Com

estas finalidades, o parâmetro mais clássico utilizado é a diferença de temperatura corpórea em relação à área lesionada ( $\Delta T$ ) ou o parâmetro de assimetria em relação ao lado contralateral (a diferença térmica esquerda/direita pode definir uma disfunção). Em nosso estudo tanto a determinação da área de inflamação assim como a determinação do percentual de contração da prótese não puderam ser realizadas através destes parâmetros, sendo necessária então, a criação de parâmetros matemáticos próprios para realização desta avaliação.

A termografia infravermelha foi utilizada por ser um método não invasivo para avaliação da inflamação e da retração da prótese nos diferentes períodos pós-operatórios estudados. Não existem citações prévias da utilização deste método avaliativo para acompanhamento da cicatrização de hernioplastias com ou sem o uso de biomateriais. A técnica se mostrou eficaz após as etapas do processamento das imagens. Diferentemente de outros estudos (VON BAHTEN et al., 2006; SACHARUK, 2009; NÓBREGA et al., 2014; CALKOSINSKI et al., 2015;), em que se avalia a inflamação em um único ponto observando-se a alteração da temperatura diretamente na imagem infravermelha, o presente estudo considerou toda a região abdominal do animal onde foi implantada a prótese, sendo necessário, portanto, a utilização de outras propriedades oriundas da medida de temperatura pelo termógrafo. Desta forma, as imagens infravermelhas foram processadas visando identificar os gradientes de temperatura, que permitiram delimitar a área inflamada, assim como, a presença e a contração da prótese, concordando com Brioschi (2011), que relata “a não utilização de transformações matemáticas” ser um dos erros mais comuns na interpretação das imagens termográficas, sendo motivo da ausência de seu emprego até hoje na prática clínica rotineira.

Através da análise termográfica foi possível observar que no grupo tratado com pele de Rã o processo inflamatório foi maior aos sete dias de pós-operatório, apresentou queda de quase 50% aos 15 e 30 dias de pós-operatório, chegando a zero com 90 dias de pós-operatório. Esta queda acompanhou a involução da prótese que aos 90 dias de pós-operatório se apresentava com 1/3 do seu tamanho original. Através da histologia pode-se confirmar que aos 90 dias de pós-operatório a prótese de pele de Rã já não apresentava mais as características próprias da derme e epiderme da Rã estando quase totalmente integrada ao tecido do hospedeiro.

Através da termografia pode-se observar que o grupo que recebeu prótese de PEBD apresentou aos 7, 15 e 30 dias de pós-operatório um processo inflamatório decrescente e menor que o processo inflamatório do grupo que recebeu pele de Rã. Entretanto, aos 90 dias de pós-

operatório este processo inflamatório triplicou. O tamanho da prótese PEBD se manteve, visto que se trata de um biomaterial inabsorvível. O processo inflamatório tardio pode ter sido atribuído a liberação de produtos da deterioração do polímero PEBD que se reuniram dentro da cápsula ou na interface cápsula-implante promovendo assim uma reação tecidual exagerada, com prolongamento da fase inflamatória (GREER e PEARSON, 1998; KLOSTERHALFEN et al., 2005).

Considerando os achados histopatológicos semi-quantitativos em nosso experimento, observamos uma diminuição gradativa no processo inflamatório causado pela prótese de pele de Rã e um processo inflamatório que reduziu até os 30 dias e aumentou aos 90 dias de pós-operatório no grupo que recebeu o PEBD. O teste Kruskal-Wallis empregado apontou diferença significativa entre estes processos nos dois grupos ( $p_{k-w} = 0,0029$ ;  $p < 0,05$ ). Através do teste Mann-Whitney constatou-se que esta diferença estava no período de 90 dias de pós-operatório ( $p_{m-w} = 0,046$ ;  $p < 0,05$ ). Estes achados refletem que no momento inicial as duas próteses provocaram inflamação acentuada em todos os animais, fato este que pode ser associado não somente às próteses implantadas, mas também ao trauma provocado pela cirurgia propriamente dita. Aos quinze dias de pós-operatório a inflamação acentuada cedeu em ambos os grupos, entretanto o grupo Rã demonstrou um maior número de animais com inflamação moderada que o grupo PEBD. Esta situação pode ser explicada pela maior taxa de deiscência de sutura cutânea (60% dos animais) apresentada pelo grupo pele de Rã neste período. Com 30 dias de pós-operatório, a inflamação começou a aumentar no grupo que recebeu PEBD e continuou a declinar no grupo que recebeu pele de Rã, situação esta que se consolidou aos 90 dias de pós-operatório onde o grupo PEBD apresentou 80% dos animais com grau acentuado de inflamação contrariamente do grupo Rã que apresentou 80% dos animais com grau leve de inflamação. A resposta acima descrita corrobora com Smart et al. (2012) que descreve ser mais longo (crônico) o processo inflamatório por reação tipo corpo estranho em próteses de absorção lenta ou inabsorvíveis, que no caso do presente estudo é representado pela prótese PEBD.

Ocorreu uma predominância do processo inflamatório agudo no grupo pele de Rã aos 7 dias de pós-operatório com presença de neutrófilos em 40% dos ratos e em 20% do grupo PEBD. Aos 15 dias de pós-operatório observamos uma redução neste processo passando a porcentagem de aparecimento de neutrófilos para 25% dos ratos do grupo pele de Rã e ausente no grupo PEBD. Aos 30 e 90 dias de pós-operatório não foi observada a presença de neutrófilos em

nenhum animal do grupo pele de Rã e nem do grupo PEBD, resposta esperada, visto que, após quinze dias a resposta deixa de ser aguda com presença de outros tipos celulares.

No que concerne aos mononucleares e fibroblastos ativos os resultados nos mostram que aos 7, 15 e 30 dias de pós-operatório os dois materiais testados apresentaram respostas similares com presença de todos os tipos celulares variando um pouco com relação à porcentagem de aparecimento em cada período testado, sendo que aos 90 dias de pós-operatório a diferença entre os materiais foi marcante. No grupo que recebeu a pele de rã, fibroblastos ativos, linfócitos e plasmócitos se encontravam presentes em apenas 30% dos animais e nenhum animal apresentou mastócitos. No grupo PEBD, aos 90 dias de pós-operatório, 100% dos animais ainda apresentaram fibroblastos ativos, 70% ainda apresentaram linfócitos e plasmócitos e 30% ainda apresentavam mastócitos. A presença destes tipos celulares aos noventa dias de pós-operatório pode significar uma cronicidade do processo inflamatório (processo inflamatório não resolvido) (ARAMAYO et al., 2013).

Em nosso estudo, o grupo pele de Rã aos 7 dias de pós-operatório mostrou a presença de eosinófilos em 60% dos animais e o grupo PEBD mostrou em 50% dos animais, com 15 dias a presença de eosinófilos caiu para 25% no grupo pele de Rã e subiu para 60% no grupo PEBD. Aos 30 e 90 dias de pós-operatório a presença de eosinófilos foi ausente no grupo com implante de pele de Rã e no grupo PEBD aos 30 dias 20% dos animais ainda apresentou eosinófilos sendo estes ausentes aos 90 dias. A presença de eosinófilos pode representar processo inflamatório agudo e/ou reação de hipersensibilidade (ARAMAYO et al., 2013). Considerando que no grupo pele de Rã seu aparecimento esta coincidente com a presença dos neutrófilos acredita-se ser um processo inflamatório agudo. Já no grupo PEBD como seu aparecimento difere do aparecimento dos neutrófilos, estando com incidência maior aos 7 e 15 dias de pós-operatório e persistindo até os 30 dias de pós-operatório não podemos descartar a possibilidade de seu aparecimento estar relacionado não somente a uma reação inflamatória mas também a uma reação de hipersensibilidade.

A presença de macrófagos e células gigantes pode indicar um processo inflamatório crônico com reação tipo corpo estranho não finalizada, assim como, pode indicar um processo inflamatório normal que está reorganizando um tecido para deposição de colágeno, sendo este tipo celular a chave do processo inflamatório, induzindo assim a neovascularização e a cicatrização propriamente dita (ARAMAYO et al., 2013; CASTRO BRÁS et al., 2012). No

presente estudo, o grupo que recebeu a prótese composta de pele de Rã teve a presença de macrófagos em 100% dos animais aos 7 e aos 15 dias de pós-operatório e de células gigantes em 40 e 50% dos animais aos 7 e 15 dias de pós-operatório, respectivamente, sendo que aos 30 e 90 dias de pós-operatório estas células não foram mais encontradas, concordando Castro Brás et al. (2012) que afirmam ser este tipo celular importante na remodelagem tecidual após implantes de próteses biológicas e absorvíveis. O grupo que recebeu implante de PEBD teve a presença de macrófagos e células gigantes em todos os períodos pós-operatórios estudados, sendo que aos 90 dias de pós-operatório a presença de macrófagos ocorreu em 100% dos animais e a de células gigantes ocorreu em 60% deles, concordando com Aramayo et al. (2013) e Castro Brás et al. (2012) que afirmam que a presença destas células mais tardiamente indicam processo inflamatório ainda não totalmente solucionado.

A interação entre a prótese e o hospedeiro foi avaliada de acordo com a presença ou ausência de lacuna entre a prótese e a derme do rato, nos diferentes períodos estudados. Este tipo de avaliação se mostrou fidedigna visto que seus resultados acompanharam os outros resultados não demonstrando discrepâncias e sim corroborando com os outros achados. Aos sete dias de pós-operatório ocorreu ausência total de interação entre os dois biomateriais e os hospedeiros, aos 15 e 30 dias de pós-operatório o grupo pele de Rã apresentou 80 e 100% de interação, respectivamente, sendo que o PEBD apresentou 80 e 100% de ausência de interação entre a prótese e o hospedeiro aos 15 e 30 dias de pós-operatório, respectivamente. Aos 90 dias de pós-operatório no grupo que recebeu a pele de Rã, 80% dos animais apresentaram interação acentuada da prótese com o hospedeiro e 20% dos animais apresentaram interação moderada, no grupo que recebeu prótese de PEBD, 80% dos animais apresentou interação leve entre a prótese e o tecido do hospedeiro e 20% apresentou ausência de interação.

Os resultados deste trabalho mostraram que a pele de Rã já havia sido quase totalmente integrada ao tecido do hospedeiro ao final de 90 dias, enquanto que a prótese de PEBD laminar bolhoso não apresentou tal integração e ainda causou uma reação inflamatória intensificada neste período. Sendo assim, para que uma prótese inabsorvível, tal qual o PEBD, seja considerada como passível de utilização na rotina clínica-cirúrgica, a mesma deve permanecer implantada por pelo menos 365 no tecido muscular, como postulado por Purchio (1993), sendo verificadas todas as reações adversas que possa vir a causar no hospedeiro.

## 6 CONCLUSÕES

- A prótese de pele de rã-touro mostrou-se biocompatível e eficaz em suportar as vísceras abdominais sem causar danos à movimentação abdominal. Sendo considerada um biomaterial promissor para hernioplastias.
- O PEBD laminar bolhoso produziu um processo inflamatório intenso aos 90 dias de pós-operatório. A sustentação às vísceras abdominais ocorreu perfeitamente até os 90 dias de pós-operatório permitindo a movimentação abdominal normal de todos os animais. Sendo considerado um bom material para implantes temporários de até no máximo 30 dias e sendo necessário novos estudos com períodos de implantação mais longos deste biomaterial para que seja utilizado com segurança nas correções de defeitos herniários de modo definitivo.
- Os materiais testados demonstram ser promissores no tratamento de defeitos herniários, sendo que, novos estudos com períodos mais longos de implantação e novos testes devem ser realizados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAMAYO, A. L. G.; LOPES FILHO, G. J.; BARBOSA, C. A.; AMARAL, V. F.; COSTA, L. A.. Abdominal wall healing in incisional hernia using different biomaterials in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28.n.4, 2013.

ARAÚJO LEITE, A.R.. **Avaliação da pele de Rã (*Rana catesbeiana*) como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas experimentais em cães (*Canis familiaris*)**. Monografia Graduação. Universidade Federal de Campina Grande, PB. 48p. 2010.

AZEVEDO, R. A.; SANTANA, A. S. J.; DE BRITO-GITIRANA, L.B.. Dermal collagen organization in *Bufo ictericus* and in *Rana catesbeiana* integument (*Anuran, Amphibian*) under the evaluation of laser confocal microscopy. **Micron**, v. 37, p. 223-228, 2006.

BELLEN, B.V.; MAGALHÃES, H.P..Técnica Asséptica. In: MAGALHÃES, H.P.. Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental. São Paulo: Sarvier, 1983.

BELLÓN, J. M.. Propuesta de una nueva clasificación de prótesis destinadas a la reparación de defectos herniarios em la pared abdominal. **Cir Esp.**; v.78, n.3, p.148-51, 2005.

BELLÓN, J. M.; GARCÍA-CARRANZA, A.; JURADO, F.; GARCÍA-HONDUVILLA, N.; SAN MARTIN, A. C.; BUJÁN, J..Peritoneal regeneration after implant of a composite prosthesis in the abdominal wall. **World Journal Surgery**, v.25, p.147-52, 2001.

BOWMAN, K. L.; BIRCHARD, S. J.; BRIGHT R. M.. Complications associated with the implantation of polypropylene mesh in dogs and cats: a retrospective study of 21 cases (1984-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.34, n.3, p.225-33, 1998.

BRIOSCHI, M. L.. **Metodologia de normalização de análise do campo de temperaturas em imagem infravermelha humana**. Tese de Doutorado. Curso de Engenharia Mecânica. Universidade Federal do Paraná. 115p. 2011.

BRITO E SILVA, R. S.. **Sistema de barreira com filme de hidrogel de poli (2-hidroxietil metacrilato) na prevenção de aderências peritoniais : estudo experimental em ratas e cadelas**. Tese de Doutorado. Escola de Veterinária. Universidade Federal de Goiás. 61p., 2009.

BRITO-GITIRANA, L.; AZEVEDO, R. A.. Morphology of *Bufo ictericus* integument (Amphibia, Bufonidae). **Micron**, v.36, p.532-538, 2005.

CALKOSINSKI, I.; DOBRZYNSKI, M.; ROSINCZUK, J.; DUDEK, K.; CHRÓSZCZ, A.; FITA, K.; DYMAREK, R.. The use of infrared thermography as a rapid, quantitative, and noninvasive method for evaluation of inflammation response in different anatomical regions of rats. **Bio Med Research International**, V, Article ID 972535, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/972535>, 2015

CASTRO BRÁS, L. E.; SHUREY, S.; SIBBONS, P. D..Evaluation of crosslinked and non-crosslinked biologic prostheses for abdominal hernia repair. **Hernia**, v.16, p.77–89, 2012.

CASTRO, C. M. M. B.; AGUIAR, J.L.A.; MELO, F.A.D.; FERREIRA E SILVA, W.T.; MARQUES, E.; SILVA, D.B.. Citotoxicidade de Biopolímero de Cana-De-Açúcar. **An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernambuco**, Recife, v.49, n.2, p. 73-77, 2004.

CORAÇA, D. C.. **Osteointegração de implantes de Poli (L-acidolático) PLLA e da blenda de Poli (L-acidolático) PLLA/Poli (óxido de etileno) PEO na tibia de ratos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 2002.

COSTA. R. G.. **Comparação entre o filme de ácido poli-lático (PAF) e a tela de submucosa intestinal suína (SIS) na formação de aderências peritoneais: estudo experimental em ratos**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CROWE JR, D. T.; BJORLING, D. E.. Peritônio e Cavidade Peritoneal. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed., v.1. São Paulo: Manole, p. 499-528, 1998.

DEL CARLO, R. J.; GALVÃO, S. R.; TINTO, J. J. R.; PONTINI, A. C. G.; LOPES, M. A. F. Estudo macroscópico das aderências peritoneais provocadas experimentalmente em cães estudo macroscópico das aderências. **Ciência Rural**, v.27, n.2, p.273-278, 1997.

DIOGO-FILHO, A., LAZARINI, B. C. M., VIEIRA-JUNYOR, F., SILVA, G. J., GOMES, H. L.. Avaliação das aderências pós-operatórias em ratos submetidos à peritoniotomia com tela de polipropileno associada à nitrofurazona. **Arq Gastroenterol.**, v.41, n.4, p.245-9, 2004.

ELKAN, E. Mucopolysaccharides in the anuran defense against desiccation. **J. Zool.**, v.155, n. 19, p.53,1968.

FALCÃO, S. C.; LOPES, S. L.; COELHO, A. R. B.; ALMEIDA, E. L.. Pele de *Rana catesbeiana* como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães. Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. **Acta Cirúrgica Brasileira [serial online]**, Maio-Jun; v.17, n.3, 2002.

FALCÃO, S. C.; NETO, J. E.; COELHO, A. E. B.. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, n.1, p.78-83. 2008

FERNANDES, A. A.; AMORIMA, P. R. S.; PRÍMOLA-GOMES, T. N.; SILLERO-QUINTANA M.; FERNÁNDEZ CUEVAS, I.; SILVA, R. G.; PEREIRA, J. C.; MARINS J. C. B.. Avaliação da temperatura da pele durante o exercício através da termografia infravermelha: uma revisão sistemática. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**,v.5, n.3, p.113-117, 2012

FLECNELL, P.A., RICHARDSON, C.A., POPOVIC, A.. Anesthesia, analgesia, and immobilization of selected species and classes of animals. Laboratory Animals. In: LUMB & JONES. **Veterinary Anesthesia and Analgesia**. 4 ed. USA: Blackwell Publishing, 2007.

GARCIA, C.F.. **Análise citológica de aspirado abdominal após o implante intracavitário de prótese de PVC (Cloro de polivinila) laminar bolhoso em roedores (*Rattus norvegicus albinus*) – Estudo experimental**. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Serra dos Órgãos - RJ. 23p, 2006.

GAERTNER, W.B., BONSACK, M.E., DELANEY, J.P.. Visceral adhesions to hernia prostheses. **Hernia**, v.14, p.375-381, 2010.

GARCÍA-MORENO, F.; RODRÍGUEZ, M.; SOTOMAYOR, S.; PÉREZ-KÖHLER, B.; BAYONC, Y.; PASCUAL, G.; BELLÓN, J. M.. Evaluación pre clínica de una nueva prótesis compuesta (Parietex TM Composite Ventral Patch) destinada a la reparación de hernias ventrales. **Revista Hispanoamericana de Hernia**, v.2, n.4, p.153-160, 2014.

GIANLUPI, A.; TRINDADE, M. R. M.. Comparação entre o uso de fio inabsorvível (polipropileno) e fio absorvível (poliglactina 910) na fixação de prótese de polipropileno em correção de defeitos músculo-aponeuróticos da parede abdominal. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** [serial online], v.19, n.2, p.94-102, 2004.

GOLDSTEIN, H. S. Selecting the right mesh. **Hernia**, Paris, v.3, p.23–26, 1999.

GREER, R.T.; PEARSON, P.T. Biomaterias, In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 ed., v.1. São Paulo: Manole, p. 133-142, 1998.

HASUNUMA, I., et al.. Expression of Genes Encoding Antimicrobial. Peptides in the harderian gland of the bull frog *Lithobates catesbeianus*. **Comp Biochem Physiol e Toxicol Pharmacol.**; v.152,n.3, p.301-305, 2010.

JORGE, S.F..**Emprego de Intestino Delgado de Suíno (*Sus scrofa domestica*) na Anastomose Colônica término-terminal em Cães (*Canis familiaris*) – Estudo Experimental**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, RJ, 2002.

JORGE, S.F.; CARVALHO, R.R.; OLIVEIRA, A.L.A.; SILVA, M.F.A.; TOLEDO, F.R.G.; SILVEIRA, A.K.. Emprego de Intestino Delgado de Suíno (*Sus scrofa domestica*) em anastomose colônica término-terminal em cães (*Canis familiaris*)-Estudo experimental. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.11, n.1/2, p.40-43, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining pluspolarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochem J.**, v.11, p.447-455, 1979.

KENNEDY, D. A.; LEE T.; SEELY, D.. A comparative review of thermography as a breast cancer screening technique. **Integrative Cancer Therapies**, v. 8, n. 1, p. 9-16, 2009.

KIST, C.; MANNA, B.B.; MONTES, J.H.M.; BIGOLIN, A.V.; GROSSI, J.V.M.; CAVAZZOLA, L.T.. Estudo comparativo de aderências intraperitoneais associadas ao uso das telas de polipropileno e de malha leve de polipropileno revestida com ácido graxo ômega-3. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n.3, 2012.

KLOSTERHALFEN, B.; JUNGE, K.; KLINGE, U.. The lightweight and large porous mesh concept for hernia repair. **Expert Review of Medicine Devices**, London, v.1, n.2, p.1-15, 2005.

LEAL, L.M.; FERREIRA, A.R.S.; REIS, A.C.G.; MARTINS, L.L.; GARCIA FILHO, S.P.; MACHADO, R.F.. O uso do peritônio de paca conservado em solução supersaturada de açúcar a 300% ou glicerina a 98% implantados na parede abdominal de ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1383-1391, 2014.

LEE, D.K.; TERRAZAS, R.G., VOTTO, L.G.; ARENSON-PANDICOW, H.. Técnica de indução inalatória em ratos. Estudo comparativo. **Acta Cir. Bras.** v. 9, n.1, p. 34-37, 1994.

LILIE-FULLMER, H.M. A comparative histochemical study of elastic, pre-elastic and oxitalan connective tissue fibers. **J. Histochem. Cytochem.**, v.3, p. 233-235, 1960.

LIU, Z., TANG, R., ZHOU, Z., SONG, Z., WANG, H., GU, Y.. Comparison of Two Porcine-Derived Materials for Repairing Abdominal Wall Defects in Rats. **PLoS ONE**, v.6, n.5, p.1-10, 2011.

LONTRA, M. B.; BIGOLIN, A. V.; COSTA, R. G.; GROSSI, J. V.; SCALCO, P.; ROLL, S.; CAVAZZOLA, L. T.. Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de Polipropileno na formação de aderências intraperitoneal – um modelo experimental em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.37, n.5, p.364-369, 2010.

MASON, B. R.; GRAFF, A. J.; PEGG, S. P.. Colour thermography in the diagnosis of the depth of burn injury. **Burns**, v.7, n.3, p.197-202, 1981.

MENDES, F. L.F.; **Estudo de aspirado abdominal após implante da prótese de cloreto de polivinila bolhosa e da tela de polipropileno em *Rattus norvegicus albinus***. Dissertação de Mestrado. Cirurgia Geral, Faculdade de Medicina da UFRJ. 2006

MIRANDA, M. E.; TATSUO, E. S.; GUIMARÃES, J.T.. Gastrosquise: Inovação técnico-cirúrgica. In: XVIII Congresso Brasileiro de Cirurgia Pediátrica, **Anais...**Belo Horizonte,1997.

MOCHIZUKI, M. **Efeito das aderências dirigidas sobre anastomose cólica isquêmica: trabalho experimental em ratos**. Dissertação de Mestrado. Campinas: Universidade Federal de Campinas, 2005. 89 p.

MONTGOMERY, A. The battle between biological and synthetic meshes in ventral hernia repair. **Hernia**, v.17, p. 3-11, 2013.

- NAKAYAMA, Y.; ISHIBASHI-UEDA, H.; TAKAMIZAWA, K.. In vivo tissue-engineered small-caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (biotube). **Cell Transplant**, v.13, n.4, p.439-49, 2004.
- NÓBREGA, F. S.; FERREIRA, M. P.; FACÓ, L. L.; SELIM, M. B.; DE ZOPPA, A. L. V.; Uso da termografia para avaliação da resposta tecidual após implante de polímero a base de poliuretano de mamona em osso III metacarpiano de equinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, n.1246, p.1-6, 2014.
- OJO, O. O.; ABDEL-WAHAB, Y. H. A.; FLATT, P. R.; MECHKARSKA, M.; CONLON, J. M.. Tigerin-1R: a potent, non-toxic insulin-releasing peptide isolated from the skin of the Asian frog, *Hoplobatrachus rugulosus*. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.13, p.1114-1122, 2011.
- OREFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais – Fundamentos e Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica. 538p, 2006.
- PELLI, A. A.; CINELLI L. P.; MOURÃO, P. A.S.; BRITO-GITIRANA, L.. Dermatan sulfate is the major metachromatic glycosaminoglycan in the integument of the anuran *Bufo ictericus*. **Micron**, v.41, p.660-665, 2010.
- PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M.. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quim. Nova**, v.xy, n.00, p.1-15, 2015.
- PREVEL, C. D.; EPPLEY B. L.; SUMMERLIN, D.J.; JACKSON, J.R.; MCCARTY, M.; BADYLAK, S.F. Small intestinal submucosa: utilization for repair of rodent abdominal wall defects. **Ann Plast Surg.**, v. 35, p. 374-80, 1995.
- PURCHIO, R.A. Industrialização de fios de Sutura, In HERING; GABOR; ROSEMBERG. **Bases Técnicas e Teóricas de Fios de Sutura**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 47-55, 1993.
- QIAN, Z.J.; JUNG, W.K.; KIM, S.K..Free Radical Scavenging Activity of a Novel Antioxidative Peptide Purified from Hydrolysate of Bullfrog Skin, *Rana Catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol**, v.99, n.6, p. 1690-1698, 2008.
- RICCIARDI, B. F.; CHEQUIM, L. H.; GAMA, R. R.; HASSEGAWA, L.. Correção de hérnia abdominal com tela envolta por tecido fibroso - estudo em ratos Wistar. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.39, n.3, p. 195-200, 2012.
- SACHARUK, V. Z.. **Avaliação termográfica e recuperação funcional da locomoção após esmagamento do nervo ciático em ratos adultos**. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 72p, 2009.

SHULMAN, A.G.; AMID, P.K.; LISHTENSTEIN, I.L. The safety of mesh repair for primary inguinal hernias: results of 3019 operations from five diverse surgical sources. **Am. Surg.**, v. 58, p. 255-257. 1992.

SMART, N.J., DANIELS, I.R., MARQUEZ, S.. Supplemental crosslinking in tissue-based surgical implants for abdominal wall repair. **International Journal of Surgery**, v. 10, n.9, p.436-442, 2012.

STURION, D. J.; BUCK, E. L.; TANAKA, N. M.; GERMANI, M. H.; STURION, M.A.T.. Uso de polímeros em Medicina Veterinária. **UNOPAR Científica**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 103-115, 1999.

TANG, L.; EATON, J.W. Inflammatory responses to biomaterials. **American Journal of Clinical Pathology**, v.103, n.4, p.466-471, 1995.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M.. Biomateriais em Cirurgia Craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações - revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.23, n.3, p.234-239, 2008.

VENTER, N. G.. Corpo Estranho, In:MARQUES, R. G.. **Técnica Operatória e Cirurgia Experimental**. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 472-487, 2005.

VIDOR, S. B.; MARQUES, J. M. V.; MOURA, L. F. L.; GOMES, C.; PAZ, A. H.; GOMES, H. M.; MEURER L.; BARROS, R. R.; GUIMARÃES, K. M.; CIRNE-LIMA, E. O.;CONTESINI, E. A.. Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos Wistar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, n. 1102, p.1-10, 2013.

VON BAHTEN, L.C.; MANTOVANI, M.; NICOLUZZI, J. E. L.; SILVEIRA, F.4; VON BAHTEN, A.C.. Perda de calor determinada pela exposição das alças intestinais em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33 - Nº 5, p. 265-271, 2006.

WILLENS S., STOSKOPF M.K., BAYNES R.E, LEWBART G.A., TAYLOR S.K., KENNEDY-STOSKOPF S. Percutaneous malathion absorption by anuran skin in flow-through diffusion cells. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 22, n.3, p. 255-62, 2006.

YEO, Y.; KOHANE, D. S. Polymers in the prevention of peritoneal adhesions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, New York, v.68, p.57-66, 2008.

## ANEXO

Anexo A – CEUA



Centro Universitário Serra dos Órgãos

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UNIFESO**

---

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o Projeto protocolado sob o nº435/15, intitulado “**Avaliação clínica, termográfica e morfológica da utilização da pele de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) e do polietileno de baixa densidade laminar bolhoso (plástico bolha) na herniorrafia da parede abdominal de *Rattus norvegicus*, variedade Wistar**”, apresentado por **SIRIA DA FONSECA JORGE**, avaliado na 63<sup>a</sup> reunião ordinária da Comissão de Ética no Uso de Uso de Animais (CEUA-UNIFESO) em 07/05/2015, e recebeu **APROVAÇÃO**.

Teresópolis, 08 de maio de 2015.

Prof. Alcides Pissinatti  
CEUA-UNIFESO