

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Veterinária
Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Dissertação de Mestrado

**Anatomohistopatologia de implantes de pericárdio bovino conservados em
diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de
camundongos**

Cláudia Borges da Costa

2009



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

**ANATOMOHISTOPATOLOGIA DE IMPLANTES DE PERICÁRDIO
BOVINO CONSERVADOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
GLUTARALDEÍDO EM PAREDE ABDOMINAL DE CAMUNDONGOS**

CLÁUDIA BORGES DA COSTA

Sob orientação da Professora:
Gisele Braziliano de Andrade

E co-orientação da Professora:
Marta Fernanda Albuquerque da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Junho de 2009

636.2089692

C837a

T

Costa, Cláudia Borges da, 1983-
Anatomohistopatologia de
implantes de pericárdio bovino
conservados em diferentes
concentrações de glutaraldeído em
parede abdominal de camundongos /
Cláudia Borges da Costa. - 2009.
87f. : il.

Orientador: Gisele Braziliano
de Andrade.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-
graduação em Medicina
Veterinária.

Bibliografia: f. 55-66.

1. Bovino - Infecções - Teses.
2. Pericárdio - Doença - teses.
3. Pericárdio - Histopatologia -
teses. 4. Glutaraldeído - Uso
terapêutico - Teses. I. Andrade,
Gisele Braziliano de. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-
graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

Bibliotecário: _____ Data: ____/____/____

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

CLÁUDIA BORGES DA COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau em **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/06/2009

Gisele Braziliano de Andrade. Dr^a – UCDB
(Orientadora)

Ricardo Junqueira Del Carlo. Dr – UFV

Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho. Dr - UENF

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação àqueles que acreditaram em mim e que me apoiaram durante estes dois anos, mostrando minha capacidade de concluir este experimento mesmo com todas as adversidades que surgiram ao longo do caminho. À minha amada mãe, Marilda, às minhas irmãs e melhores amigas, Bianca e Cinthia, ao grande companheiro e amigo, Diogo e ao meu querido pai, que com certeza esteve ao meu lado durante toda essa grande caminhada.

AGRADECIMENTOS

Por este objetivo alcançado agradeço primeiramente a Deus, pela força, coragem, serenidade e paciência concedidas.

À minha orientadora Prof^a e MV Gisele Braziliano de Andrade, Professora Titular das Disciplinas de Citologia, Histologia e Patologia Animal da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) de Campo Grande-MS, pela amizade e confiança depositadas durante este estudo, meu sincero agradecimento.

À minha co-orientadora Prof^a e MV Marta Fernanda Albuquerque da Silva, do Departamento de Medicina e Cirurgia Veterinária da UFRRJ um grande e eterno agradecimento. Seu apoio, confiança e incentivo constante neste período tão especial foram essenciais, assim como a grande amizade formada.

À Secretaria de Agricultura do Estado do Rio de Janeiro, pela permissão concedida para as coletas de pericárdio, ao Matadouro e Frigorífico Frirrio e à Miriam de Souza Leão Attayde, MV e Técnica responsável pela Inspeção Sanitária, que colaboraram e me orientaram na coleta do material.

Ao Laboratório de Coccidioses do Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ, pelo fornecimento dos camundongos utilizados no experimento.

À Prof^a MV Graça Danelli e ao Prof^o MV Clayton Gitti, dos Departamentos de Virologia e de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ respectivamente, por cederem a sala e as caixas na qual os animais permaneceram abrigados durante todo o experimento.

Ao Prof^o Cláudio de Moraes Andrade, ex-professor do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ pelos ensinamentos na preparação das soluções e ao Prof^o Paulo Botteon, do Departamento de Clínica e Cirurgia da UFRRJ, pela colaboração na elaboração das soluções.

À Residente do Laboratório de Anatomia Patológica Juliana da Silva Prado, do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da UFRRJ, pela orientação no processamento do material para microscopia.

Ao Técnico Thompson Rosa de Souza, do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Católica Dom Bosco de Campo Grande-MS, pelo grande apoio e dedicação na preparação das lâminas para a análise microscópica.

Às MV Raquel Teixeira, Thais Andrade Porto, Priscila Cavalcanti, Caroline Rodrigues e à graduanda Janaína Leal. O grande auxílio e apoio de vocês durante as cirurgias, pós-operatórios e necropsias foram muito importantes para a realização deste estudo.

Enfim, agradeço a todos aqueles que ajudaram na realização e conclusão deste experimento que, mesmo com grandes ou pequenos atos, serão lembrados e terão meu sincero reconhecimento para sempre.

BIOGRAFIA

Cláudia Borges da Costa, pós-graduanda do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFRRJ, cursou 1^o e 2^o graus no Colégio Macedo Soares, em Volta Redonda-RJ e graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, a qual foi concluída em novembro de 2006. Estagiou na área de Clínica no Hospital Veterinário da UFRRJ no ano de 2003, na área de Anatomia Patológica Animal em 2004 e na área de Cirurgia no Hospital Veterinário da UFRRJ e pelo Projeto de Controle de Natalidade de cães e gatos da UFRRJ, em 2005 e 2006, e em clínica particular de pequenos animais no ano de 2005. Trabalhou em duas clínicas particulares em 2007 e participou em diversos congressos na área de Medicina Veterinária.

RESUMO

COSTA, Cláudia Borges. **Anatomopatologia de implantes de pericárdio bovino conservados em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal de camundongos.** 2009. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

Este experimento teve como objetivo reconhecer e quantificar as possíveis alterações teciduais macro e microscópicas que podem ocorrer após a aplicação de pericárdio bovino conservado em diferentes concentrações de glutaraldeído em parede abdominal. Também foram identificadas possíveis interferências na incorporação do enxerto de acordo com a variação da concentração da solução de tratamento. Pericárdios bovinos frescos, após limpeza e retirada de gordura, foram fracionados em fragmentos de 1cm² e tratados com solução de glicerina 98% por 30 dias (grupos controle) ou com solução de glutaraldeído 0,625%, 1% e 1,5% por 18 dias (grupos experimentais). Os fragmentos foram implantados na parede abdominal de 60 camundongos (n=15 por tratamento) por 7, 14 e 30 dias e após estes períodos, cinco animais de cada grupo foram sacrificados para coleta e análise macro e microscópica das amostras teciduais. Observou-se que a resposta inflamatória dos grupos com tratamento com glicerina e com glutaraldeído 0,625% foi semelhante tanto na infiltração das células inflamatórias quanto no processo de reparação. Os grupos com implantes tratados com glutaraldeído 1% apresentaram cronicamente (30 dias) a presença de fibrose e necrose mais intensa na musculatura da parede abdominal, quando comparado com os outros grupos de glutaraldeído, além de destruição tecidual. Esta também foi observada nos animais que receberam pericárdio tratado com glutaraldeído 1,5% e foram analisados com 14 e 30 dias, o que permitiu a conclusão de que esta concentração é inviável para o tratamento de membranas biológicas.

Palavras-chave: Glutaraldeído. Reação Inflamatória. Pericárdio Bovino. Implante.

ABSTRACT

COSTA, Cláudia Borges. **Anatomopathology of bovine pericardium implants preserved in different concentrations of glutaraldehyde in mice abdominal wall.** 2009. 73p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

This experiment aimed at recognizing and quantifying the possible macro and microscopic tissue alterations that may occur with the application of bovine pericardium preserved in different concentrations of glutaraldehyde on the abdominal wall. Besides, it also intended to identify the possible interferences in the implant incorporation, according to the variation in the concentration of each solution. Fresh bovine pericardium, after cleaning and the removal of fat, were fractioned and treated with 98% glycerin solution for 30 days (control groups) or with 0.625%, 1% and 1.5% glutaraldehyde solution for 18 days (experimental groups). The fragments were implanted on the abdominal wall of 60 mice (n=15 per treatment) for 7, 14 and 30 days. After each of these periods, five animals of each group were sacrificed for collection, and macro and microscopic analysis of tissue samples. It was observed that the inflammatory reaction in the groups treated with glycerin and 0.625% glutaraldehyde was similar in terms of inflammatory cells infiltration and the repairing process. The groups whose implants were treated with 1% glutaraldehyde chronically presented (30 days) not only more intense fibrosis and necrosis, when compared to other glutaraldehyde groups, but also tissue destruction. These were also observed in the animals that received the pericardium treated with 1.5% glutaraldehyde, analyzed after 14 and 30 days, what leads to the conclusion that this concentration is unviable for the treatment of biological membranes.

Keywords: Glutaraldehyde. Inflammatory Reaction. Bovine Pericardium. Implant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) fragmento de pericárdio bovino após tratamento de 18 dias com solução de glutaraldeído na concentração de 1,5%. (B) frascos com solução de glutaraldeído cobertos com folha de alumínio para proteção da luz 19
- Figura 2** - animal do grupo 10 com incisão na pele e pontos de reparo com fio Nylon 5-0 fixados na musculatura delimitando a área que será incisada 21
- Figura 3** - animal do grupo 10 com pontos de reparo delimitando as bordas da área após incisão e retirada do fragmento muscular21
- Figura 4** - animal do grupo 10 com suturas das bordas do fragmento do pericárdio bovino conservado em glutaraldeído com a face lisa do implante voltada para o interior da cavidade abdominal..... 22
- Figura 5** - animal do grupo 10 após fixação do fragmento de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído a musculatura com sutura simples descontínua 22
- Figura 6** - animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 30 dias (grupo 3). (A) cicatrização completa da pele (seta preta). (B) pericárdio bovino com total perda do formato original e início de incorporação (seta branca)..... 27
- Figura 7** - (A) animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 7 dias (grupo 1) - leve aderência de omento (seta preta). (B) animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 14 dias (grupo 2) - sobreposição de tecido conjuntivo sobre pontos e implante e lesão inflamatória com casca ao lado da ferida cirúrgica (seta branca)..... 27
- Figura 8** - (A) animal do grupo 4 (implante conservado em glutaraldeído 0,625% e coletado com 7 dias) com implante apresentando formato original, ausência de sobreposição de tecido conjuntivo e presença de áreas hiperêmicas ao redor dos pontos; (B) fragmento coletado com 14 dias com parte do tecido natural e implante de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído

0,625% (grupo 5), notar a permanência do formato original do implante (setas pretas); (C) animal com implante conservado em glutaraldeído 0,625% e avaliado com 30 dias (grupo 6), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo nos pontos e em parte do implante (setas brancas).....28

Figura 9 - animais com implante de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,0%: (A) animal avaliado com 30 dias (grupo 9), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo sobre alguns pontos de sutura e parte do implante (seta preta). (B) animal avaliado com 14 dias (grupo 8), notar neovascularização próxima aos pontos de sutura (seta branca)..... 30

Figura 10 -(A) implante conservado em glutaraldeído 1,5% mantendo formato original em animal avaliado aos 30 dias (grupo 12). (B) implante conservado em glutaraldeído a 1,5% apresentando formato original e áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura (setas brancas) com parte de tecido natural em animal avaliado com 30 dias (grupo10). (C) implante conservado em glutaraldeído 1,5% apresentando formato original e áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura e do implante (setas pretas) com parte de tecido natural de animal avaliado com 7 dias (grupo 10).....31

Figura 11 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 7 dias (grupo 1). (A) reação inflamatória intensa (seta curvada) entre pericárdio (P) e musculatura (M) (Giemsa de Lennert- 4X de acordo com o original), (B) e (C) angiogênese intensa(seta branca), necrose de fibras musculares e regeneração muscular moderada (setas pretas) (HE- 10X de acordo com o original) 33

Figura 12 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 14 dias (grupo 2). (A) nota-se reação e fibroplasia entre o implante (P) e o tecido muscular (setas pretas) (HE – 4x de acordo com o original). (B) reação inflamatória moderada ao redor e no interior do pericárdio (P) com neutrófilos, macrófagos, células gigantes (setas brancas) (Giemsa de Lennert – 10x de acordo com o original). (C) faixa de tecido conjuntivo integrando o implante (acima) à musculatura (abaixo) e ao redor dos fios de sutura (seta curva) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com o original)34

Figura 13 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 30 dias (grupo 3). (A) e (B) reação inflamatória e fibrose (setas brancas) moderadas entre o implante (P) e tecido muscular (M) e regeneração muscular (seta curva) (HE – 4x e 10x, respectivamente, de acordo com o original). (C) faixa mais espessa de tecido conjuntivo (seta preta) integrando o pericárdio (P) ao músculo (M) (à direita) e ao redor dos fios de sutura. (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com o original) 35

Figura 14 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% avaliado com 7 dias (grupo 4). (A) nota-se a fibroplasia entre o implante (P) e o tecido muscular (M) (seta curva branca), fibras musculares necróticas e área de calcificação distrófica (seta branca). (Giemsa de Lennert, 4X de acordo com o original). (B) moderada reação inflamatória entre as fibras musculares (M) (seta preta) e necrose de fibras musculares (seta curva preta) (Tricrômico de Masson, 10X de acordo com o original)36

Figura 15 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% avaliado com 14 dias (grupo 5). (A) reação inflamatória e fibroplasia intensas entre o implante (P) e o tecido muscular (M), regeneração muscular (seta preta) (HE, 4x de acordo com a original). (B) angiogênese e fibroplasia intensas (seta branca). (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original) 36

Figura 16 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% e avaliado com 30 dias (grupo 6). (A) reação inflamatória intensa entre o implante (P) e o tecido muscular (M), notar células gigantes (setas pretas). (HE 10x de acordo com a original). (B) intensa angiogênese, fibroplasia e fibrose (setas brancas) entre a musculatura (M) e à região de incorporação do implante (P), (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original)37

Figura 17 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 7 dias (grupo 7). (A) reação inflamatória moderada entre o implante (P) e o tecido muscular (M), notar expressiva tentativa de regeneração muscular (seta preta) (HE, 4x de acordo com a original). (B)

necrose de fibras musculares com calcificação distrófica (seta branca) (HE, 20x de acordo com a original). (C) angiogênese e fibroplasia intensas (seta curva) entre o implante (P) e o tecido muscular (M) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original) 38

Figura 18 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 14 dias (grupo 8). (A) reação inflamatória moderada entre o implante (P) (seta curva) e o tecido muscular (M) com células gigantes e fibrose ao redor implante (HE, 4x de acordo com a original). (B) necrose de fibras musculares com calcificação distrófica(seta branca). (C) - angiogênese e fibroplasia moderadas (seta preta) (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original) 39

Figura 19 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 30 dias (grupo 9). (A) reação inflamatória mista moderada entre o implante e o tecido muscular, com células gigantes (seta preta curva) (HE, 10x de acordo com a original). (B) necrose intensa com calcificação distrófica(Cc) no implante (P) (seta branca curva) (HE, 4x de acordo com a original). (C) área de necrose com calcificação distrófica(setas pretas) e regeneração de fibras musculares (M) (seta branca) (HE, 10x de acordo com a original)..... 40

Figura 20 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,5% e avaliado com 7 dias (grupo 10). (A e B) reação inflamatória mista moderada entre o implante (P) e o tecido muscular (M), angiogênese e fibroplasia intensas (setas pretas) (A - HE, 4x de acordo com a original B – 10x). (C) fibroplasia e regeneração muscular (seta branca) (Tricrômico de Masson, 20x de acordo com a original)..... 41

Figura 21 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,5% e avaliado com 14 dias (grupo 11). (A) reação inflamatória moderada no implante (P) e entre este e o tecido muscular (M), angiogênese e fibroplasia intensas (setas pretas) (HE, 4x de acordo com a original). (B) reação inflamatória ao redor do implante (P) com células gigantes (seta branca curva) (Giemsa de Lennert, 10x). (C) fibroplasia e angiogênese (seta preta curva), destruição de fibras musculares (M) (seta branca) (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original)..... 42

Figura 22 - Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,5% e avaliado com 30 dias (grupo V). (A) reação inflamatória moderada entre o implante e o tecido muscular, com células gigantes (estrela), (B) angiogênese e fibroplasia ainda intensas (seta grande) (A - HE, 4x de acordo com a original B - 10x). (C) intensa reação inflamatória e pouca integração entre o implante e o tecido muscular (notar fibras em necrose) (Giemsa de Lennert 20x de acordo com a original). (D) implante não integrado ao tecido muscular (seta fina) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original)43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
1. REVISÃO DE LITERATURA	
1.1 Conservação de Membranas Biológicas com Glicerina.....	03
1.2 Conservação de Membranas Biológicas com Glutaraldeído.....	05
1.3 Reação Inflamatória.....	10
2. METODOLOGIA	
2.1 Obtenção e Limpeza das Membranas Biológicas.....	18
2.2 Preparação das Soluções de Glutaraldeído e Glicerina.....	18
2.3 Tratamento e Conservação dos Pericárdios Bovinos.....	18
2.4 Amostragem dos Animais	19
2.5 Procedimentos Pré, Trans e Pós-Cirúrgicos.....	20
2.6 Coleta e Análise Macroscópica das Amostras Teciduais.....	23
2.7 Processamento e Análise Microscópica das Amostras Teciduais.....	23
3. RESULTADOS	
3.1 Análise Clínica no Período Pós-operatório.....	25
3.2 Análise Macroscópica.....	25
3.2.1 Grupo de animais com implantes conservados com Glicerina 98%.....	26
3.2.2 Grupo de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 0,625%.....	28
3.2.3 Grupo de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 1,0%	29
3.2.4 Grupo de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 1,5%	31
3.3 Análise Microscópica por Grupos.....	32
3.3.1 Padrão dos grupos de animais com implantes conservados com Glicerina 98%.....	32
3.3.2 Padrão dos grupos de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 0,625%.....	35
3.3.3 Padrão dos grupos de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 1,0%.....	37
3.3.4 Padrão dos grupos de animais com implantes conservados com Glutaraldeído 1,5%.....	40

3.4 Análise Microscópica por Comparação.....	43
3.4.1 Glicerina 98% X Glutaraldeído 0,625%.....	43
3.4.2 Glutaraldeído 0,625% X Glutaraldeído 1,0% X Glutaraldeído 1,5%.....	44
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ANEXOS

ANEXO 1A – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 1, 2 e 3 (Glicerina 98% - 7, 14 e 30 dias).....	67
ANEXO 1B – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 4, 5 e 6 (Glutaraldeído 0,625% - 7, 14 e 30 dias).....	67
ANEXO 2A – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 7, 8 e 9 (Glutaraldeído 1,0% - 7, 14 e 30 dias).....	68
ANEXO 2B – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 10, 11 e 12 (Glutaraldeído 1,5% - 7, 14 e 30 dias).....	68
ANEXO 3 - GIEMSA - MODIFICADO (LENNERT).....	69
ANEXO 4 - HEMATOXILINA E EOSINA (H&E).....	70
ANEXO 5 - TRICRÔMICO DE MASSON.....	72

INTRODUÇÃO

Há muitos anos, com a necessidade aparente de se fazer as lesões muito extensas cicatrizarem de forma adequada, assim como a de reparar cirurgicamente a falha de um órgão ou até mesmo parte dele, iniciou-se a utilização de membranas mecânicas ou biológicas como implantes. Desta forma, proporcionava-se ao paciente uma melhor condição de recuperação. Esta prática teve início na medicina humana, permaneceu restrita por muito tempo, e atualmente é bastante utilizada na medicina veterinária.

As membranas mecânicas são em sua maioria de materiais duros e resistentes como ouro, platina, porcelana e, as do tipo sintético, são as de vidro, plástico, carbono ou polímeros (COVARRUBIAS *et al.*, 2005). Membranas não absorvíveis, como a de tetrafluoroetileno por exemplo, foram desenvolvidas com o avanço da biotecnologia, e apresentam bons resultados nas pesquisas e na prática, entretanto, as membranas biológicas, também conhecidas como biomateriais, ainda são consideradas por muitos como o implante ideal para a prática cirúrgica reconstrutora.

As membranas biológicas podem ser de tecidos autólogos (implante proveniente do próprio corpo do indivíduo), homólogos (o doador do implante é da mesma espécie que o receptor) ou heterólogos (o doador do implante é de espécie diferente do receptor). Dentre as membranas heterólogas, destaca-se o pericárdio bovino, cuja área de aplicação vem sendo ampliada constantemente. Entretanto, para a utilização não só deste tipo de membrana como de qualquer outro biomaterial, é necessário submetê-lo a tratamento químico.

Vários agentes químicos vêm sendo utilizados para tratamento e conservação de tecidos biológicos a serem implantados em homens e animais, buscando principalmente eliminar a possibilidade de transmissão de microrganismos dos indivíduos doadores para os receptores. O agente químico mais conhecido e utilizado na medicina veterinária, no Brasil, para o tratamento e conservação de materiais biológicos é a glicerina na concentração de 98%.

A glicerina concentrada possui uma excelente atuação no tecido tratado, permitindo que suas características originais permaneçam e, devido à facilidade de manejo e por ser de baixo custo, membranas biológicas preservadas em glicerina são facilmente encontradas em clínicas e hospitais veterinários do país. No entanto, existe uma grande preocupação com o fato de sua ação antimicrobiana ser restrita a bactérias não-esporuladas e fungos, o que possibilita a transmissão de bactérias esporuladas e agentes virais conhecidos ou não ao animal receptor quando utilizados enxertos heterólogos ou homólogos.

Desde 1969, o glutaraldeído vem sendo utilizado na conservação de materiais biológicos principalmente na medicina humana (POMERANTZEFF, 1997). Os materiais tratados e conservados são aplicados em paredes de cavidades, assoalhos orbitários, em reparos de órgãos ocos, em reconstrução vascular e valvular, entre outros. A concentração utilizada é geralmente de 0,5% a 0,625%, considerada como esterilizante e não prejudicial à incorporação do implante. Entretanto, em 2006, Trani demonstrou que, na concentração de 0,625%, o glutaraldeído não é capaz de inativar o vírus rábico e, portanto, concentrações mais altas devem ser utilizadas.

A toxicidade do glutaraldeído é de grande preocupação, pois pode provocar reação inflamatória local exarcebada, e assim prejudicar a incorporação do enxerto, e até mesmo reações sistêmicas graves, como bronquite crônica. Resíduos de glutaraldeído remanescentes nas biopróteses podem implicar em reações inflamatórias, citotoxicidade, calcificação e falta de endotelialização. No entanto, desconhece-se a sua real capacidade de interferir no processo cicatricial de acordo com as diferentes concentrações nas quais é utilizado.

Existe, portanto, a necessidade de se descobrir uma concentração de glutaraldeído para ser utilizada no tratamento e conservação de membranas biológicas que não cause reações teciduais indesejáveis, pois desta forma, um novo passo poderá ser dado em busca de uma concentração ideal para o controle de microrganismos nos implantes biológicos de forma que um valor comum possa ser obtido.

Com esta base de conhecimento, este estudo teve por objetivo geral, determinar uma concentração de glutaraldeído usada na conservação de membranas biológicas capaz de induzir pequena reação inflamatória no local do processo cicatricial. Mais especificamente, objetivou-se reconhecer e quantificar as possíveis alterações teciduais macro e microscópicas que podem ocorrer após a aplicação, em parede abdominal, de pericárdio bovino conservado em diferentes concentrações de glutaraldeído, além de identificar possíveis interferências na incorporação do enxerto de acordo com a variação da concentração da solução em questão.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Conservação de Membranas Biológicas com Glicerina

Por muito tempo, o único tipo de membrana biológica utilizada em implantes eram as autólogas. A dificuldade de obtenção deste material devido a sua pouca disponibilidade no organismo, assim como a sua conservação e esterilização, tornaram este tipo de material restrito a cirurgias reconstrutoras, enquanto que os implantes homólogos são utilizados em transplantes de tecidos e órgãos (COVARRUBIAS *et al.*, 2005). Desta forma, estudos com membranas heterólogas começaram a ser realizados. Entretanto, tecidos biológicos apresentam rápida degradação e necessitam ser estabilizados, de forma que a sua estrutura e integridade mecânica original prolonguem-se e suas propriedades antigênicas sejam removidas ou neutralizadas, podendo assim ser empregados como biomaterias (BAUCIA *et al.*, 2006). Sendo assim, a busca por agentes químicos que proporcionassem o melhor tratamento e conservação dessas membranas, com eficiente efeito antimicrobiano, começou a ser efetuada.

Pigossi, em 1967, frente à necessidade de utilizar membranas biológicas para reparação cirúrgica, realizou um estudo experimental em cães. Ele analisou por um período de 19 a 105 dias a dura-máter de cães, que após lavagem em água corrente para retirada de sujidades, foi acondicionada em frasco de tubo de ensaio com glicerina pura à temperatura ambiente e conservadas durante este período. Em períodos variáveis, exames histológicos das peças de dura-máter para a verificação de alteração em sua textura foram realizados e uma discretíssima delaminação do colágeno foi notada e, posteriormente, atribuída à desidratação. Estas membranas foram implantadas em dura-máter de cães sem realização de testes bacteriológicos prévio. Os animais foram acompanhados e sacrificados em períodos de 10 a 360 dias, sendo um animal por mês, e à necropsia apresentavam ausência de reação inflamatória aguda. De acordo com o autor, este fato indicou a esterilidade e uma baixa antigenicidade do material implantado, uma vez que os animais não receberam antibioticoterapia. Posteriormente houve substituição da dura-máter com a reabsorção e incorporação do material implantado nos casos de período de evolução mais longo (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al.*, 1971).

O primeiro agente químico utilizado no tratamento de membranas biológicas foi, portanto, a solução de glicerina e durante muitos anos foi a única solução esterilizante utilizada na medicina veterinária. Esta solução, em altas concentrações, atua desidratando o tecido e removendo a maior parte da água intracelular, sem, contudo alterar as concentrações iônicas das células, sendo por isso eficaz fixador e protetor da integridade tecidual (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al.*, 1971; LEITE *et al.*, 1979; BRAILE, 1990).

Muitos experimentos foram e vêm sendo realizados com membranas biológicas conservadas com glicerina (PIGOSSI, 1967; PIGOSSI *et al.*, 1971; ALVARENGA, 1977; LEITE *et al.*, 1979; BRAILE, 1990; BARROS *et al.*, 1994; ALMEIDA *et al.*, 1998; BRANDÃO *et al.*, 2001; GURGEL & CORTEZ FILHO, 2001; BRAGA & PIPPI, 2009; QUITZAN *et al.*, 2003; BRUN *et al.*, 2004) e os resultados obtidos sempre foram satisfatórios tanto em nível de reação inflamatória quanto processo regenerativo. De acordo com Leite *et al.* (1979) este agente químico proporciona ausência de reações inflamatórias agudas dos implantes, o que indica a baixa antigenicidade do transplante mantido neste meio de conservação, e para Mota *et al.* (2002) a solução de glicerina 98% é a que melhor mantém a integridade celular. No entanto, esta solução possui ação antimicrobiana restrita e de acordo com Rodas *et al.* (2008) a glicerina possui ação citotóxica em concentrações acima de 78%. De acordo com os autores, o extrato de pericárdio bovino tratado com glicerina 78%, ao ser implantado em uma cultura de células ovarianas de hamster eliminou 50% da população celular indicando, portanto, atividade citotóxica.

Pigossi *et al.* (1971), relataram a impossibilidade de investigação da transmissão de partículas virais por meio de membranas biológicas tratadas com glicerina 98% por motivos técnicos, no entanto consideram esta solução de tratamento, embora seja utilizada em concentrações menores para manutenção viral na rotina de laboratórios, capaz de inativar partículas e evitar a transmissão de moléstias à vírus quando em conservação prolongada e à temperatura ambiente. Porém, Trani (2006) demonstrou que, mesmo à temperatura ambiente e por período de 30 dias, o vírus rábico foi mantido em pelo menos 50% das amostras tratadas.

Diante destes fatos a necessidade de utilização de outra solução para conservação que possa ser tão eficiente quanto a glicerina, mas que possua principalmente uma ação antimicrobiana maior, tornou o glutaraldeído motivo de pesquisas.

1.2 Conservação de Membranas Biológicas pelo Glutaraldeído

O glutaraldeído ($C_5H_8O_2$), também conhecido como pentanedial, é uma solução química, biocida e desinfetante, utilizada no tratamento químico, conservação e fixação de biomateriais (U.S.DHHS, 2009). A sua utilização teve início na medicina humana no final dos anos 60, por Carpentier *et al.* (1969), que o empregou no tratamento de válvulas heterólogas sendo seguido mais tarde por Ionescu *et al.* (1971) no início da década de 70. Quando comparado, por exemplo, com formaldeído e outros aldeídos, o glutaraldeído apresenta ligações cruzadas mais estáveis reagindo com proteínas como a albumina e colágeno, e mucopolissacarídeos incluindo a heparina (BRUCK, 1980 apud JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996). A aplicação desta solução de tratamento e conservação abrange membranas biológicas como cartilagens (ADLINGTON *et al.*, 1992), por exemplo, além de implantes de pele (ZHENG, 1991), colágeno (OLIVER *et al.*, 1975; OLIVER e GRANT, 1979) e pericárdios autólogos ou heterólogos, tendo então se mostrado eficiente em muitos estudos.

Ligações cruzadas são reticulados tridimensionais onde as ramificações das moléculas podem estar interligadas com diferentes cadeias lineares e, estas configurações moleculares provocam alterações nas propriedades dos polímeros (MAIZATO, 2003). O glutaraldeído, quando comparado com outros aldeídos, gera ligações cruzadas mais eficientes química, biológica e termicamente. Ele possui a vantagem de reagir relativamente rápido, é capaz de atravessar várias distâncias entre as moléculas de proteínas e de reagir com um largo número de grupos de aminas viáveis presentes nas moléculas. Além disso, tecidos com ligações cruzadas com glutaraldeído retém mais as propriedades viscoelásticas do sistema fibrilar do colágeno, o que os tornam viáveis como biopróteses (FEIN *et al.*, 1957 e BOWERS *et al.*, 1966 apud JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996).

Adlington *et al.*, (1992) efetuaram um estudo com diferentes modos de preparação da cartilagem para implante em ratos. Cartilagem costal homóloga foi desvitalizada por quatro métodos comuns – irradiação, formalina, glutaraldeído e álcool. Segmentos desta cartilagem foram inseridos em lugares separados no subcutâneo da cauda. Após um ano, estes implantes foram avaliados e concluiu-se que a diferença no modo de preparação não interferiu no equilíbrio entre reabsorção e fibrose e, a cartilagem costal homóloga tratada com glutaraldeído, em particular, apresentou uma boa resposta tecidual, com desenvolvimento da reabsorção da fibrose e do implante.

Chauvaud *et al.*, (1991) indicam pericárdio autólogo conservado com glutaraldeído como material de escolha para reparos de válvula mitral, pois previne deterioração tardia e calcificação do tecido. No entanto, nos últimos 40 anos, estudos vêm sendo realizados e mostram que o pericárdio bovino tem boa resposta quando aplicado em reparos de aorta, átrio esquerdo e paredes pericárdicas (PIRES *et al.*, 1999).

O pericárdio é uma membrana que forma um saco fibroso, grosso, translúcido, de duas capas. É composto por uma folha fibrosa externa que se adere ao esterno, aos grandes vasos e ao diafragma, e por uma membrana serosa interna. Sua capa fibrosa está coberta por uma lâmina serosa de células cubóides, que junto com a membrana serosa formam o pericárdio parietal. A membrana serosa, por sua vez, se reflete na superfície epicárdica formando o pericárdio visceral (COVARRUBIAS *et al.*, 2005). O maior constituinte do pericárdio parietal é o tecido fibroso, cujo principal componente são as fibras compactas de colágeno dispostas entre três capas orientadas em ângulos iguais entre si. As fibras de elastina também formam parte do pericárdio, no entanto são menos numerosas, não formam fibras densas e tendem a estar orientadas em ângulo reto com relação às fibras colágenas adjacentes. A predominância de colágeno e sua configuração anatômica são muito importantes para as propriedades viscoelásticas do pericárdio (HOLT, 1970 apud COVARRUBIAS *et al.*, 2005).

Tanaka, em 1981, testou o pericárdio bovino conservado com glutaraldeído como substituto de parede atrial. O pericárdio bovino fresco foi tratado com solução de glutaraldeído 0,6% e conservado por mais de duas semanas. O material foi implantado na parede do átrio direito de 8 cães. Pericárdio autógeno e Dacron foram utilizados da mesma maneira em outros 3 cães cada. Os animais foram sacrificados após 8 meses e análises macro e microscópicas foram realizadas. O pericárdio bovino apresentou ausência de contração e mínimo adensamento e mostrou-se muito conveniente ao manejo e sutura durante a cirurgia, enquanto que o pericárdio autógeno se mostrou flexível, mas inconveniente ao manejo. Este mesmo material foi utilizado posteriormente em seis pacientes para reparação de defeitos de pericárdio, septo atrial, pleura mediastínica, pleura parietal e artéria braquial e o autor concluiu que o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, resistente ao sangue por si mesmo, é um agradável substituto do pericárdio autógeno e promete uma grande variedade de aplicações.

O pericárdio bovino, material heterólogo, é um material de origem biológica altamente resistente, de fácil manejo cirúrgico, maleável e sem problemas de reação com corpo estranho. Além disso, é um tecido de fácil acesso e habitualmente representa um material de

interesse no processo industrial de bovinos (IONESCU *et al.*, 1979). O tratamento do pericárdio com glutaraldeído lhe proporciona propriedades mecânicas e imunogênicas, flexibilidade, reduz a trombogenicidade e controla a degradação tecidual (MAIZATO *et al.*, 2008). Após o tratamento, com remoção de restos celulares, proteínas degradáveis e lipídeos, ele consiste de uma malha de fibras colágenas, um material fácil de suturar, com boa força, mínima elasticidade, e ausência de irritações no contato com outros materiais (ANSON & MARCHAND, 1996 apud YAMATOJI *et al.*, 2005).

Com base nessas qualidades adquiridas, o pericárdio recebe indicações para cirurgia cardiovascular (fechamento de defeitos intercavitários, ampliação da via de saída do ventrículo direito, alargamento do anel aórtico em trocas valvares, tratamento de aneurismas de aorta e ventrículo esquerdo, reconstruções atriais e ventriculares), torácica (fechamento de coto brônquico, fechamento de hérnias diafragmáticas, tratamento de defeitos congênitos e traumáticos da parede torácica), geral (tratamento cirúrgico de hérnias e eventrações), urológica (cistoplastias, ureteroplastias) e neurocirurgia (substituição de dura-máter) (FONTE: BRAILE BIOMÉDICA - INDÚSTRIA DE PRODUTOS CÁRDIOVASCULARES, 2007).

O pericárdio bovino é composto por fibras colágenas e, quando fixado em glutaraldeído, a sua estabilização bioquímica melhora, deixando-o mais resistente, e a sua antigenicidade é reduzida, permitindo sua incorporação biológica (WOODROOF, 1979; SANTILLAN-DOHERTY *et al.*, 1995). Com isso, Santillan-Doherty *et al.* (1996) avaliaram o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, como uma bioprótese para reconstrução cirúrgica de defeitos da parede abdominal, e concluíram que este tipo de membrana é um material biológico com resistência suficiente para ser utilizado nestes tipos de reparos. Boin Ide (2003) também utilizou este tipo de membrana em cavidade, empregando-a na substituição de parte do músculo diafragmático e obteve bons resultados mesmo após a realização de mais quatro laparotomias.

Jasso-Victoria *et al.* (2003) analisaram a viabilidade do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído como implante interposicional em reparo cirúrgico de perfurações de septo nasal. Após a formação de uma perfuração de 2,5 cm em 18 porcos, seis animais não receberam tratamento, outros seis receberam os implantes tratados e conservados com glutaraldeído e os últimos receberam implantes de pericárdio bovino liofilizado e tratado com glutaraldeído. Os animais foram avaliados diariamente por seis meses e, após este período, todos os animais dos grupos que receberam o implante apresentaram oclusão da perfuração e

boa cicatrização, ao contrário do grupo que não recebeu qualquer tipo de tratamento, demonstrando, dessa forma, que o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído é um material adequado para este procedimento cirúrgico.

O material utilizado em implantes somente é ideal para aplicações “in vivo” se for biocompatível e causar a menor toxicidade ou injúria ao tecido, e não deve ser carcinogênico ou imunogênico (TANG *et al.* 1995). Ao longo dos anos, o pericárdio bovino tem se mostrado um eficiente biomaterial com bons resultados, além de ser de fácil obtenção e de baixo custo, sendo necessária autorização do órgão governamental responsável pela fiscalização do matadouro. Outras vantagens observadas no pericárdio, quando tratado com o glutaraldeído, além da resistência é a ausência de rejeição como corpo estranho (SANTILLAN-DOHERTY *et al.*, 1995), é de fácil manipulação cirúrgica e atua como uma base adequada sobre a qual proliferam fibroblastos com depósito de colágeno e formação de cicatriz em forma satisfatória (SANTILLAN-DOHERTY *et al.*, 1996). Portanto, uma vez que a resposta tecidual local ao biomaterial é o critério mais importante para a determinação da biocompatibilidade (BURUGAPALLI *et al.*, 2004), pode-se considerar o pericárdio bovino conservado com glutaraldeído um material biocompatível.

De acordo com Burugapalli *et al.* (2004), o hidrogel cruzado com glutaraldeído (IPN) é considerado o implante com melhor biocompatibilidade, pois ele é formado por moléculas hidrofílicas de polímero de penetração total e parcial. Em um estudo, eles implantaram hidrogel IPN no subcutâneo da região dorsal de ratos. Ao final do experimento, não foi observada nenhuma infecção viral ou fúngica durante as 12 semanas de estudo, o que indica a possibilidade de propriedade antimicrobiana, e constatou-se a integração do hidrogel com proteína da matriz extracelular e crescimento de capilares sobre e ao redor dele.

A vantagem do material biológico está justamente na baixa incidência de tromboembolismo, além das boas características hemodinâmicas (BAJPAI, 1985 apud PINTO *et al.*, 1993; POMERANTZEFF *et al.*, 1997), como a ausência de anticoagulação (POMERANTZEFF *et al.*, 1997). O aspecto inerente à compatibilidade sanguínea implica uma série de características intrínsecas ao material de implante, ou seja, não destruir ou sensibilizar os elementos celulares do sangue, não alterar as proteínas plasmáticas, não causar respostas imunes diversas, não induzir à carcinogenicidade ou mutagenicidade, não produzir reações tóxicas ou alérgicas, não depletar eletrólitos, não ser adversamente afetado pela esterilização, apresentar estabilidade no ambiente fisiológico e não provocar calcificação (BRUCK, 1981 e STARK, 1991 apud PINTO *et al.*, 1993).

Algumas questões devem ser levadas em consideração na utilização do glutaraldeído e uma delas é a toxicidade. Pinto *et al.* (1993), realizaram um estudo experimental para avaliar a biocompatibilidade do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído conservado ou não e de tecido sintético (Dacron) na confecção de próteses cardiovasculares. Fragmentos de pericárdio foram submetidos ao tratamento com solução de glutaraldeído 0,5%, e outros fragmentos foram tratados com a solução de glutaraldeído 0,5% e acondicionados em formaldeído e, um terceiro grupo foi somente acondicionado em formaldeído sem tratamento prévio com o glutaraldeído. As amostras foram implantadas no tecido subcutâneo da região abdominal de ratos. Teste de cultura de célula “in vitro” foi realizado e mostrou um grau intenso de toxicidade associado ao resíduo do agente em tratamento. O grupo somente tratado com glutaraldeído, assim como o que foi tratado e conservado, apresentou toxicidade nas células.

Burugapalli *et al.*, (2003), por outro lado, após pesquisa, realizaram secções no fígado, rins, coração e baço e, histopatologicamente, estavam todos normais. O hemograma incluindo a contagem total de leucócitos estava normal em todos os animais da pesquisa. Valores de creatinina, aspartato aminotransferase e alanino aminotransferase também estavam normais, indicando ausência de toxicidade sistêmica.

Werley *et al.* (1996), por saberem que o glutaraldeído é um produto químico industrial amplamente utilizado, e biocida, com o qual a pele pode entrar em contato, procuraram avaliar a potencial toxicidade desta solução e realizaram um experimento com 344 ratos Fischer. Parte destes receberam aplicações epicutâneas de solução aquosa de glutaraldeído a 2,5%, 5,0% e 7,5% em uma dose de 2,0ml/Kg/dia, 6h/dia, sendo 20 aplicações por um período de 26 dias, e o grupo controle recebeu água filtrada na mesma dose. Os achados patológicos obtidos incluem acantoses, dermatites, hiperqueratoses, paraqueratoses, epidermites e fibroses dérmicas, não sendo obtida nenhuma evidência de toxicidade sistêmica.

A eficácia dos aldeídos como esterelizantes para bactérias, fungos e enterovírus depende da concentração, temperatura, pH e tempo de exposição. As baixas concentrações de glutaraldeído, usualmente utilizadas no tratamento de tecidos biológicos não são muito eficazes contra micobactérias, esporos de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*), fungos (*Chaetomium globosum*), e *slow viruses* (vírus com um longo período de incubação entre a infecção e o desenvolvimento de doenças degenerativas como a doença de Creutzfeldt-Jakob) (HILBERT *et al.*, 1988 apud MAIZATO, 2003). Trani (2006), também demonstrou a não viabilidade de baixas concentrações de glutaraldeído (0,625%) no tratamento e controle do vírus rábico em pericárdios bovinos tratados. Isto demonstra a

necessidade de aumento das concentrações utilizadas para este tipo de tratamento, entretanto, concentrações maiores são extremamente tóxicas (WERLEY *et al.*, 1996), embora sejam mais rigorosamente desinfetantes.

Devido a toxicidade do glutaraldeído, assim como do formaldeído, o qual é utilizado atualmente para conservação de próteses valvulares após o tratamento com o glutaraldeído, a lavagem abundante com solução salina antes de a membrana biológica ser implantada se torna uma questão importante (PINTO *et al.*, 1993). Além disso, já foi considerado que qualquer variação no modo de preparação pode influenciar no balanço (equilíbrio) entre a reabsorção do implante e a deposição de fibrose no local do implante (ADLINGTON *et al.*, 1992). Dessa forma, tornam-se necessárias novas pesquisas para se determinar concentração ideal de glutaraldeído que não interfira bruscamente na reação inflamatória, que não provoque intensa calcificação do implante, que não gere uma toxicidade local e que seja capaz de controlar de forma eficaz o crescimento microbiano.

1.3 Reação Inflamatória e Processo de Reparação por Implantes

No organismo de um indivíduo, todo tecido que sofrer alguma injúria, isto é, receber algum estímulo exógeno ou endógeno que provoque uma lesão celular, terá uma resposta inflamatória iniciada. Esta é uma reação complexa, que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, incluindo o plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo, e está estritamente ligada ao processo de reparação (COLLINS *et al.*, 2000). Conhecer este processo de reparação é importante para a compreensão de como os implantes são detectados pelo corpo e como esta detecção gera eventualmente uma resposta inflamatória, e esta compreensão, por sua vez, é algo difícil (TANG *et al.*, 1995).

Segundo Robbins e Cotran (2005), a resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular; e nessas reações estão envolvidos o fluido e as proteínas do plasma, as células gigantes, os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas e, das células do tecido conjuntivo, incluem os mastócitos, fibroblastos, macrófagos locais e linfócitos.

Avaliando o processo inflamatório após utilização de enxerto de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído, pode-se caracteriza-lo como crônico e moderado (GRECA *et al.*, 2006). A inflamação crônica possui duração prolongada, caracteriza-se pela ocorrência simultânea da inflamação ativa, destruição tecidual e tentativas de reparação (COLLINS, 2000). Respostas inflamatórias crônicas, acompanhadas de macrófagos e/ou acúmulo de células gigantes, têm sido observadas ao redor de muitos tipos de implantes de biomateriais e têm sido associadas com várias complicações adversas, afetando tanto o receptor quanto o implante em si mesmo (TANG *et al.*, 1995) e durante a resposta inflamatória crônica ao implante, produtos pela aderência de células inflamatórias, por exemplo, podem ser gerados e danificar o implante e/ou reagir com o biomaterial e gerar catabólitos tóxicos (ZHAO *et al.* 1990 apud TANG *et al.*, 1995).

Diferente da inflamação aguda, este tipo de inflamação, se caracteriza por uma infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos, reflexo de uma reação persistente à lesão (COLLINS, 2000). Os neutrófilos, cuja presença caracteriza uma resposta inflamatória aguda, aparecem no início somente e tendem a reduzir no decorrer do processo inflamatório-reparacional cedendo lugar a outros componentes que caracterizam mais a fase crônica ou reparadora (HADDAD FILHO *et al.*, 2004). Além disso, a inflamação crônica caracteriza-se também por tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada por proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose e necrose tissular (ROBBINS & COTRAN, 2005).

Como citado anteriormente, de acordo com Tang *et al.* (1995), o biomaterial ideal deve ser biocompatível e causar a menor toxicidade ou injúria ao tecido, e não deve ser carcinogênico ou imunogênico. Para Kim *et al.* (2000), no entanto, o biomaterial, além da biocompatibilidade, deve promover interação celular e desenvolvimento tecidual, e possuir propriedades mecânicas e físicas. Ele deve ser biodegradável e bioabsorvível para suportar a reconstrução de um tecido completamente normal sem inflamação e tal comportamento do biomaterial evitaria o risco de respostas inflamatórias e de corpo estranho que podem estar associada com a presença permanente do material estranho (KIM *et al.*, 1998).

Materiais sintéticos, como Dacron (PINTO *et al.*, 1993) e o politetrafluoroetileno (HADDAD FILHO *et al.*, 2004), ainda são utilizados e demonstram bons resultados em situações de reconstrução de parede de cavidades, no entanto, evidências provam que materiais biológicos podem apoiar “in vivo” e “in vitro” proliferação e adesão celular, ou seja, matrizes acelulares são remodeladas em tecidos vivos e podem funcionar como substitutos de bexiga, uretra e intestino (SUTHERLAND *et al.*, 1996, PARNIGOTTO *et al.*, 2000,

PARNIGOTTO *et al.*, apud CONCONI *et al.*, 2004). Biomateriais facilitam a localização e chegada das células e/ou fatores bioativos (peptídeos de adesão celular e fatores de crescimento) aos locais pretendidos no corpo, definem um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com estruturas apropriadas e guiam o desenvolvimento destes novos tecidos com sua apropriada função (KIM & MOONEY, 1998).

Dahm *et al.* (1990), analisaram a capacidade do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído de induzir respostas imunológicas “in vivo”. Fragmentos deste material foram implantados entre os músculos abdominais de ratos e porcos da Índia. Animais controle receberam implantes de Dacron e linfócitos foram isolados dos animais com 2 e 4 semanas após implantação (4 animais por grupo por período). Ao final do estudo, a histopatologia revelou um denso infiltrado de células mononucleares e gigantes multinucleares na interface entre o pericárdio bovino e ao redor do tecido hospedeiro, com degradação focal do colágeno do implante e, com isso, os autores concluíram que o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído pode induzir respostas imunológicas consistentes com uma reação hospedeiro *vs* implante. Este estímulo de reação imunológica muito preocupa os pesquisadores principalmente de válvulas cardíacas confeccionadas com pericárdio bovino e tratadas com glutaraldeído, pois este estímulo desencadeia uma reação inflamatória contra o tecido protético (GONG *et al.* apud COSTA *et al.*, 2005), o que leva à infiltração de matriz de colágeno, ruptura da malha colágeno-elastina e calcificação (GOISSIS *et al.*, 1999; SCHOEN *et al.* apud COSTA *et al.*, 2005), interferindo no funcionamento valvular. No entanto outros fatores também influenciam comprovadamente na calcificação de biopróteses valvulares como os estresses mecânicos e as interações com os componentes sanguíneos (BAUCIA *et al.*, 2006).

Deve-se sempre ter em mente não somente a toxicidade, mas a capacidade de calcificação do implante, a redução da biocompatibilidade e a durabilidade que os resíduos de aldeído provocam (MAIZATO, 2008), e a indução de reação inflamatória que o glutaraldeído promove quando utilizado em altas concentrações também. Sabe-se que a impermeabilização que ocorre quando o glutaraldeído e o pericárdio bovino reagem, além das ligações cruzadas poliméricas são os responsáveis pela liberação de glutaraldeído livre pós-implante, resultando em manifestações citotóxicas (SONG *et al.*, 1990 apud GOISSIS *et al.*, 1999). Por isso, muitas pesquisas foram e continuam sendo realizadas com o intuito de se chegar a uma concentração ideal, que não provoque toxicidade local ou sistêmica nem a calcificação do implante.

De acordo com Goissis *et al.* (1999), o maior problema nas biopróteses são as falhas estruturais causadas por rupturas na superfície do material que, no caso do pericárdio bovino, associadas ao tratamento com o glutaraldeído, tem como principal consequência a calcificação (LEE, 1993 apud GOISSIS *et al.*, 1999). Uma das resultantes da reação do glutaraldeído com o pericárdio bovino é a impermeabilização superficial do tecido resultante da formação de ligações de reticulação poliméricas (CHEUNG *et al.*, 1982 e CHEUNG *et al.*, 1985 apud GOISSIS *et al.*, 1999). Esta impermeabilização tem como resultado a presença de tecido, na região interna da matriz, a qual ainda mantém suas características originais (CHEUNG *et al.*, 1985 apud GOISSIS *et al.*, 1999), que por exposição, após ruptura mecânica são responsáveis pelo início do processo de calcificação, prejudicando significativamente e de modo progressivo o desempenho hidrodinâmico das válvulas biológicas, por exemplo (GOISSIS *et al.*, 1999).

No entanto, a calcificação ocorre também por várias outras razões, incluindo idade, fatores metabólicos, desgaste mecânico, tempo e posição de implante (POMERANTZEFF, 1997). É proposto ainda que o núcleo de calcificação aparece como resultado da adesão e da morte de células, as quais contêm fosfato de cálcio, fosfolipídeos, lipoproteínas e enzimas. Segundo Schoen *et al.*, (1986), a falha das biopróteses resulta na proliferação de sítios de calcificação que originam a formação de grandes nódulos de cálcio, os quais dissecam os planos tissulares das biopróteses causando o seu endurecimento e a sua ruptura.

Vincentelli *et al.* (1998), realizaram estudo para investigar se o glutaraldeído seria responsável, em parte, pela calcificação de tecidos após implantação em animais ou humanos. Uma ovelha de três meses recebeu amostras de pericárdio ovino e de pericárdio humano, as quais haviam sido tratadas com solução glutaraldeído 0,6% por 5, 10, e 20 minutos e 7 dias e devidamente lavadas antes da implantação delas no subcutâneo. Após 3 meses, as amostras foram retiradas e a quantidade de cálcio foi avaliada. Com o experimento, concluíram que o glutaraldeído influencia na calcificação, mas não de forma significativa.

Embora várias suposições venham sendo feitas para determinar a fisiopatologia da calcificação, ainda faltam informações. No entanto sabe-se que para este problema não existe tratamento e conseqüentemente muitos estudos utilizando produtos químicos anticalcificantes vêm sendo realizados (BAUCIA *et al.*, 2006) assim como testes para a identificação da ideal lavagem do material para a retirada dos resíduos de aldeído, na esperança de se conseguir um material que proporcione a menor calcificação possível.

Dentre os mecanismos da calcificação, tem-se a evidência de que a presença de células mortas e debris de restos celulares incompletamente fixados pelos métodos de tratamento funcionariam como núcleos de calcificação, permitindo a deposição de cristais de fosfatos e carbonatos de cálcio, sódio e magnésio (SCHOEN, 1999). Em adição a isso, o próprio tratamento com glutaraldeído funcionaria como fator desencadeante da deposição de cálcio (COSTA, 2005). Altos teores de glutaraldeído incorporado ao tecido biológico se relacionam com maior tendência a calcificação em modelo experimental em ratos (GRABENWÖGER, 1996 apud COSTA, 2005), por exemplo, e a relação causal entre pré-tratamento com glutaraldeído e calcificação, estudada por Nimni *et al.* em 1988, demonstrou que os polímeros de glutaraldeído e os resíduos carbonílicos livres na matriz de colágeno provêm um sítio inicial para a deposição dos complexos de cálcio.

Entretanto, Costa *et al.* (2005) efetuaram um estudo tendo como objetivo comparar a resistência mecânica do pericárdio decelularizado com o pericárdio convencional e assim avaliar sua capacidade de induzir resposta inflamatória em modelo experimental em ratos. Foram realizados implantes subcutâneos em 50 ratos Wistar. Ao analisar os resultados, identificaram em seu material a presença de atividade inflamatória e formação granulomatosa já nos explantes de sete dias e padrão semelhante foi observado nos grupos de animais sacrificados nos períodos posteriores (14, 30, 60 e 90 dias). Não encontraram qualquer vestígio de calcificação em nenhum dos espécimes do experimento e, apesar do achado de ausência de calcificação no material de controle (pericárdio bovino convencional com parâmetros de aprovação) ter sido inesperado, resultado semelhante também foi encontrado por Maizato *et al.* (2003) em estudo comparativo entre o pericárdio bovino liofilizado e o convencional.

Quando ocorre uma destruição tecidual, com lesão de células parenquimatosas e do arcabouço de estroma, o reparo não pode ser efetuado exclusivamente através da regeneração das células parenquimatosas, por conseguinte, ocorrem tentativas de reparo da lesão tecidual através da substituição das células parenquimatosas não-regeneradas por tecido conjuntivo, o qual com o decorrer do tempo produz fibrose. Dois processos estão envolvidos na fibrose: (1) a migração e proliferação dos fibroblastos no local da lesão (fibroplasia) e (2) deposição de matriz extracelular por essas células (ROBBINS, 2000). O fibroblasto é a principal célula produtora de colágeno dentro do processo inflamatório e é a responsável pela produção de material orgânico a ser utilizado pelo organismo para a reparação. Com estas características, é esperado que o número deste tipo de célula aumente no início do processo de reparação e

depois diminua, seja pela sua própria maturação ou por estar finalmente entre as fibras colágenas que produziu (HADDAD FILHO *et al.*, 2004).

Um experimento foi realizado por Alkan *et al.* (2006) com ratos, para investigar a pequeno e longo prazo as alterações histopatológicas causadas por injeção de glutaraldeído em ligação cruzada com colágeno bovino. Um grupo (controle) recebeu uma injeção de 0,1ml salina e o outro, uma injeção de 0,1ml de glutaraldeído em ligação cruzada com colágeno bovino. Os ratos foram avaliados em períodos pós-cirúrgicos diferentes (3, 6 e 12 meses). A avaliação histopatológica de bexiga e cérebro de todos os animais demonstrou a invasão de fibroblastos, formação de colágeno, crescimento capilar e reação inflamatória. A maior reação histopatológica à injeção foi a invasão fibroblástica (93,3%), indicando grande produção de colágeno.

De junho de 1980 a junho de 1985, 42 pacientes foram submetidos a angioplastias com implantes de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e ótimos resultados foram obtidos. Estudos histológicos feitos durante um período de 7 a 19 meses mostrou nenhuma deterioração da estrutura original. A infiltração de células fibróticas não se estendeu o suficiente para ser nociva e fibras elásticas foram relativamente preservadas, com alguma dissociação. Não foi detectada endotelização, infecção, trombose ou dilatação de aneurisma e concluíram com este estudo que o pericárdio bovino é boa alternativa como material de implante vascular (ARAUJO *et al.*, 1987).

A área da oftalmologia iniciou experimentos com o pericárdio bovino em algumas práticas cirúrgicas. Garcia Júnior *et al.* (2003) utilizaram o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído experimentalmente na reconstrução do assoalho orbitário de ratos. Foram utilizados 16 animais e em cada um realizou-se osteotomias em ambos os lados simulando clinicamente a perda do assoalho e rebordo orbitário. A cavidade do lado direito de cada animal recebeu um implante de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído enquanto que a cavidade do lado esquerdo não recebeu qualquer tipo de implante. Os animais foram sacrificados em períodos pós-operatórios diferenciados (5, 25 e 45 dias) e as peças foram removidas para análise histopatológica. Os autores observaram que os implantes de pericárdio bovino tratados com glutaraldeído não provocam reações agudas e que proporcionaram a resolução mais rápida do infiltrado inflamatório crônico e das áreas preenchidas por coágulo, favorecendo a proliferação conjuntiva rica em fibroblastos e fibras colágenas, a qual envolvia o tecido e se misturava ao implante.

Gallo *et al.* (1982) utilizou pericárdio bovino e suíno tratados com glutaraldeído no fechamento de defeitos diafragmáticos em 15 cães. Os animais foram reoperados em períodos diferenciados, entre 15 dias e 15 meses, e observaram a ausência de aderência entre os implantes heterólogos e as estruturas adjacentes em alguns cães exceto um, no qual o omento estava aderido ao pericárdio. Microscopicamente, a estrutura do implante permaneceu intacta sem invasão celular. Os implantes estavam cobertos com uma fina camada de tecido fibroso, mais intenso no caso de aderência de omento. Os autores não detectaram diferença macroscópica ou microscópica entre o pericárdio bovino e o suíno. Resultado semelhante foi encontrado por Santillán-Doherty *et al.* (1995) que, ao avaliarem a resistência da bioprótese de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e utilizada na reparação de parede da cavidade toraco-abdominal, observaram a formação de uma capa de fibroblastos sobre o implante e uma outra de colágeno por cima da própria camada de colágeno do pericárdio.

Em estudo realizado por Haddad Filho *et al.* (2004), no qual as reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de politetrafluoroetileno expandido em ratos foram comparadas, observaram, em um período de 30 dias, uma tendência ao encapsulamento do material, bem como a presença de processo inflamatório-reparacional, com neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, responsáveis por tal evolução, além da permeação destas células entre fibras pericárdicas. De acordo com Tang *et al.* (1995), esta formação de cápsula fibrosa ao redor dos implantes biológicos é considerada uma resposta “normal”, no entanto, esta resposta do organismo pode ser problemática quando a cápsula fibrosa começa a contrair ao redor do implante.

Em 2002, Gamba *et al.* utilizou diafragmas de coelhos machos, tratados para a obtenção de matrizes acelulares, em um reparo experimental de defeitos de parede abdominal. Estas foram implantadas em coelhos, os quais foram divididos em grupos por períodos de sacrifício diferentes (9, 40 e 90) e, após, os implantes foram coletados para análise microscópica. Os implantes com 9 dias de pós-operatório revelaram resposta inflamatória aguda na borda entre o implante e o tecido nativo e infiltração de granulócitos e macrófagos. Decréscimo de fibroblastos foi observado na periferia e fibras colágenas foram observadas em algumas áreas da matriz. Contudo, a área central do implante estava completamente sem células. Os implantes estavam cobertos por uma cápsula fibrosa formada por fibroblastos e colágeno, e ocasionalmente foram observados abaixo da cápsula.

Em pesquisa realizada (PIRES *et al.*, 1997) com pericárdio bovino, tratado com glutaraldeído, utilizado como remendo em sistema cardiovascular, não foi evidenciada a presença de tecido fibroso nos retalhos implantados que tiveram contato direto com o sangue,

o que sugere que o tecido fibroso tem sua origem da organização fibrosa de elementos sangüíneos depositados sobre a superfície lisa do retalho. Isto indica que o comportamento do pericárdio bovino parece sofrer influência do local de implante e do direto contato com o sangue. De acordo com os autores, o perfeito tratamento torna o pericárdio bovino alheio aos fenômenos da resposta ao implante de um tecido vivo e, assim, o retalho desencadeia uma cicatrização, que ocorre na superfície sem comprometer, entretanto, sua estrutura. Este tecido de cicatrização, juntamente com o retalho, constituem o remendo cirúrgico e este sim está sujeito a degeneração própria dos tecidos biológicos como, por exemplo, a calcificação.

Outras complicações já foram observadas devido a citotoxicidade do glutaraldeído, como por exemplo a destruição do enxerto. Silvaes (1990) quando empregou o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído na reconstrução do tendão calcâneo em ratos observou edema, severa resposta inflamatória local com exudação de neutrófilos e fibrina, havendo hialinização e fragmentação de fibras conjuntivas do pericárdio, fenômeno este que o autor denominou “necrose do enxerto”. Segundo o autor, a partir da sexta semana de pós-operatório, pouco ou nenhum resquício de enxerto foi encontrado, observando-se, ainda nesse tempo, sinais de metaplasia cartilaginosa, que por volta da nona semana deu lugar a vários focos de metaplasia óssea, acentuada a partir da décima semana.

Complicações locais adversas podem ocorrer na presença de qualquer implante, mas estudos (HENCH, 1998) mostram que os materiais biológicos adaptam-se mais facilmente como implantes e funcionam não só como arcabouços para migração de fibroblastos, mas também como sinalizadores celulares, proporcionando, muitas vezes, não o crescimento de tecido cicatricial e sim de tecido regenerado, apresentando assim uma grande vantagem sobre os implantes não-biológicos.

2. METODOLOGIA

Esta pesquisa multidisciplinar envolveu duas áreas da Medicina Veterinária, a cirúrgica e a de anatomia patológica, de forma que juntas possibilitaram uma melhor análise da solução em questão.

2.1 Obtenção e Limpeza da Membrana Biológica

Os pericárdios bovinos foram obtidos de animais abatidos em matadouro de Fiscalização Estadual na cidade de Três Rios – RJ, tendo sido efetuadas seis visitas com uma coleta total de 18 pericárdios. Para a conservação e transporte do material, foram utilizados uma embalagem plástica nova e um recipiente térmico com gelo, o qual permitiu que os pericárdios permanecessem em temperatura de 10°C aproximadamente até a chegada ao laboratório. Em prosseguimento, foi realizada a limpeza pericárdica, retirando-se a gordura para que o seu tratamento e conservação fossem iniciados.

2.2 Preparação das Soluções de Glutaraldeído e Glicerina

As soluções em questão foram preparadas em laboratório do Departamento de Clínica e Cirurgia da UFRRJ. Inicialmente preparou-se uma solução PBS, composta por fosfato monopotássico, fosfato dissódico, cloreto de sódio e água destilada, que em seguida foi utilizada para a preparação e tamponamento das soluções de glutaraldeído 0,625%, 1% e 1,5%. A obtenção das concentrações de todas as soluções foi através de volume por volume e o pH final de todas foi de 7,2 (TRANI, 2006). Utilizou-se a solução de glicerina comercializada na concentração 98%, que, assim como as soluções de glutaraldeído, foi armazenada em frascos estéreis os quais continham 70ml das soluções cada.

2.3 Tratamento e Conservação dos Pericárdios Bovinos

Os pericárdios bovinos, após a limpeza, foram fracionados em partes com áreas equivalentes a (10X10) mm (FIGURA 1A) e, em seguida, cada frasco de solução recebeu o equivalente a cinco fragmentos para que o processo de tratamento iniciasse. Os fragmentos em glicerina permaneceram neste processo por 30 dias e os em glutaraldeído por 18 dias (GOISSIS, 1999), sendo que todos permaneceram armazenados em temperatura ambiente, sob proteção da luz (FIGURA 1B) e tinham contato uns com os outros dentro dos frascos.

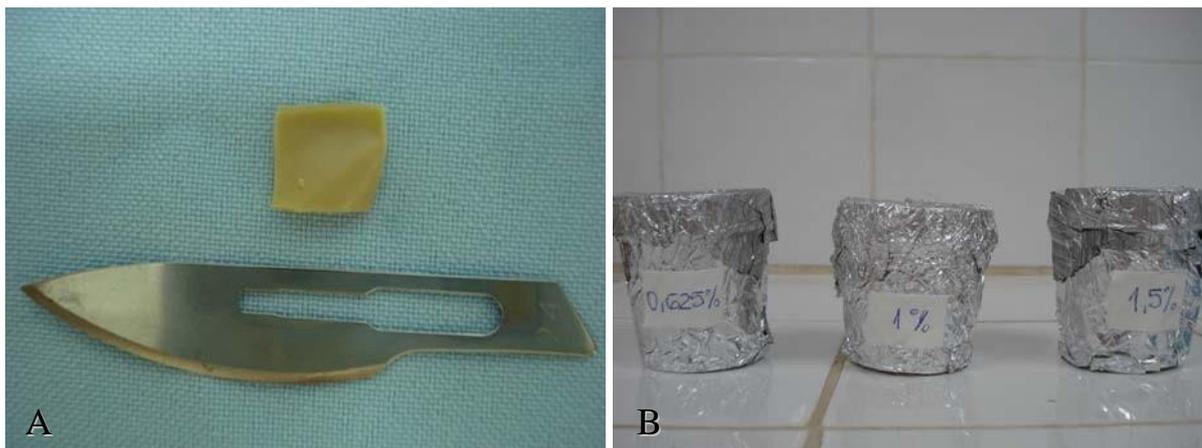


FIGURA 1: (A) fragmento de pericárdio bovino após tratamento de 18 dias com solução de glutaraldeído na concentração de 1,5%. (B) frascos com solução de glutaraldeído cobertos com folha de alumínio para proteção da luz.

2.4 Amostragem dos Animais

Foram utilizados 60 camundongos machos, jovens, albinos, suíços com peso entre 20 – 25g, procedentes do Biotério do Laboratório de Coccidioses do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos isolados em caixas de aço inoxidável em sala com piso e refrigeração adequada, onde receberam água mineral e ração seca sem restrições.

Foram formados 12 grupos, sendo que cada grupo era constituído por 5 camundongos.

Grupo 1 (grupo controle): camundongos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram sacrificados com 7 dias;

Grupo 2 (grupo controle): camundongos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram sacrificados com 14 dias;

Grupo 3 (grupo controle): camundongos que receberam implantes conservados com glicerina a 98% e foram sacrificados com 30 dias;

Grupo 4: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 0,625% e foram sacrificados com 7 dias;

Grupo 5: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 0,625% e foram sacrificados com 14 dias;

Grupo 6: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 0,625% e foram sacrificados com 30 dias;

Grupo 7: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1% e foram sacrificados com 7 dias;

Grupo 8: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1% e foram sacrificados com 14 dias;

Grupo 9: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1% e foram sacrificados com 30 dias;

Grupo 10: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1,5% e foram sacrificados com 7 dias;

Grupo 11: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1,5% e foram sacrificados com 14 dias;

Grupo 12: camundongos que receberam implantes conservados com glutaraldeído 1,5% e foram sacrificados com 30 dias;

2.5 Procedimentos Pré, Trans e Pós-Cirúrgicos

Os pericárdios foram retirados dos frascos e lavados com solução salina estéril (cloreto de sódio a 0,9%) para a retirada do máximo de solução presente em sua superfície (PINTO *et al.*, 1993). Foram efetuadas três lavagens nos fragmentos tratados com glicerina (PINTO *et al.*, 1993) e oito lavagens nos que foram tratados com glutaraldeído (PINTO *et al.*, 1993; HADDAD FILHO *et al.*, 2004). Cada lavagem era efetuada com 10 ml da solução salina, após a última lavagem, os fragmentos permaneciam nesta por 30 minutos. Os camundongos, que se encontravam em jejum de 12 horas, foram pré-anestesiados, via intraperitoneal, com diazepam (5mg/Kg) (PAIVA, 2005) e anestesiados com xilazina (15mg/kg) e quetamina (150mg/kg), através da mesma via (PLUNKETT, 2006). Em seguida, foram tricotomizados, receberam, via intramuscular, 0,05 ml de pentabiótico (Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Diidroestreptomicina base, Estreptomicina base) e, via subcutânea, cloridrato de tramadol (7mg/kg) (PLUNKETT, 2006) para a analgesia transoperatória e efetuou-se a assepsia do local da incisão no animal.

Uma incisão de 1,5cm, sentido dorso-ventral, foi realizada na pele da região abdominal esquerda. Em seguida realizou-se a fixação de pontos de reparo com fio Nylon 5-0 no músculo oblíquo externo (FIGURA 2), para a qual foi utilizado um molde de 0,25cm² que permitiu o delineamento da área muscular a ser incisada. Devido a indefinição dos limites de cada músculo abdominal, o fragmento muscular retirado em cada camundongo abrangia o músculo oblíquo externo, além do músculo oblíquo interno e do músculo transverso abdominal (FIGURA 3).

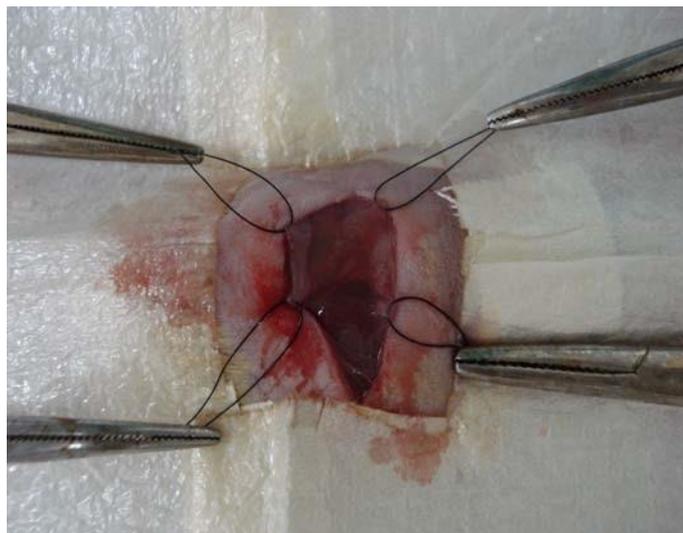


FIGURA 2: animal do grupo 10 com incisão na pele e pontos de reparo com fio Nylon 5-0 fixados na musculatura delimitando a área que será incisada.

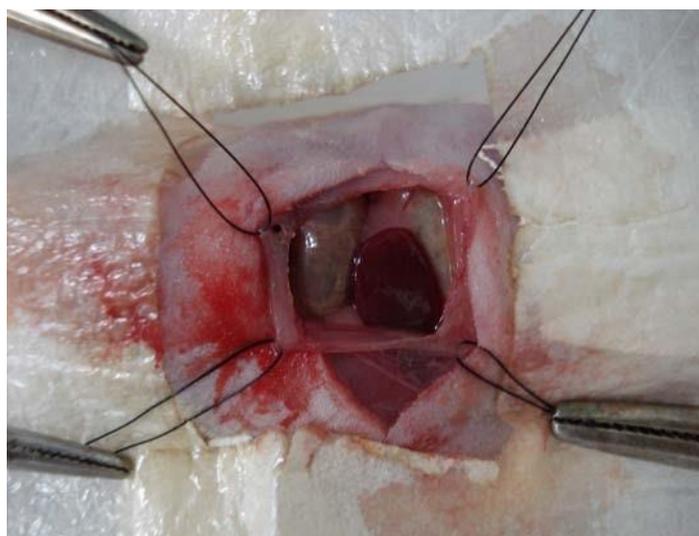


FIGURA 3: animal do grupo 9 com pontos de reparo delimitando as bordas da área após incisão e retirada do fragmento muscular.

No mesmo local da retirada de fragmento muscular, foi implantado um fragmento de pericárdio tratado de 1cm² com a face lisa voltada para o interior da cavidade (HADDAD FILHO *et al.*, 2004) (FIGURA 4), o qual foi fixado com fio Nylon 5-0 efetuando-se quatro suturas descontínuas simples em cada lateral do implante, além de um ponto simples em cada ponta (FIGURA 5).



FIGURA 4: animal do grupo 10 com suturas das bordas do fragmento do pericárdio bovino conservado em glutaraldeído com a face lisa do implante voltada para o interior da cavidade abdominal.

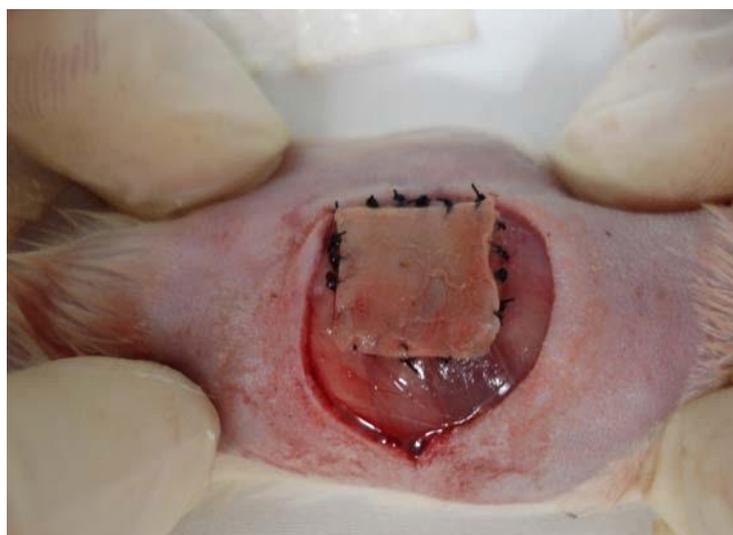


FIGURA 5: animal do grupo 10 após fixação do fragmento de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído à musculatura com sutura simples descontínua.

A pele foi suturada da mesma forma e com o mesmo tipo de fio. Ao final do procedimento cirúrgico os animais tinham a ferida cirúrgica limpa e coberta com esparadrapo antialérgico. Não foi utilizado medicamento cicatrizante para eliminar uma possível interferência no processo inflamatório que foi analisado posteriormente.

Cada animal, no pós-operatório, recebeu mais duas doses de pentabiótico (Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Diidroestreptomicina base, Estreptomicina base), via intramuscular, sendo cada uma administrada com um intervalo de 48 horas, e nenhuma administração de anti-inflamatório foi efetuada. Os camundongos tiveram suas caixas trocadas uma vez por semana e, após cada troca, as caixas eram lavadas com cloro, secas e forradas com maravalha limpa e autoclavada para, assim, evitar qualquer fonte de contaminação da ferida. A água e a ração eram fornecidas sem restrições.

2.6 Coleta e Análise Macroscópica das Amostras Teciduais

Cada grupo foi avaliado em períodos pós-operatórios diferentes correspondentes a 7, 14 e 30 dias, para desta forma conseguir-se observar a reação inflamatória aguda e a crônica. Os animais tiveram as suas feridas cirúrgicas e cicatrizes avaliadas e fotografadas e em seguida foram sacrificados com quetamina (450mg/Kg) e xilazina (45mg/Kg) (PAIVA, 2005) via intraperitoneal (LUNA *et al.*, 2007), de acordo com as normas da Comissão de Ética, Bioética e Bem Estar Animal (CEBEA) do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Iniciada a necropsia, coletou-se de cada animal o fragmento implantado e o do tecido natural do animal que estava ao seu redor. A necropsia foi realizada a partir da cicatriz existente pela cirurgia. As cicatrizes, assim como os fragmentos implantados, as aderências de vísceras e omento, e as alterações do tecido natural, foram fotografados. O material coletado também passou por uma análise macroscópica, foi conservado em formol 10%, recebeu a devida identificação e, em seguida, foi encaminhado ao laboratório para uma análise histopatológica. Todas as carcaças, assim como os animais que vieram a óbito durante o experimento, foram encaminhadas para cremação.

2.7 Processamento e Análise Microscópica das Amostras Teciduais

As 60 amostras teciduais, devidamente conservadas, fixadas e identificadas, foram desidratadas, diafanizadas e embebidas em parafina no laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os blocos com as amostras foram encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Católica Dom Bosco de Campo Grande-MS (UCDB) onde foram seccionados em micrótomo, a 5 micrômetros de espessura, e corados com Hematoxilina-

Eosina, além das colorações especiais, Giemsa de Lennert para estudo das células inflamatórias, Tricrômio de Masson para a análise do tecido conjuntivo e muscular (conforme protocolos em anexo). As lâminas histológicas foram observadas à microscopia de luz e fotografadas pelo sistema de captura de imagens.

Os padrões inflamatórios foram classificados de acordo com a intensidade da reação inflamatória em: 1) leve (até 5 células inflamatórias por campo), 2) moderado (de 5 a 10 células inflamatórias por campo) e 3) intenso (mais de 10 células inflamatórias por campo). Em relação ao tipo celular predominante em: 1) mononuclear (presença de células mononucleares predominantemente macrófagos e linfócitos); 2) misto (infiltrado contendo uma variabilidade de células inflamatórias incluindo macrófagos, linfócitos, e polimorfonucleares). As alterações nas fibras musculares foram classificadas de forma semelhante relação à intensidade em: 1) leve (até 5 fibras musculares alteradas por campo), 2) moderado (5 a 10 fibras musculares alteradas por campo) e 3) intenso (mais de 10 fibras alteradas por campo), sendo as alterações definidas como fibras musculares apresentando os processos de: a) degeneração, b) necrose, c) calcificação distrófica e d) regeneração.

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação Clínica dos Animais no Pós-operatório

Durante o pós-operatório, os animais foram avaliados clinicamente e todos apresentaram ganho de peso, não ocorrendo redução das atividades físicas, da ingestão de água e ração, da eliminação de fezes e urina. Ao longo de todo o experimento, seis animais apresentaram um retardo na cicatrização da pele devido à deiscência de alguns pontos de sutura provocada pelo próprio animal, sendo todas corrigidas devidamente. Somente um camundongo apresentou um processo infeccioso local, o qual foi devidamente tratado com pentabiótico veterinário. Em relação aos implantes, nenhum animal apresentou processo de rejeição.

Durante todo experimento, 12 animais vieram a óbito, sendo que destes, 10 foram durante o procedimento anestésico e 2 foram dentro das primeiras 24 horas de pós-cirúrgico. Entretanto, não se evidenciou nenhuma razão ou evidência de que estes óbitos tenham sido provocados pelo material de implante utilizado, obtendo-se como justificativa as características metabólicas e fisiológicas de cada indivíduo separadamente e, portanto, todos esses animais citados foram substituídos.

3.2 Análise Macroscópica

Durante a necropsia de cada grupo, a área de implante em cada animal foi avaliada e fotografada e as principais alterações macroscópicas de cada período foram identificadas. Os resultados foram dispostos em tabela para melhor visualização.

3.2.1 Grupos de animais com implantes conservados em Glicerina 98%

Os animais que receberam pericárdio bovino conservados em glicerina apresentaram resultados macroscópicos em uma seqüência lógica dos acontecimentos da reação inflamatória reparacional (TABELA 1).

TABELA 1: Resultados da análise macroscópica dos animais dos grupos que receberam pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e suas respectivas freqüências dentro do grupo em questão.

ALTERAÇÕES	PERÍODOS		
	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS
Perda do formato original do implante	2	2	4
Área avermelhada ao redor do implante	5	-	-
Áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura do implante	3	3	1
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura	-	5	4
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre o implante	-	4	4
Aderência de subcutâneo ao implante	-	-	-
Aderência de omento ao implante	5	5	4
Aderência de órgãos ao implante	4	1	3
Neovascularização	-	2	5
Formação de crosta na ferida cirúrgica (pele)	4	2	-
Cicatrização completa (pele)	-	4	5

Determinados eventos como a cicatrização completa da pele, perda do formato original do implante (FIGURA 6), a neovascularização e a sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos e o implante, aumentaram com o passar dos períodos, enquanto que a presença de área avermelhada ao redor do implante e seus pontos reduziu.

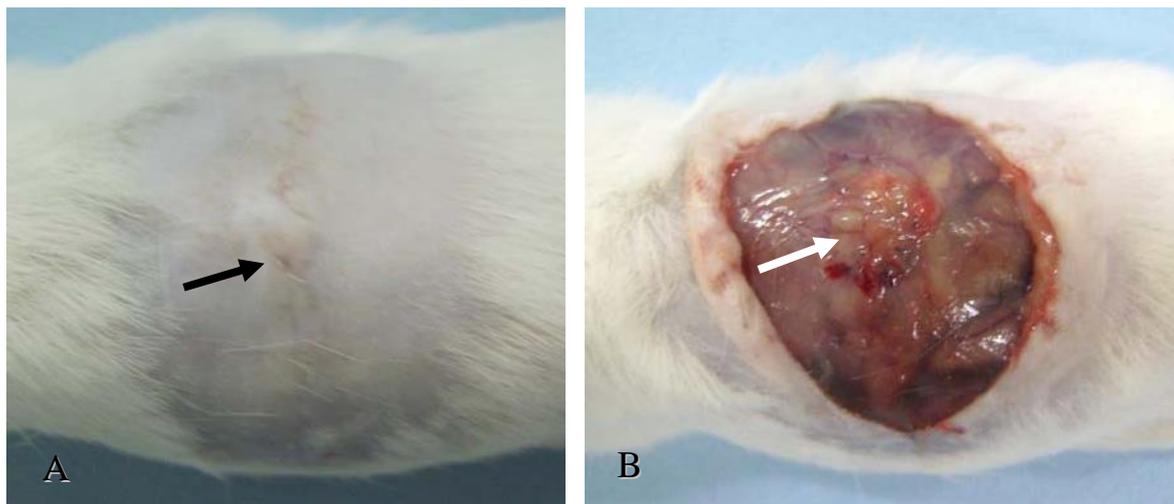


FIGURA 6: animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 30 dias (grupo 3). (A) cicatrização completa da pele (seta preta). (B) pericárdio bovino com total perda do formato original e início de incorporação (seta branca).

Resultado que se destacou também foi a alta frequência da aderência do omento, a qual se mostrou presente desde o menor período de avaliação (FIGURA 7A). Observou-se lesão inflamatória com formação de crosta ao lado da ferida cirúrgica em um único animal do grupo III, sendo que o mesmo a provocou. Este mesmo animal se destacou também por apresentar uma intensa sobreposição de tecido conjuntivo nos pontos e no implante (FIGURA 7B).



FIGURA 7: (A) animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 7 dias (grupo 1) - leve aderência de omento (seta preta). (B) animal implantado com pericárdio bovino tratado com glicerina 98% e avaliado com 14 dias (grupo 2) - sobreposição de tecido conjuntivo sobre pontos e implante e lesão inflamatória com casca ao lado da ferida cirúrgica (seta branca).

3.2.2 Grupos de animais com implantes conservado em Glutaraldeído 0,625%

A perda do formato original do implante foi visualizada em poucos animais e em sua maioria nos respectivos ao período de 30 dias. A sobreposição de tecido conjuntivo só esteve presente a partir do período de 14 dias e a presença de áreas hiperêmicas ao redor dos pontos do implante foram visualizadas até o período de 14 dias (FIGURA 8).

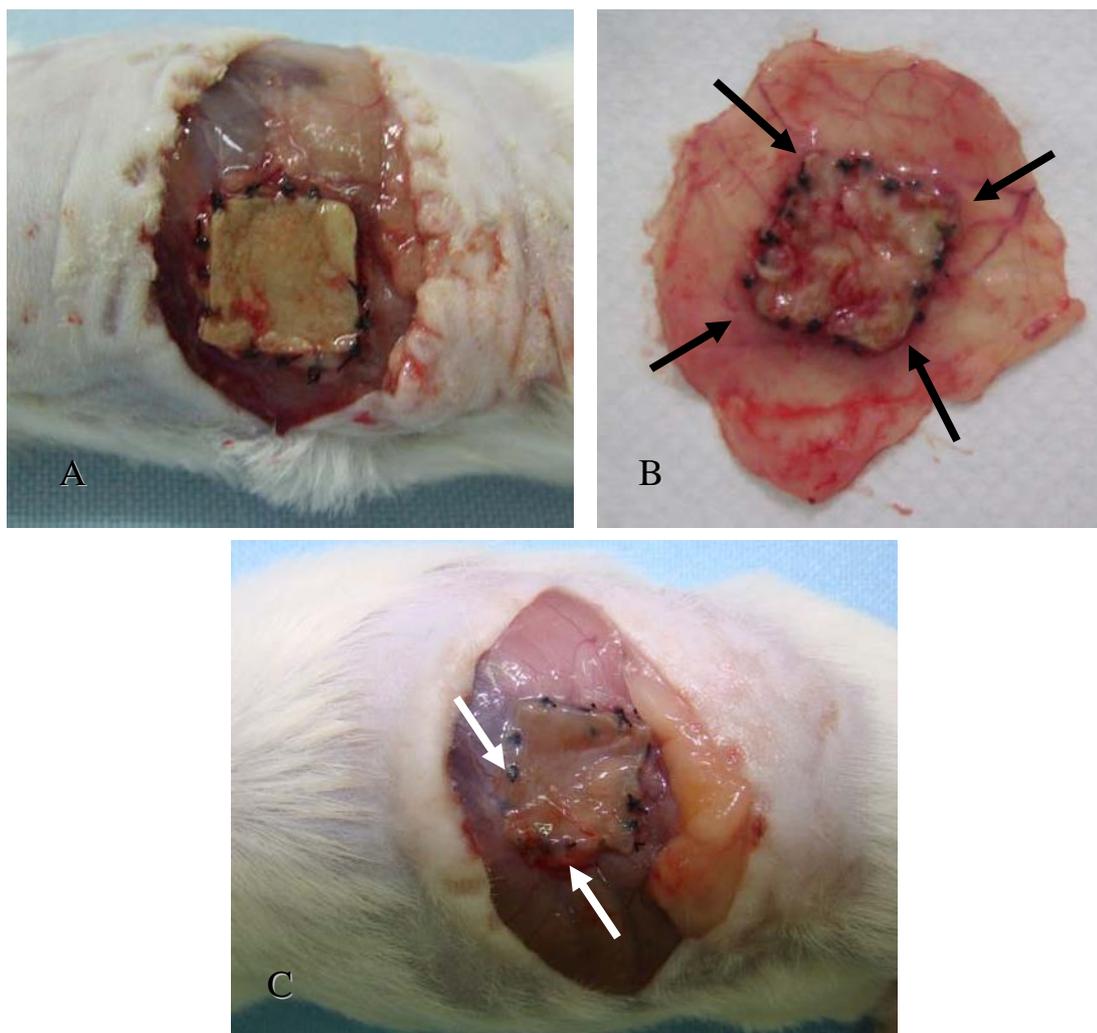


FIGURA 8: (A) animal do grupo 4 (implante conservado em glutaraldeído 0,625% e coletado com 7 dias) com implante apresentando formato original, ausência de sobreposição de tecido conjuntivo e presença de áreas hiperêmicas ao redor dos pontos; (B) fragmento coletado com 14 dias com parte do tecido natural e implante de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% (grupo 5), notar a permanência do formato original do implante (setas pretas); (C) animal com implante conservado em glutaraldeído 0,625% e avaliado com 30 dias (grupo 6), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo nos pontos e em parte do implante (setas brancas).

Os grupos 4, 5 e 6, apresentaram macroscopicamente bons resultados, os quais foram proporcionalmente semelhantes aos dos grupos de animais que receberam implantes tratados com glicerina (TABELA 2).

TABELA 2: Principais alterações macroscópicas observadas nos animais dos grupos que receberam pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 0,625% e suas respectivas frequências dentro do grupo em questão.

ALTERAÇÕES	PERÍODOS		
	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS
Perda do formato original do implante	-	-	3
Área avermelhada ao redor do implante	5	-	1
Áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura do implante	5	5	-
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura	-	2	3
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre o implante	-	2	3
Aderência de subcutâneo ao implante	-	2	-
Aderência de omento ao implante	3	5	5
Aderência de órgãos ao implante	2	2	2
Neovascularização	-	3	2
Formação de crosta na ferida cirúrgica (pele)	1	1	-
Cicatrização completa (pele)	-	3	3

3.2.3 Grupos de animais com implantes conservado em Glutaraldeído 1,0%

Os grupos 7, 8 e 9, apresentaram macroscopicamente resultados que caracterizaram um processo inflamatório de cronicidade maior quando comparado com o grupos que receberam pericárdios tratados com glicerina e glutaraldeído 0,625%, embora tenham apresentado resultados sequenciais quando analisados dentro dos períodos (TABELA 3).

TABELA 3: Principais alterações macroscópicas observadas nos animais dos grupos que receberam pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,0% e suas respectivas freqüências dentro do grupo em questão.

ALTERAÇÕES	PERÍODOS		
	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS
Perda do formato original do implante	1	2	3
Área avermelhada ao redor do implante	4	1	1
Áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura do implante	5	5	2
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura	-	2	4
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre o implante	-	2	4
Aderência de subcutâneo ao implante	-	-	-
Aderência de omento ao implante	5	5	4
Aderência de órgãos ao implante	1	2	2
Neovascularização	-	3	2
Formação de crosta na ferida cirúrgica (pele)	2	1	-
Cicatrização completa (pele)	-	3	3

Dentre os resultados observados nestes grupos de animais, destaca-se a sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura e implantes, a qual foi observada de forma crescente ao longo dos grupos, embora não tenha sido observada de forma intensa nos animais individualmente e a neovascularização bem evidente macroscopicamente nos animais que a apresentaram. (FIGURA 9).

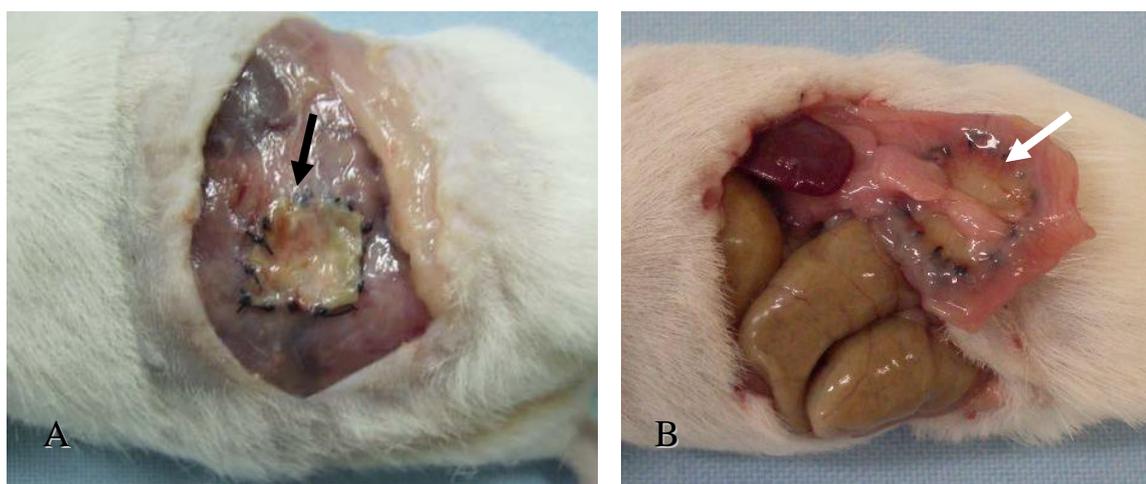


FIGURA 9: animais com implante de pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,0%: (A) animal avaliado com 30 dias (grupo 9), notar leve sobreposição de tecido conjuntivo sobre alguns pontos de sutura e parte do implante (seta preta). (B) animal avaliado com 14 dias (grupo 8), notar neovascularização próxima aos pontos de sutura (seta branca).

3.2.4 Grupos de animais com implantes conservado em Glutaraldeído 1,5%

A perda de formato original do implante esteve ausente nos animais que receberam implantes conservados na maior concentração de glutaraldeído e foram avaliados nos períodos de 7, 14 e 30 dias. A persistência de áreas hiperêmicas ao redor dos pontos esteve presente até o maior período de avaliação. (FIGURA 10A, B e C).

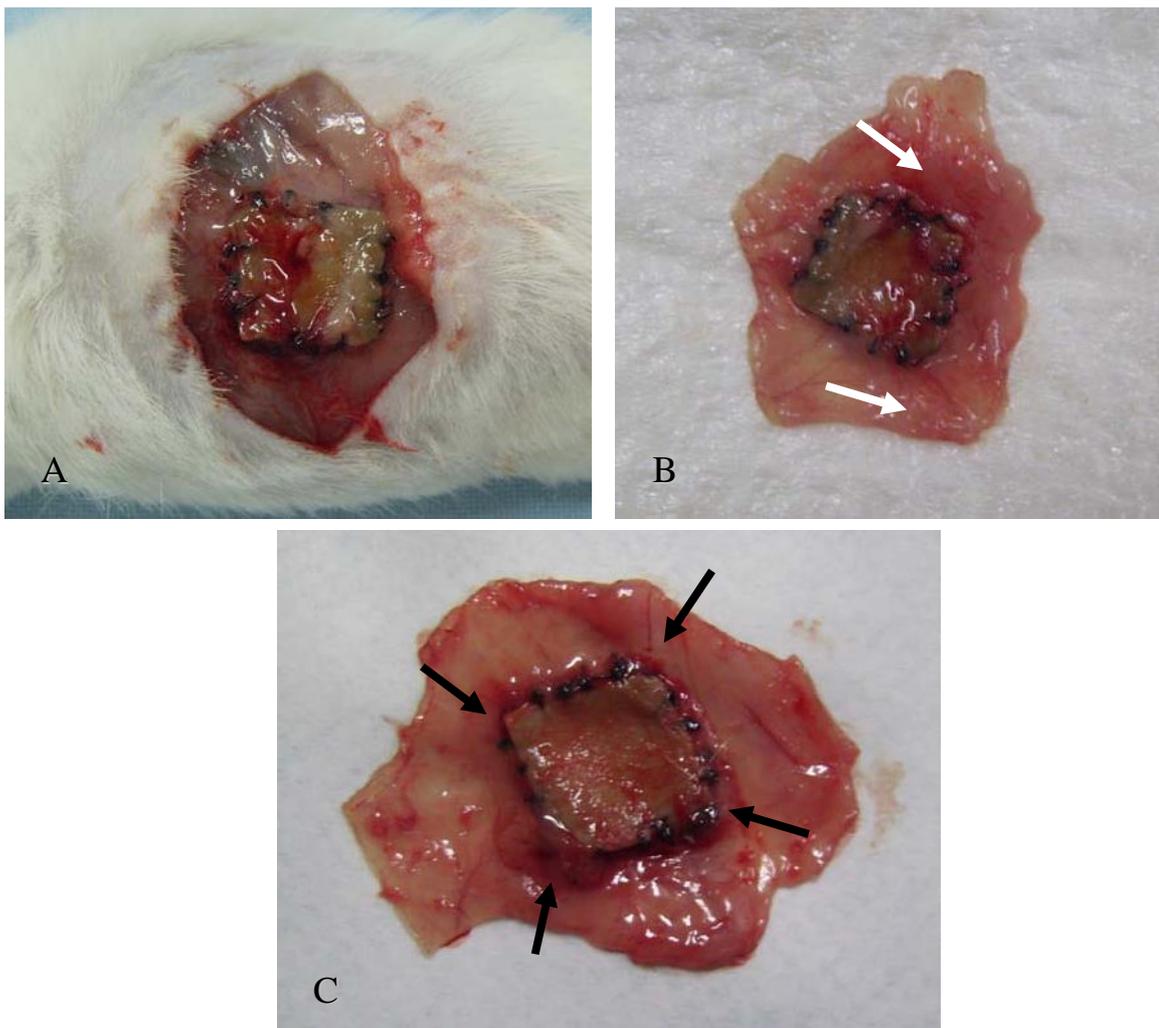


FIGURA 10: (A) animal com implante conservado em glutaraldeído a 1,5% mantendo formato original quando avaliado aos 30 dias (grupo 12). (B) implante conservado em glutaraldeído a 1,5% apresentando formato original e áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura (setas brancas) com parte de tecido natural (músculo) em animal avaliado com 30 dias (grupo 12). (C) implante conservado em glutaraldeído a 1,5% apresentando formato original e áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura e do implante (setas pretas) com parte de tecido natural (músculo) de animal avaliado com 7 dias (grupo 10).

Analisando macroscopicamente os grupos 10, 11 e 12, observou-se também a presença tardia de outros eventos: a neovascularização e a redução da presença de áreas hiperêmicas ao redor do implante e seus pontos (TABELA 4).

TABELA 4: Principais alterações macroscópicas observadas nos animais dos grupos que receberam pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 1,5% e suas respectivas frequências dentro do grupo em questão.

ALTERAÇÕES	PERÍODOS		
	7 DIAS	14 DIAS	30 DIAS
Perda do formato original do implante	-	-	1
Área avermelhada ao redor do implante	5	5	-
Áreas hiperêmicas ao redor dos pontos de sutura do implante	5	3	2
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre os pontos de sutura	1	3	1
Sobreposição de tecido conjuntivo sobre o implante	-	3	1
Aderência de subcutâneo ao implante	3	2	-
Aderência de omento ao implante	3	4	5
Aderência de órgãos ao implante	-	2	4
Neovascularização	-	-	4
Formação de crosta na ferida cirúrgica (pele)	3	2	-
Cicatrização completa (pele)	-	3	4

3.3 Análise Microscópica por Grupos

3.3.1 Grupos de animais com implantes conservados em Glicerina 98%

Os animais sacrificados com 7 dias apresentaram reação inflamatória moderada a intensa (FIGURA 11A), com predominância de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e localizava-se entre o implante e o músculo, não ocorrendo infiltração de células inflamatórias no pericárdio bovino. Em relação ao processo de reparação, pode-se observar a presença de angiogênese e fibroplasia moderadas, fibrose leve, além de necrose e regeneração muscular moderadas (FIGURA 11B e 11C). Somente um animal apresentou calcificação, sendo esta leve.

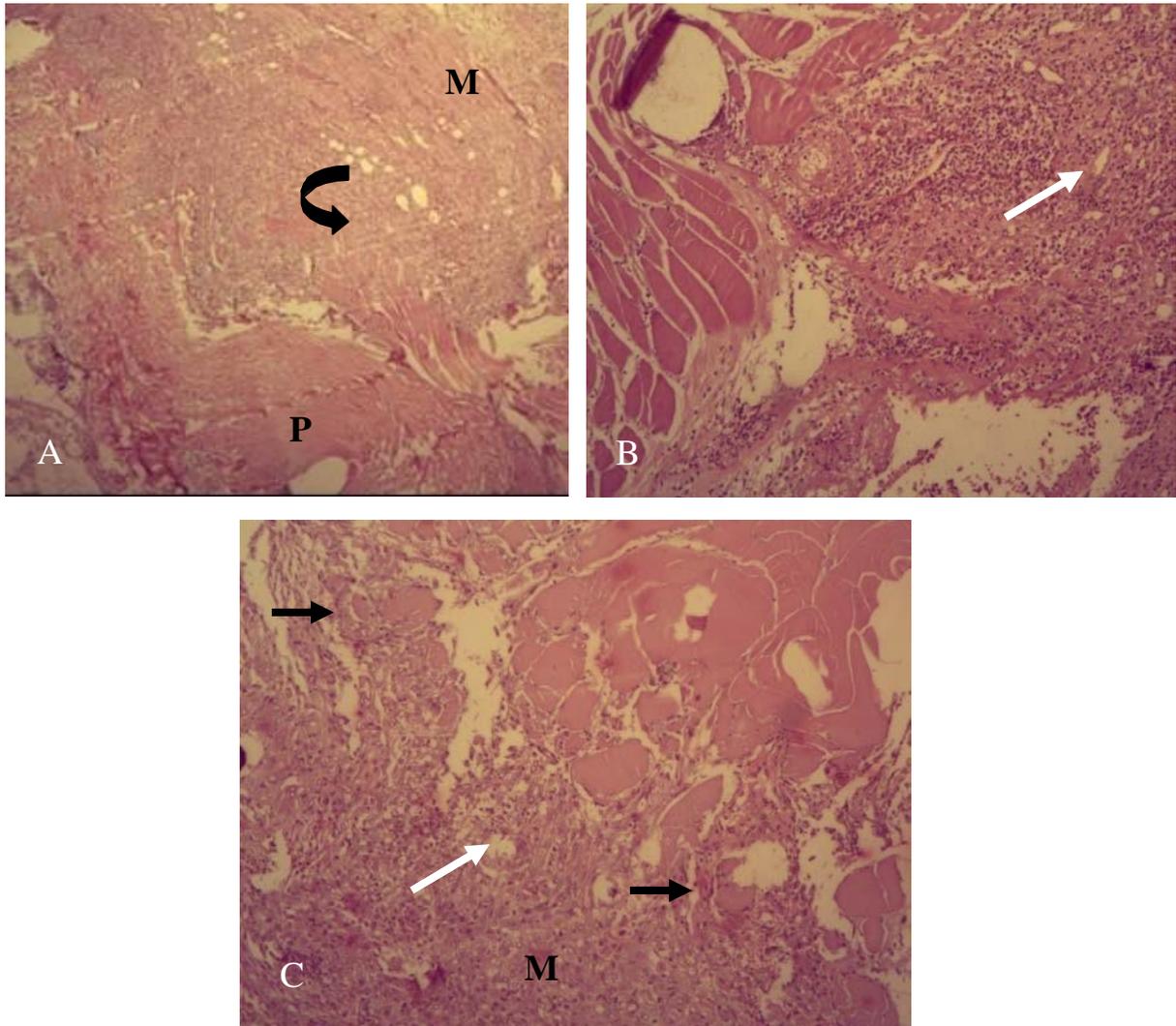


FIGURA 11: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 7 dias (grupo 1). (A) reação inflamatória intensa (seta curvada) entre pericárdio (P) e a musculatura (M) (Giemsa de Lennert - 4X de acordo com o original), (B) e (C) angiogênese intensa (seta branca), necrose de fibras musculares e regeneração muscular moderada (setas pretas) - (HE - 10X de acordo com o original).

O grupo de animais que foi analisado aos 14 dias apresentou reação inflamatória moderada, a qual se localizava no implante e no músculo ao seu redor e teve predominância de neutrófilo, macrófago, linfócito e células gigantes. No processo reparatório a angiogênese foi intensa, fibroplasia e fibrose moderadas, com encapsulamento do implante (pericárdio bovino), necrose e regeneração muscular leves. Somente dois animais apresentaram calcificação, sendo esta observada de forma leve (FIGURA 12).

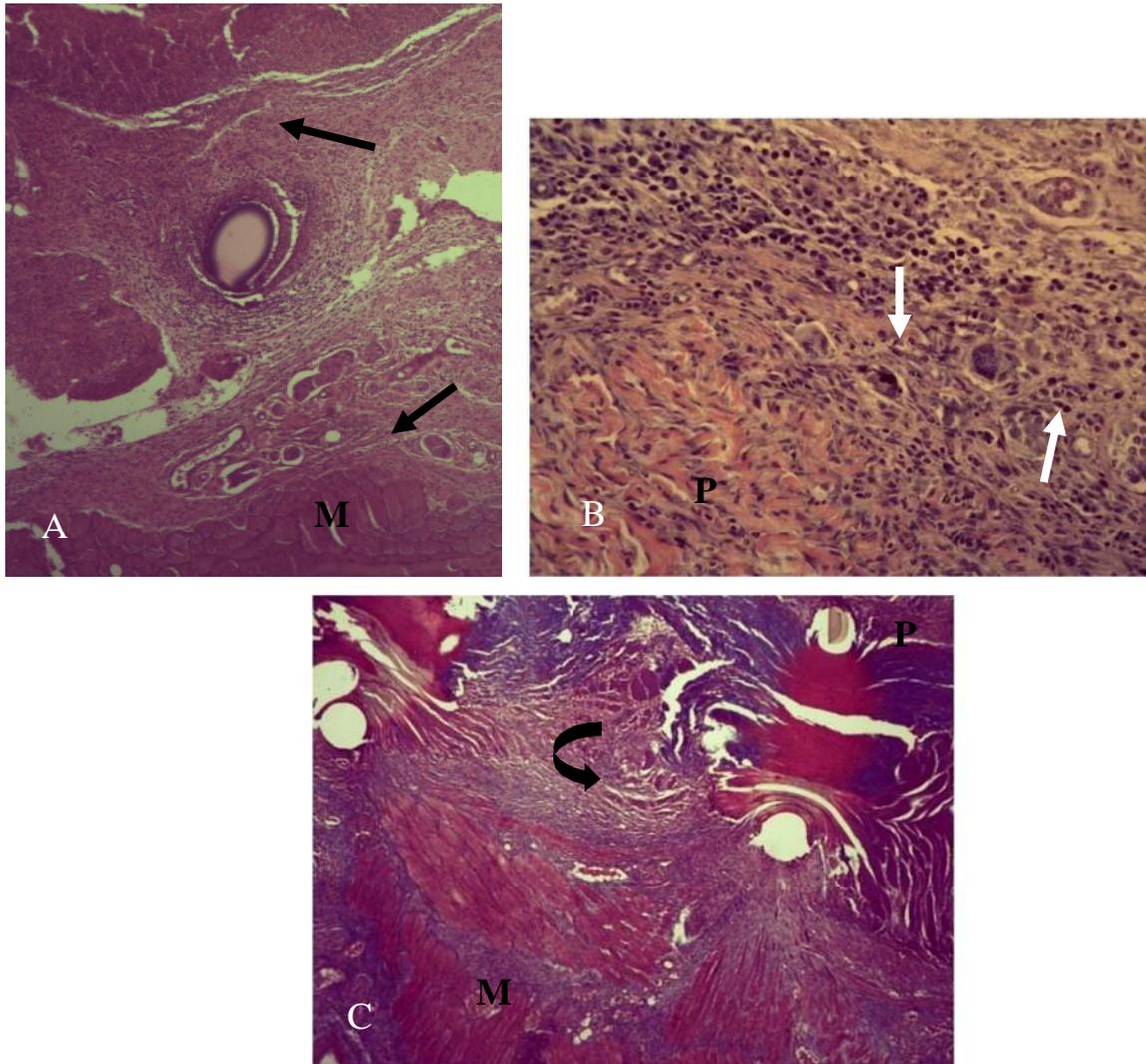


FIGURA 12: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 14 dias (grupo 2). (A) nota-se reação e fibroplasia entre o implante (P) e o tecido muscular (setas pretas) (HE – 4x de acordo com o original). (B) reação inflamatória moderada ao redor e no interior do pericárdio (P) com neutrófilos, macrófagos, células gigantes (setas brancas) (Giemsa de Lennert – 10x de acordo com o original). (C) faixa de tecido conjuntivo integrando o implante (acima) à musculatura (abaixo) e ao redor dos fios de sutura (seta curva) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com o original).

Nos animais analisados aos 30 dias a área de implante apresentou reação inflamatória de moderada (FIGURA 13A) a intensa com predominância de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes. A reação se localizou no implante e no músculo adjacente e no processo de reparação (FIGURA 13B) observou-se angiogênese e fibroplasia de moderadas a intensas e necrose moderada, a qual foi presenciada em somente dois animais. Ocorreu ainda encapsulamento do implante, leve regeneração (FIGURA 13A), ausência de calcificação distrófica e preservação da fibra muscular.

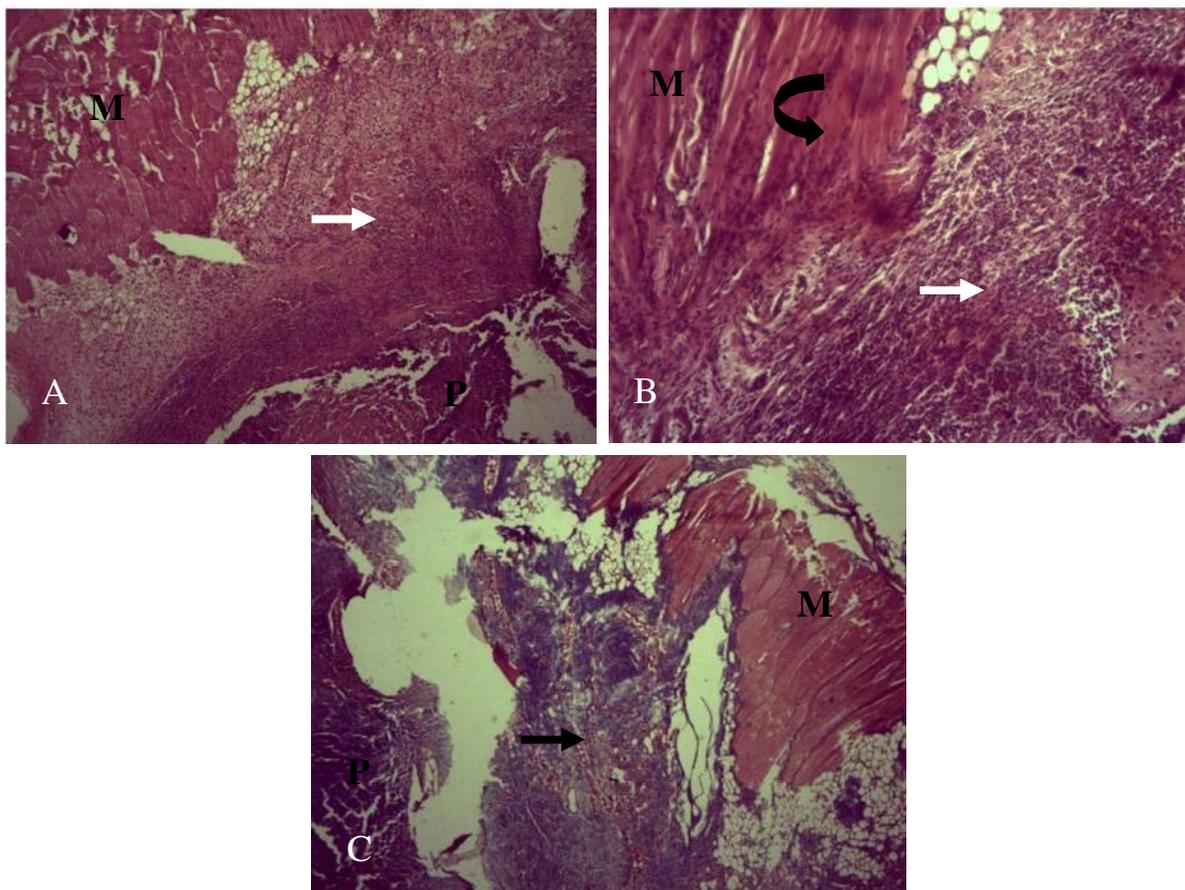


FIGURA 13: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% e avaliado com 30 dias (grupo 3). (A) e (B) reação inflamatória e fibrose (setas brancas) moderadas entre o implante (P) e tecido muscular (M) e regeneração muscular (seta curva) (HE – 4x e 10x, respectivamente, de acordo com o original). (C) faixa mais espessa de tecido conjuntivo (seta preta) integrando o pericárdio (P) ao músculo (M) (à direita) e ao redor dos fios de sutura. (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com o original).

3.3.2 Grupos de animais com implantes conservados em Glutaraldeído 0,625%

Nos animais analisados aos 7 dias observou-se reação inflamatória moderada localizada no músculo adjacente ao implante com predominância de neutrófilos, macrófagos e leve infiltração de linfócitos e plasmócitos. A reação foi considerada branda e no processo de reparação observou-se regeneração muscular moderada, fibrose leve, angiogênese e fibroplasia intensa, necrose moderada e calcificação distrófica de leve a moderada (FIGURA 14A e 14B), a qual esteve presente em três animais.

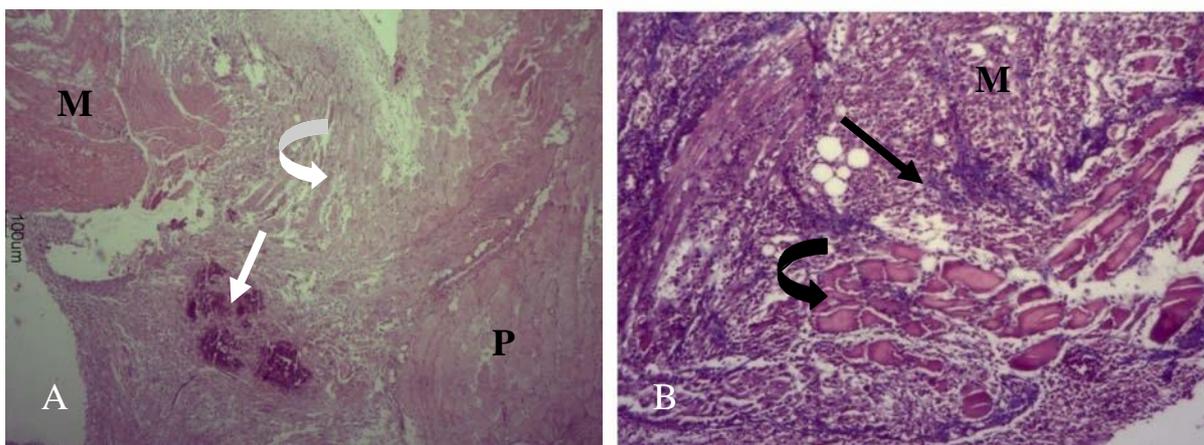


FIGURA 14: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% avaliado com 7 dias (grupo 4). (A) nota-se a fibroplasia entre o implante (P) e o tecido muscular (M) (seta curva branca), fibras musculares necróticas e área de calcificação distrófica (seta branca). (Giemsa de Lennert, 4X de acordo com o original). (B) moderada reação inflamatória entre as fibras musculares (M) (seta preta) e necrose de fibras musculares (seta curva preta) (Tricrômico de Masson, 10X de acordo com o original).

Após 14 dias, os animais respectivos a este grupo, apresentaram reação inflamatória de moderada a intensa (FIGURA 15A) localizada no implante e ao seu redor com predominância de neutrófilos e macrófagos e leve infiltração de eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes. O processo de reparação caracterizou-se por ausência de necrose, leve regeneração muscular, angiogênese e fibroplasia intensas (FIGURA 15B), fibrose moderada, sendo que somente um animal apresentou-a leve, e leve calcificação distróficaem somente um animal.

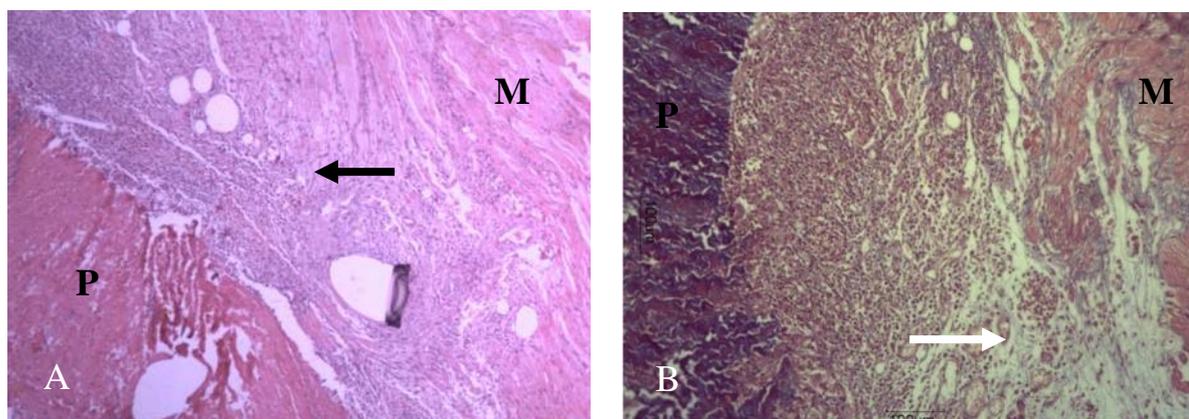


FIGURA 15: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% avaliado com 14 dias (grupo 5). (A) reação inflamatória e fibroplasia intensas entre o implante (P) e o tecido muscular (M), regeneração muscular (seta preta) (HE, 4x de acordo com a original). (B) angiogênese e fibroplasia intensas (seta branca). (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original)

Os animais sacrificados com 30 dias apresentaram reação inflamatória moderada a intensa localizada sobre o implante e ao seu redor (FIGURA 16A), com predominância de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, células gigantes e leve infiltração de eosinófilos, plasmócitos e mastócitos. O processo reparacional se caracterizou por angiogênese, fibroplasia e fibrose de moderada a intensa (FIGURA 16B), necrose de leve a moderada, sendo um animal de forma intensa e regeneração muscular de leve a moderada. A calcificação distrófica esteve presente neste grupo.

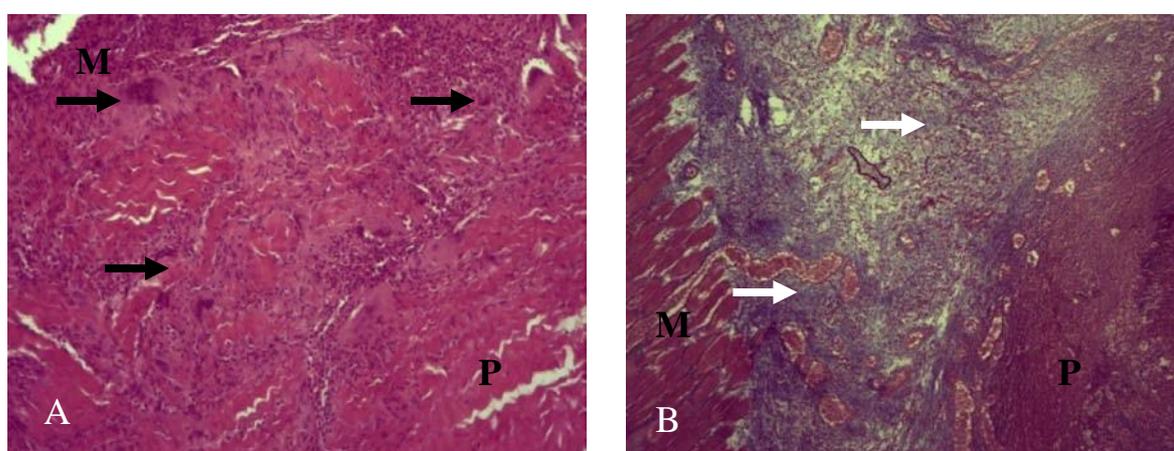


FIGURA 16: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 0,625% e avaliado com 30 dias (grupo 6). (A) reação inflamatória intensa entre o implante (P) e o tecido muscular (M), notar células gigantes (setas pretas). (HE 10x de acordo com a original). (B) intensa angiogênese, fibroplasia e fibrose (setas brancas) entre a musculatura (M) e à região de incorporação do implante (P), (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original).

3.3.3 Grupos de animais com implantes conservado em Glutaraldeído 1,0%

Nos animais analisados aos 7 dias os implantes apresentaram reação inflamatória de moderada a intensa (FIGURA 17A) localizada entre as fibras musculares e ao redor do implante, com predominância de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e leve infiltração de células gigantes. No processo reparacional observou-se a ocorrência de necrose moderada a intensa (FIGURA 17B), regeneração muscular moderada a intensa, angiogênese e fibroplasia intensas (FIGURA 17C) e fibrose leve. A calcificação distrófica presente foi caracterizada de leve a moderada nas fibras musculares e ocorreu somente em dois animais.

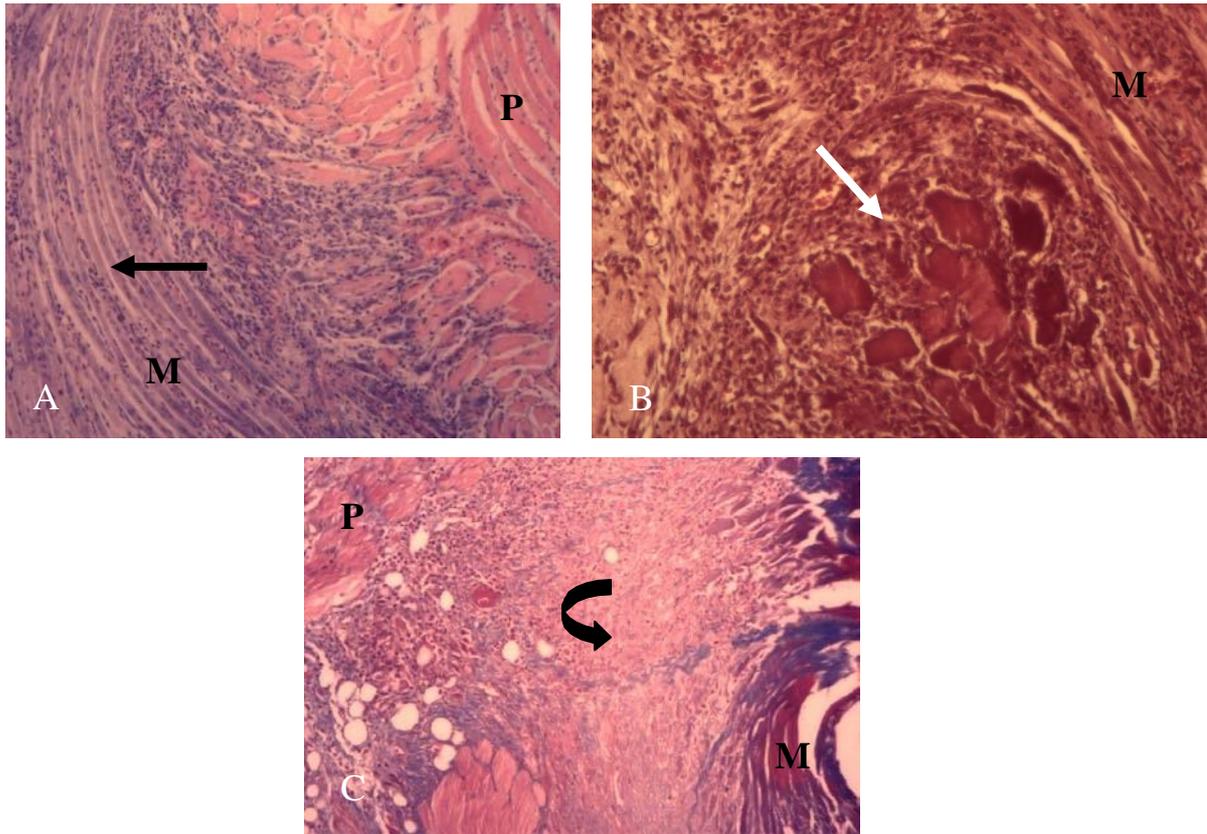


FIGURA 17: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 7 dias (grupo 7). (A) reação inflamatória moderada entre o implante (P) e o tecido muscular (M), notar expressiva tentativa de regeneração muscular (seta preta) (HE, 4x de acordo com a original). (B) necrose de fibras musculares com calcificação distrófica (seta branca) (HE, 20x de acordo com a original). (C) angiogênese e fibroplasia intensas (seta curva) entre o implante (P) e o tecido muscular (M) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original).

Os animais referentes ao grupo de 14 dias apresentaram reação inflamatória de leve a moderada (FIGURAS 18A) localizada no implante e ao seu redor, com predominância de neutrófilos, macrófagos e células gigantes e leve infiltração de eosinófilos e linfócitos. Somente um animal apresentou de forma intensa a presença de neutrófilos, macrófagos e células gigantes. Angiogênese de moderada a intensa, fibroplasia e fibrose moderadas, necrose e regeneração muscular leve foram características do processo reparacional (FIGURAS 18B E 18C). A ocorrência de calcificação distrófica foi somente em um animal e apresentou-se de forma leve.

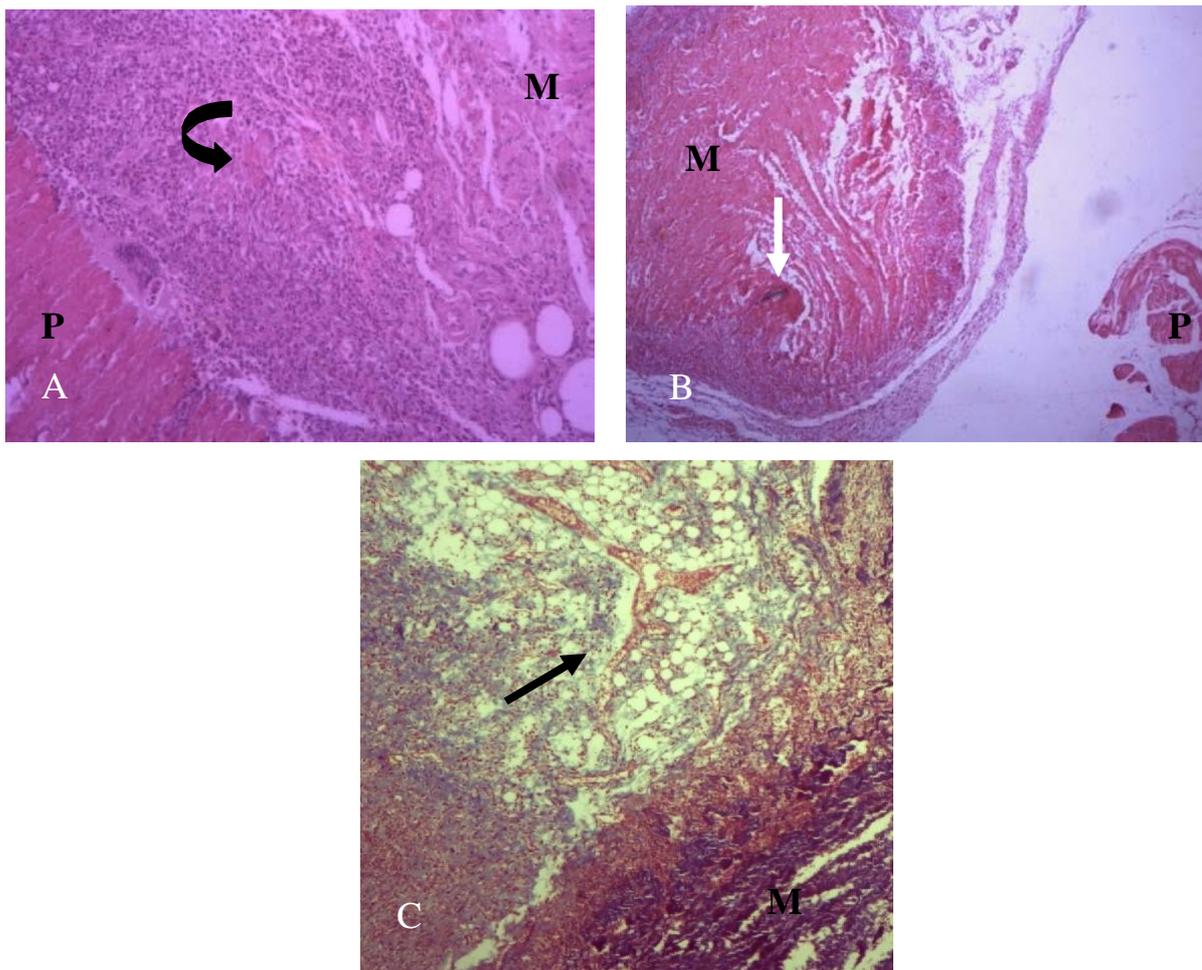


FIGURA 18: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 14 dias (grupo 8). (A) reação inflamatória moderada entre o implante (P) (seta curva) e o tecido muscular (M) com células gigantes e fibrose ao redor implante (HE, 4x de acordo com a original). (B) necrose de fibras musculares com calcificação distrófica (seta branca). (C) - angiogênese e fibroplasia moderadas (seta preta) (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original).

Nos camundongos avaliados aos 30 dias observou-se reação inflamatória de moderada a intensa localizada no implante e ao seu redor com predominância de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e leve infiltração de plasmócitos e células gigantes (FIGURA 19A). Um animal apresentou infiltração intensa de células gigantes. No processo reparacional a angiogênese foi de moderada a intensa, a fibroplasia predominantemente leve, tendo somente 2 animais apresentado-a de forma intensa. A fibrose observada foi intensa e a necrose de moderada a intensa. Presenciou-se a ocorrência de destruição muscular e não regeneração, e calcificação distrófica (FIGURA 19B e 19C) presente em somente três animais, sendo que dois apresentaram de forma leve e um de forma intensa.

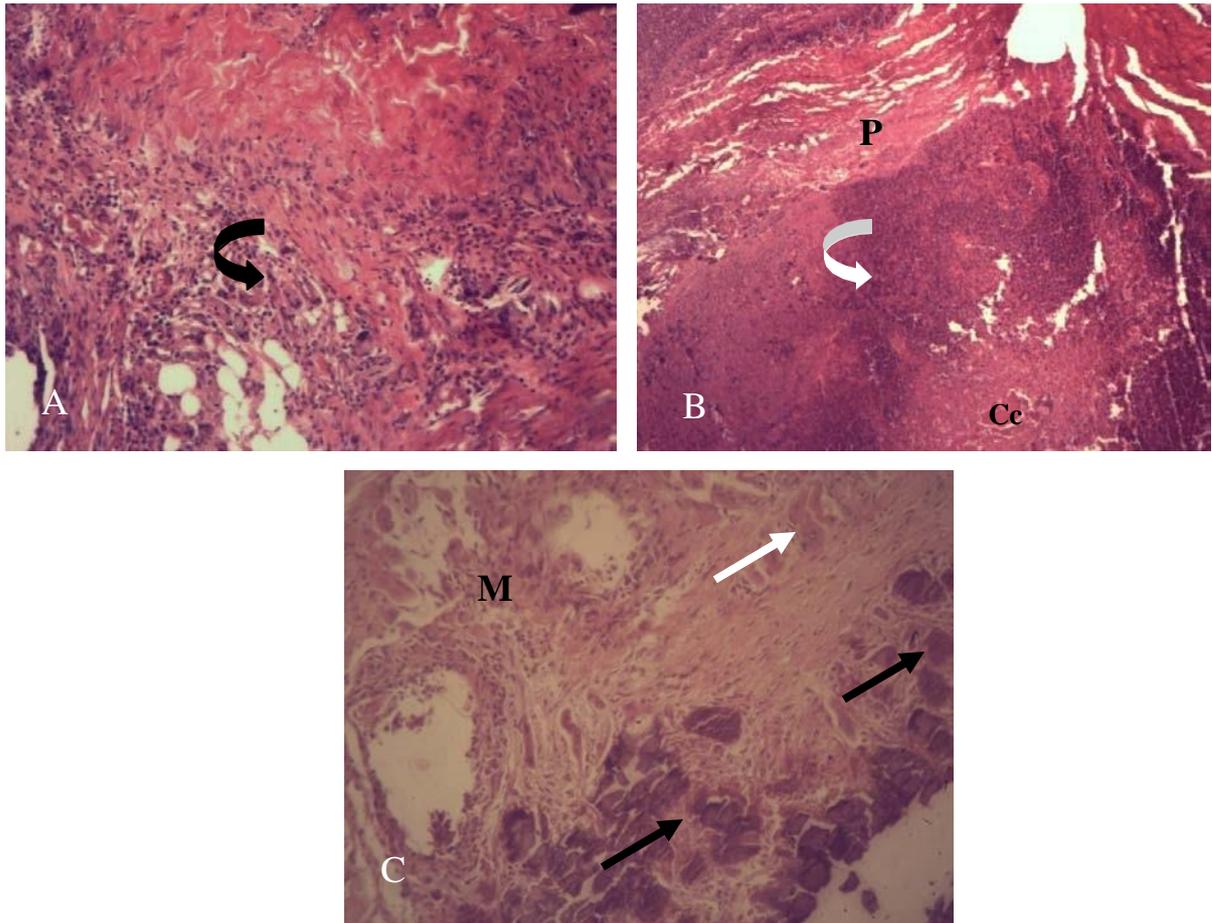


FIGURA 19: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1% e avaliado com 30 dias (grupo 9). (A) reação inflamatória mista moderada entre o implante e o tecido muscular, com células gigantes (seta preta curva) (HE, 10x de acordo com a original). (B) necrose intensa com calcificação distrófica(Cc) no implante (P) (seta branca curva) (HE, 4x de acordo com a original). (C) área de necrose com calcificação distrófica(setas pretas) e regeneração de fibras musculares (M) (seta branca) (HE, 10x de acordo com a original).

3.3.4 Grupos de animais com implantes conservado em Glutaraldeído 1,5%

Os animais de 7 dias apresentaram reação inflamatória de leve a moderada localizada entre o implante e o músculo (FIGURA 20A E 20B), no implante e entre as fibras musculares, com predominância de neutrófilos e macrófagos e leve infiltração de eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes. Os mastócitos estavam ausentes. A angiogênese e a fibroplasia foram intensas, enquanto que a fibrose e a necrose observadas foram leves. Observou-se destruição muscular com leve regeneração e ausência de calcificação. Somente um animal esteve fora do padrão apresentando angiogênese e fibroplasia (FIGURA 20C) moderadas e calcificação distrófica intensa, a qual estava presente na fibra muscular. O encapsulamento foi observado em todos os animais, sendo que somente um o apresentou no

músculo esquelético. Este grupo caracterizou-se por uma intensa reação no músculo próximo ao implante.

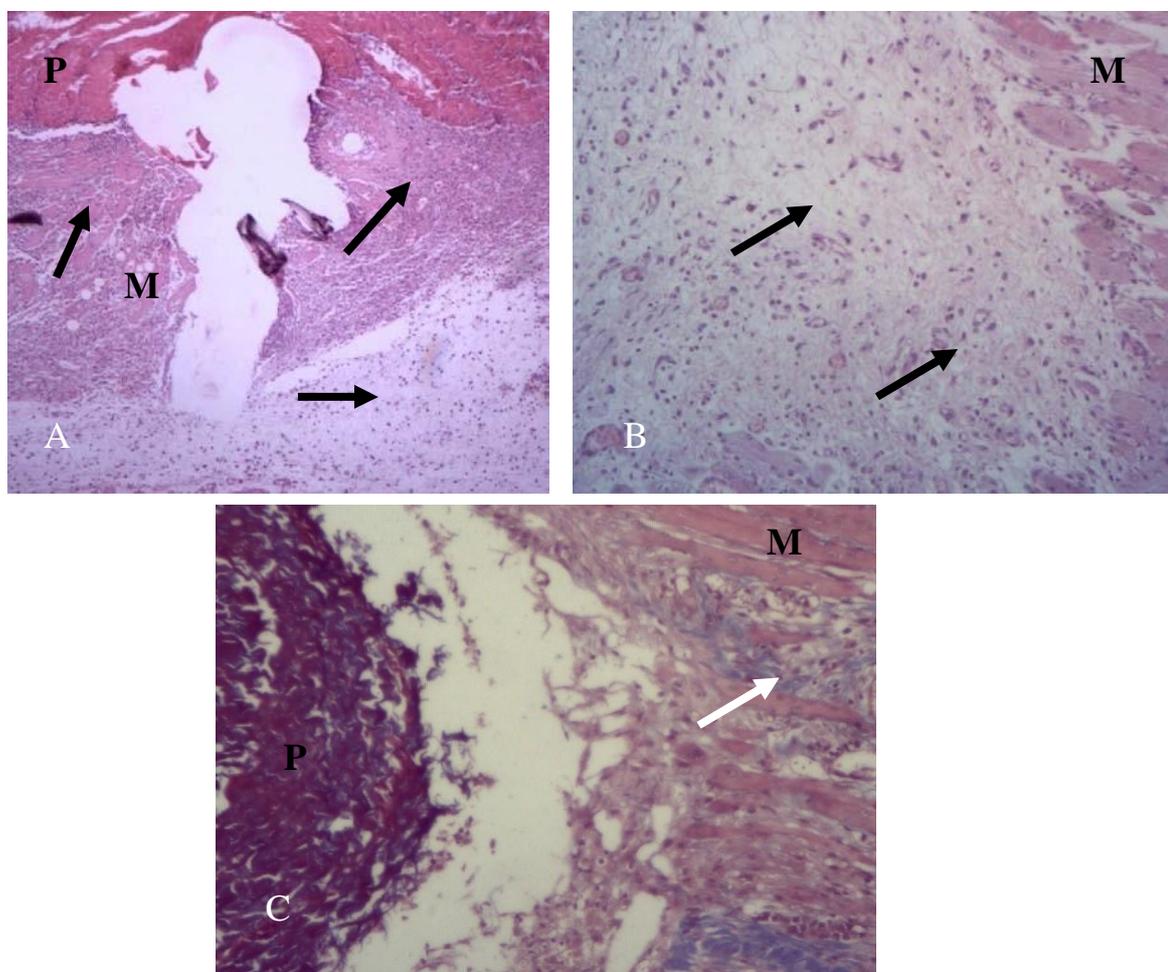


FIGURA 20: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,5% e avaliado com 7 dias (grupo 10). (A e B) reação inflamatória mista moderada entre o implante (P) e o tecido muscular (M), angiogênese e fibroplasia intensas (setas pretas) (A - HE, 4x de acordo com a original B – 10x). (C) fibroplasia e regeneração muscular (seta branca) (Tricrômico de Masson, 20x de acordo com a original).

Nos animais sacrificados com 14 dias observou-se reação inflamatória de leve a moderada localizada no implante e ao seu redor (FIGURA 21 A e 21B), com predominância de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células gigantes e leve infiltração de eosinófilos e plasmócitos. Angiogênese de moderada a intensa, fibroplasia (FIGURA 21A e 21C) e fibrose moderadas, necrose (FIGURA 21C) e regeneração muscular leve foram observadas no processo reparacional. A calcificação distrófica estava ausente, com exceção de um animal que a apresentou de forma leve.

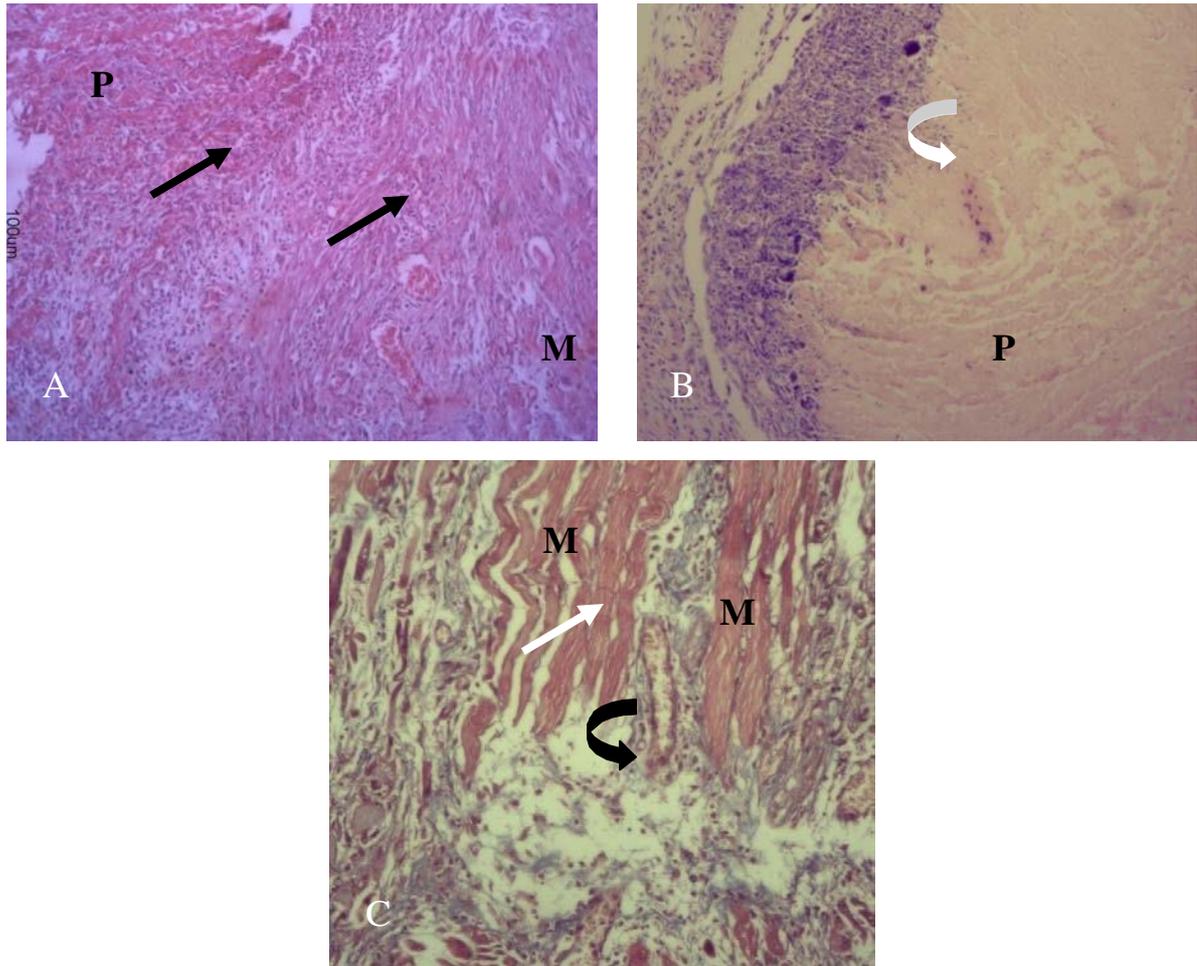


FIGURA 21: Animal implantado com pericárdio bovino conservado em glutaraldeído 1,5% e avaliado com 14 dias (grupo 11). (A) reação inflamatória moderada no implante (P) e entre este e o tecido muscular (M), angiogênese e fibroplasia intensas (setas pretas) (HE, 4x de acordo com a original). (B) reação inflamatória ao redor do implante (P) com células gigantes (seta branca curva) (Giemsa de Lennert, 10x). (C) fibroplasia e angiogênese (seta preta curva), destruição de fibras musculares (M) (seta branca) (Tricrômico de Masson, 10x de acordo com a original).

Os camundongos que compunham o grupo de 30 dias apresentaram reação inflamatória moderada localizada no implante e no tecido adjacente, com predominância de macrófagos, linfócitos e células gigantes e leve infiltração de neutrófilos e plasmócitos. O processo reparacional, caracterizou-se por angiogênese intensa, fibroplasia e necrose leves, fibrose predominantemente intensa, tendo somente um animal apresentado de forma moderada. Observou-se destruição muscular com ausência de regeneração muscular, e a calcificação distrófica ocorreu em um animal e de forma moderada. Neste grupo, destaca-se que a intensa reação inflamatória provocou a escassa integração entre o implante e o tecido muscular (FIGURA 22B).

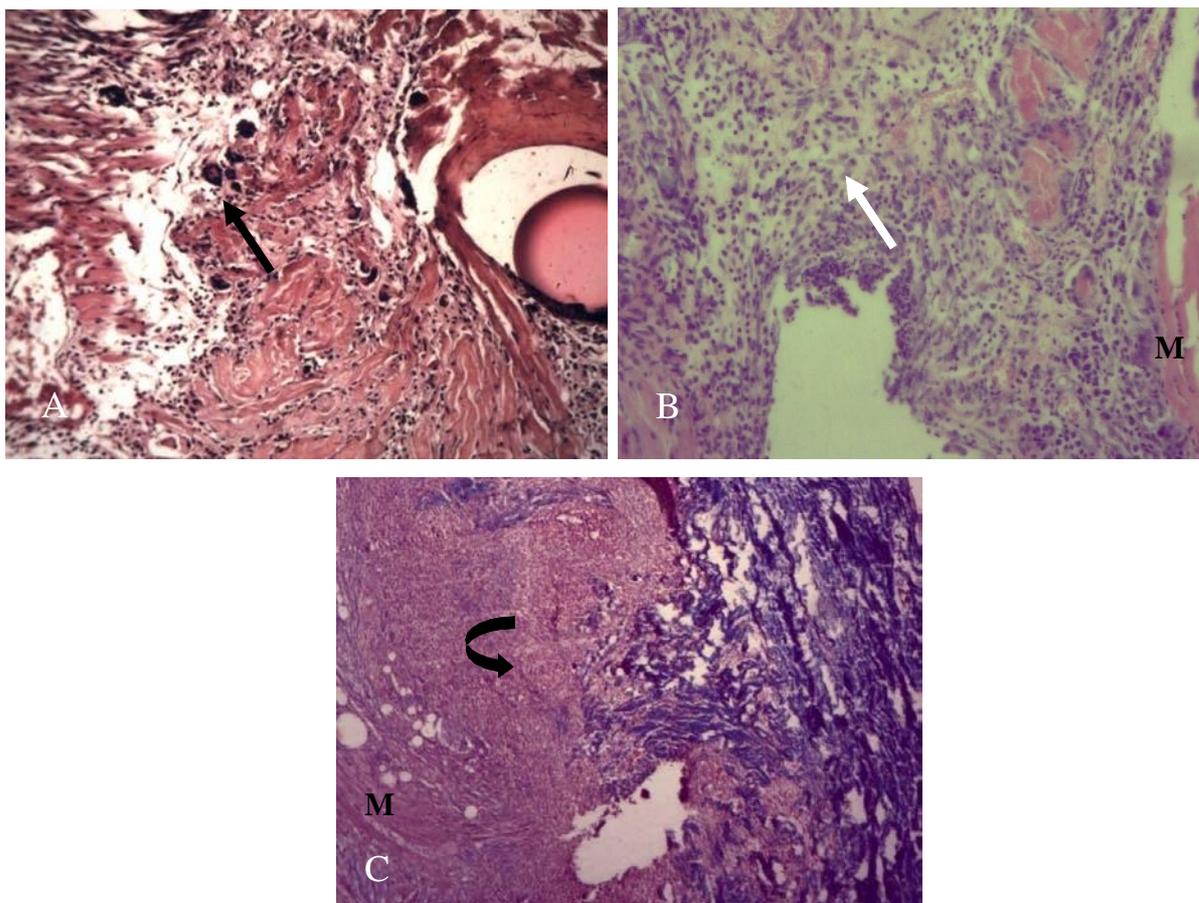


FIGURA 22: Animal implantado com pericárdio bovino tratado com glutaraldeído 1,5% e avaliado com 30 dias (grupo V). (A) reação inflamatória moderada entre o implante e o tecido muscular, com células gigantes (seta preta), (B) angiogênese e fibroplasia ainda intensas (seta branca) (A - HE, 4x de acordo com a original B – 10x). (C) implante não integrado ao tecido muscular (M) (seta curva) (Tricrômico de Masson, 4x de acordo com a original).

3.4 Análise Microscópica por Comparação

3.4.1 Glicerina 98% X Glutaraldeído 0,625%

Analisaram-se os grupos de glicerina 98% e glutaraldeído 0,625% e efetuou-se uma comparação que abrangia todos os períodos de avaliação. Focando somente os grupos de sete dias percebeu-se que a intensidade da reação inflamatória não diferiu muito, porém a infiltração das células inflamatórias no grupo da glicerina atingiu também a musculatura esquelética. Em relação ao processo de reparação, ocorreu maior intensidade de angiogênese e fibroplasia no grupo tratado com glutaraldeído, havendo calcificação distrófica mais proeminente neste grupo também.

Nos grupos de 14 dias, em relação a reação inflamatória, cujo local de ocorrência foi o mesmo em ambos os grupos, no grupo do glutaraldeído se caracterizou por um processo mais agudo, pois além de maior intensidade de neutrófilos, as células gigantes estavam presentes de forma leve, diferindo do grupo glicerina, onde estas células se apresentam de forma moderada. No processo reparacional, a fibroplasia foi mais intensa no grupo do glutaraldeído, áreas de necrose foram mais frequentes no de glicerina, as quais provavelmente funcionaram como sítio de calcificação.

A reação inflamatória do grupo de 30 dias com glutaraldeído apresentou células da fase aguda ainda em maior quantidade, assim como a ocorrência de necrose, quando comparada ao grupo de 30 dias com glicerina e as células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) foram mais observadas no grupo com glicerina assim como a fibrose, enquanto que a calcificação distrófica esteve ausente em ambos os grupos.

3.4.2 Glutaraldeído 0,625% X Glutaraldeído 1,0% X Glutaraldeído 1,5%

Foi realizada comparação entre os grupos de implantes conservados em glutaraldeído, em todos os períodos de avaliação. Quando se comparou os grupos de sete dias, observou-se que os grupos de glutaraldeído apresentaram reação inflamatória semelhante. No grupo de glutaraldeído 1,5%, neste mesmo período, a necrose ocorreu de forma leve, porém a destruição muscular foi intensa com leve regeneração, diferindo dos outros grupos que apresentaram necrose moderada a intensa tanto no implante como nas fibras musculares com conseqüente regeneração muscular moderada a intensa. Isto resultou na ocorrência da calcificação distrófica preferencialmente nos grupos de menores concentrações. Observou-se também no grupo de 1,5% que o material ao corte apresentava separação entre o implante e o músculo, o que parece demonstrar que não ocorreu início da incorporação do implante.

Analisando-se os grupos referentes ao período de 14 dias, observou-se que um padrão de resposta inflamatória leve a moderada, característica de uma fase subaguda, foi mantido. No processo de reparação, os grupos também mantiveram um padrão de resultados, com exceção do grupo de glutaraldeído de 0,625% que não apresentou ocorrência de necrose, enquanto que os outros grupos apresentaram de forma leve.

O padrão das células da reação inflamatória foi semelhante entre os grupos aos 30 dias, entretanto o grupo de 1,5% não apresentou persistência da fibroplasia. Células características da fase aguda (neutrófilos) em pequena quantidade, não seguindo o padrão expresso pelos outros, assim como o da glicerina, foram observadas. A necrose no grupo de 1,5%

caracterizou-se como leve, diferente dos demais grupos onde sua ocorrência foi de moderada a intensa e a regeneração muscular ocorreu apenas no grupo de menor concentração. Nos grupos de maior concentração ocorreu destruição muscular, especialmente no grupo de 1,5% aos 30 dias, onde a intensa reação inflamatória persistente impossibilitou a incorporação do enxerto ao tecido muscular adjacente, diferente do observado nos outros grupos.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a utilização de membranas biológicas tratadas tem se tornado cada vez mais ampla e frequente na Medicina Veterinária e, conseqüentemente, tem se intensificado a variedade de tipos de membranas e de tratamentos empregados na técnica cirúrgica.

A análise das possíveis interferências no processo reparacional e, conseqüentemente, da reação inflamatória local, provocadas pelos implantes de membranas biológicas tratadas teve início com Pigossi *et al.* (1967), que perceberam a ausência de reação inflamatória aguda quando utilizaram em seu experimento membrana biológica tratada com glicerina. Desde então, a preocupação com a solução ideal e sua respectiva concentração se tornaram assunto de muitas pesquisas envolvendo tanto a glicerina quanto o glutaraldeído. Estas interferências observadas por Pigossi há mais de 30 anos, também foram encontradas neste estudo tanto nas membranas tratadas por glicerina como por glutaraldeído.

Este estudo, portanto, abrange uma comparação entre estes dois agentes químicos. A escolha pela concentração de 98% da glicerina se deve à sua intensa utilização na prática cirúrgica veterinária (LANTZAN, 1986; BARROS *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 1995; OLIVEIRA & ALVARENGA, 1996; COSTA NETO *et al.*, 1999; LAVALLE *et al.*, 1998; BRAGA & PIPPI, 2009; VICENTI *et al.*, 2000; CONTESINI *et al.*, 2001; BRANDÃO *et al.*, 2001), e às investigações experimentais recentes realizadas que demonstram algumas desvantagens desta solução (ALVARENGA, 1977; RANZANI *et al.*, 1990; BELLENZANI & BACCARIN, 2002; BRUN *et al.*, 2002; QUITZAN *et al.*, 2003; BRUN *et al.*, 2004; RODAS *et al.*, 2008). Optou-se pela utilização da solução de glutaraldeído devido ao seu crescente uso na prática veterinária (CHAUVAUD *et al.*, 1991; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1995; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1996; GUTIÉRREZ-SAMPAIO *et al.*, 2002; BOIN IDE *et al.*, 2003), e por ser citada na literatura como uma solução fixadora, conservadora, biocida e desinfetante (JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996; U.S.DHHS, 2009), que, quando utilizada no tratamento de membranas biológicas, lhes confere biocompatibilidade satisfatória (PINTO *et al.*, 1993; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1995; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1996; BURUGAPALLI *et al.*, 2004; HADDAD FILHO *et al.*, 2004; GRECA *et al.*, 2005; MAIZATO *et al.*, 2008), resistência mecânica e maleabilidade (SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1995; JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1996), controla a degradação (MAIZATO *et al.*, 2008),

reduz a antigenicidade (WOODROOF, 1979; SANTILLAN-DOHERTY *et al.*, 1995) e a trombogenicidade (MAIZATO *et al.*, 2008). A concentração de 0,625% foi definida como a menor concentração de solução de glutaraldeído neste experimento devido a sua falha na inativação completa do vírus rábico quando utilizado no tratamento de membranas biológicas (TRANI, 2006). As soluções com 1,0% e 1,5% foram definidas a partir da necessidade de se encontrar concentrações maiores de 0,625% que provocassem a menor interferência na incorporação do implante, uma vez que o glutaraldeído é conhecido pelo seu intenso estímulo a calcificação distrófica (JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996; COSTA *et al.*, 2005; GRECA *et al.*, 2005; BAUCIA *et al.*, 2006; SUCU *et al.*, 2006; MAIZATO *et al.*, 2008) e toxicidade (JAYAKRISHNAN & JAMEELA, 1996; WERLEY *et al.*, 1996; BERTGES *et al.*, 2002; ALKAN *et al.*, 2006, TAKIGAWA & ENDO, 2006; U.S.DHHS, 2009), para posterior análise da capacidade de inativação de partículas virais.

Ao escolher a membrana biológica ideal para este experimento, optou-se pela utilização do pericárdio bovino devido a grande frequência com a qual é citado na literatura veterinária e pela boa qualidade dos resultados experimentais (MARQUES, 1987; POMERANTZEFF *et al.*, 1997; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1995; SANTILLAN – DOHERTY *et al.*, 1996; PIRES *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 1993; GARCIA JÚNIOR *et al.*, 2003; QUITZAN *et al.*, 2003; GRECA *et al.*, 2005, COSTA *et al.*, 2005; POMERANTZEFF *et al.*, 2007). Este tipo de membrana biológica comprovou ser um material de fácil obtenção, maleável e fácil manejo cirúrgico, o que justifica a sua ampla e crescente aplicação na Medicina Veterinária.

Os períodos de análise dos animais (7, 14 e 30 dias) foram definidos com o objetivo de avaliar a resposta inflamatória precoce e tardia, uma vez que a resposta inflamatória, assim como o processo de reparação, tem início logo que o organismo sofre alguma injúria (COLLINS *et al.*, 2000) e que o tipo de resposta inflamatória em situações de implantes, sejam sintéticos ou biomateriais, é sempre crônica (TANG *et al.*, 1995).

Os animais que mais comumente são utilizados para este tipo de experimento são os ratos Wistar (OLIVER *et al.*, 1980; ADLINGTON *et al.*, 1992; PINTO *et al.*, 1993; BURUGAPALLI *et al.*, 2003; HADDAD FILHO *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005; BAUCIA *et al.*, 2006; ALKAN *et al.*, 2006; MAIZATO *et al.*, 2008), principalmente devido a seu tamanho e peso, entretanto, devido a indisponibilidade desta espécie, um pré-experimento foi realizado utilizando-se três camundongos. A partir deste teste, obteve-se a certeza de que essa espécie seria viável como modelo experimental para o estudo principal, que consistiu na simulação de uma situação de reconstrução de parede abdominal.

Após análise de todos os animais durante as necropsias e suas respectivas fotografias, observou-se que os que receberam pericárdio bovino tratado com glicerina apresentaram perda do formato original do implante desde o primeiro período de análise (7 dias). Entretanto, o número de animais nos grupos que receberam implantes tratados com glutaraldeído que apresentou esta mesma alteração, aumentou com o passar dos períodos, embora tenha reduzido conforme a concentração de glutaraldeído aumentasse. Isto sugere que quanto maior a concentração de glutaraldeído utilizada no tratamento e conservação da membrana, maior foi a dificuldade do organismo para incorporá-lo, uma vez que a reação inflamatória induzida e a resistência da membrana foram maiores.

Trauma mecânico, isquemia tissular, infecção e presença de corpo estranho são situações que podem ocasionar formação de aderências viscerais que está relacionada a processo inflamatório que produz exsudato rico em fibrinogênio. A fibrina formada induz a adesão de superfícies distintas juntamente com a proliferação de tecido de granulação (RAMOS, 2002). Neste estudo, observou-se em todos os grupos a ocorrência de aderência do omento ao implante, abrangendo um total de 88,3% dos animais. Este fato pôde ser justificado pelo contato do omento com a junção do implante ao músculo, tendo contato, conseqüentemente, com o exsudato rico em fibrinogênio produzido na reação inflamatória. A mesma justificativa se aplica as aderência de vísceras, observadas em 41% dos animais. Entretanto não se evidenciou nenhuma complicação por razão do processo aderencial.

A presença de áreas hiperêmicas ao redor dos implantes, evidenciada macroscopicamente em alguns animais no período inicial de avaliação (7 dias), pode ser atribuída ao manuseio no trans-operatório, uma vez que o tecido natural do modelo experimental em questão é extremamente sensível aos materiais cirúrgicos (pinças, agulhas, fios).

O processo de reparo tecidual começa logo no início da reação inflamatória. Caso a lesão não seja tão simples, dentro de 24 horas após a lesão os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a proliferar para que seja formado o tecido de granulação, o qual se caracteriza pela angiogênese e proliferação de fibroblastos (COTRAN, 2000). A angiogênese, um dos processos pelo qual ocorre formação de novos vasos através da emissão de botões capilares de vasos preexistentes (RISAU, 1997 apud COTRAN *et al.*, 2000), é conhecida também como neovascularização e considerada um importante processo crítico para a inflamação crônica e fibrose (COTRAN *et al.*, 2000). Portanto, a ocorrência da angiogênese no presente experimento era esperada frente a uma situação de inflamação crônica estimulada pelo uso de biomaterial (GRECA *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados expressos, os animais que receberam implantes tratados com soluções de glutaraldeído, apresentaram angiogênese em maior intensidade quando comparados com a glicerina em todos os períodos de avaliação, o que demonstra o maior estímulo deste evento caracterizando uma inflamação crônica maior nestes grupos. Resultado semelhante, usando a glicerina, foi obtido por Costa Neto *et al.* (1999) em estudo de tenoplastia experimental do calcâneo em cães com peritônio bovino, pois observou em avaliação histológica a presença de neovascularização desde a primeira coleta (dois dias) que tornou-se mais evidente no sétimo dia.

Neste estudo, pode-se observar a ocorrência do encapsulamento dos implantes de pericárdio bovino tanto nos grupos que receberam implantes conservados em glutaraldeído como nos em glicerina. Este encapsulamento, trata-se da formação de uma cápsula fibrosa ao redor dos implantes biológicos, sendo considerado uma resposta “normal” que pode se tornar um problema somente em caso de contração ao redor do implante (TANG *et al.*, 1995), o que seria na verdade o isolamento do implante. Este mesmo evento foi evidenciado por Santillán-Doherty *et al.* (1995), que após microscopia das biopróteses de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído utilizadas na reparação de parede da cavidade toraco-abdominal, constataram a formação de uma capa de fibroblastos sobre o implante e uma outra de colágeno por cima da camada de colágeno do pericárdio, por Gamba *et al.* (2002) que observou este encapsulamento em seus implantes de matrizes acelulares provenientes de diafragmas de coelhos e por Ranzani *et al.* (1990) em seus implantes de pericárdio equino em diafragma de cão.

Com exceção dos grupos de animais que receberam implantes conservados em glicerina 98% e glutaraldeído 0,625%, ambos no período de avaliação de 7 dias (Grupos 3 e 6, respectivamente), todos os outros apresentaram a presença de células gigantes ao redor do implante de forma leve a moderada. Estas células são características de qualquer processo inflamatório crônico e, assim como macrófagos, têm sido observadas ao redor de muitos tipos de implantes de biomateriais (TANG *et al.*, 1995) e a ausência de células gigantes nestes grupos demonstra a ausência de reação inflamatória crônica nesta situação.

O fibroblasto, principal célula produtora de colágeno dentro do processo inflamatório, é responsável pela produção de material orgânico a ser utilizado pelo organismo para a reparação e devido a estas características, é esperado que o número deste tipo de célula aumente no início do processo de reparação e depois diminua, seja pela sua própria maturação ou por estar finalmente entre as fibras colágenas que produziu (HADDAD FILHO *et al.*, 2004). O termo fibroplasia é utilizado, neste experimento, para definir a presença de grande

número de fibroblastos e sua proliferação associada às finas fibras de colágeno que estão sendo produzidas dando um aspecto frouxo, enquanto que fibrose é o termo utilizado para a presença de poucos fibroblastos e maior quantidade de fibras colágenas. Comparando os grupos de glutaraldeído, percebeu-se a ocorrência de uma fibroplasia intensa presente durante o período de 7 a 30 dias nos grupos que receberam implantes com soluções de 1,0% e 1,5%, enquanto que o grupo de concentração 0,625% a apresentou desta forma até o período de 14 dias, passando posteriormente para um nível moderado. De maneira diferente mostraram-se os grupos de glicerina, que apresentaram fibroplasia moderada do período de 7 a 30 dias e, desta forma, estes resultados reforçam o que foi expresso pela angiogênese. Observação semelhante aos grupos de soluções de 1,0% e 1,5%, foi realizada por Costa Neto *et al.* (1999) que observou a ocorrência da proliferação incipiente dos fibroblastos a partir do 2^o dia e sua presença cada vez maior, assim como a deposição de colágeno, a partir do 15^o dia.

De acordo com Tang *et al.* (1995), o fibrinogênio facilmente incorpora a maioria dos biomateriais e provavelmente desnatura, o que possivelmente expõe previamente epítomos escondidos. A interação desses epítomos, atualmente desconhecidos, com células inflamatórias leva ao eventual acúmulo de um grande número de neutrófilos e monócitos/macrófagos na superfície do implante. Estes fagócitos formados, provavelmente com a colaboração de células fibroblásticas móveis, talvez iniciem uma longa resposta inflamatória e fibrótica observada ao redor do implante crônico. Esta relação entre o acúmulo de neutrófilos e macrófagos na superfície do implante com a formação de fibrose pôde ser observada em todos os grupos de estudo, pois quanto menor o período de análise, menor era o número de macrófagos e, conseqüentemente, mais leve era a formação da fibrose. Nos períodos de 14 e 30 dias observou-se o aumento do número de macrófagos e, em seguida, a presença de fibrose moderada a intensa.

Quando comparados os grupos de 30 dias com glicerina e com glutaraldeído, o processo de reação inflamatória deste apresentou células da fase aguda ainda em maior quantidade, assim como a ocorrência de necrose, e as células mononucleares (linfócitos e plasmócitos) foram mais observadas no grupo da glicerina assim como a fibrose. Este fato parece demonstrar que o processo de reparação foi mais eficiente, cronologicamente, no grupo da glicerina, sugerindo que os animais do grupo glutaraldeído necessitaram de um período maior para atingir o mesmo padrão.

O acúmulo dos neutrófilos constitui uma das principais características da reação inflamatória aguda. Com o decorrer do processo inflamatório-reparacional, o número dessas células tende a diminuir, cedendo lugar a outros componentes que caracterizam mais a fase

crônica ou reparadora (HADDAD FILHO *et al.*, 2004). Entretanto, elas podem continuar ativas por meses quando induzidas por bactérias persistentes ou por mediadores produzidos por macrófagos ou células necróticas. Os macrófagos por sua vez estão presentes desde o início em um processo inflamatório (COLLINS, 2000). No estudo de Haddad Filho *et al.* (1995) com pericárdio bovino, observaram uma tendência de aumento das células de fase crônica no decorrer dos períodos de sete e trinta dias, sendo que em somente um dos ratos notaram a manutenção do processo inflamatório agudo, que acreditaram ter sido devido à alguma contaminação.

Neste estudo, pode-se observar que os macrófagos estiveram presente de forma moderada a intensa durante os períodos de sete a trinta dias nos grupos de animais que receberam implantes de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído e os neutrófilos estiveram presentes de forma moderada nos grupos que foram analisados com 30 dias de pós-operatório, o que confirma a afirmação de Collins (2000) sobre a relação direta entre os mediadores produzidos pelos macrófagos e a persistência intensa de neutrófilos na fase crônica da reação inflamatória.

O eosinófilo é um tipo de célula característica de processos inflamatórios crônicos, sendo típica de reações imunes mediadas por IgE e das infecções parasitárias, e o seu recrutamento envolve o extravasamento de sangue e migração tecidual por processos semelhantes aos observados para outros leucócitos. Eles possuem grânulos que contêm uma proteína que é tóxica para parasitas e que causa lise de células epiteliais mamíferas (COLLINS, 2000), sendo benéficos nas parasitoses, mas contribuindo para a lesão tecidual nas reações imunes (BOYCE, 1997 apud COLLINS, 2000). De acordo com Dahm *et al.*, (1990) o pericárdio bovino tratado com glutaraldeído pode induzir respostas imunológicas consistentes com uma reação hospedeiro *vs* implante. Entretanto, todo implante é visto pelo organismo como um corpo estranho e uma resposta imune é estimulada na sua presença. Visto que a presença de eosinófilos neste experimento, de forma geral, foi de ausente a leve pode-se dizer que a pequena presença deste tipo celular não foi capaz de interferir no resultado provocando uma lesão tecidual indesejada.

A taxa e a concentração dos produtos da degradação nos tecidos ao redor do implante tem que ser num nível tolerável (BERGSMA *et al.*, apud KIM *et al.*, 2000). Os biomateriais devem promover um comportamento de regulação celular apropriado, assim como adesão, proliferação, migração e diferenciação, para promover o desenvolvimento de um novo tecido funcional (KIM *et al.*, 2000). Entretanto, de acordo com Collins (2000) a destruição celular continuada é uma marca da inflamação crônica, uma vez que vários produtos das células

inflamatórias contribuem para essa lesão. Portanto, nesta situação cria-se um ciclo onde a degradação contínua perpetua a inflamação e os produtos desta contribuem para a o processo de destruição celular.

No estudo realizado, os animais que receberam pericárdios bovinos tratados com glutaraldeído nas concentrações de 1,0% e foram avaliados com 30 dias de pós-operatório apresentaram destruição muscular e leve regeneração e, os animais respectivos ao grupo 1,5% com mesmo período de análise, apresentaram destruição muscular e ausência de regeneração. Este resultado demonstra que o glutaraldeído, em concentrações maiores de 1,0%, é tóxico o suficiente para impossibilitar o controle da destruição celular continuada da inflamação crônica e um processo de reparação eficiente. Provavelmente as altas concentrações funcionam como um estímulo constante da inflamação o que promove cada vez mais a destruição de tecido que por sua vez perpetua a cascata inflamatória.

Uma variabilidade no depósito mineral (ausência e intensidade) foi observada entre os grupos com pericárdio tratado com glicerina e os com glutaraldeído, e entre os animais do mesmo grupo. Isto reflete resultado semelhante observado por Baucia *et al.* em 2006 com válvulas cardíacas. Esses autores afirmaram que o resultado diversificado refletiu a prática médica, onde parte das válvulas cardíacas apresenta intensa calcificação distrófica após o implante, enquanto que outras apresentam calcificações focais ou até mesmo ausência de depósitos de cálcio identificáveis pela microscopia óptica.

O tratamento com glutaraldeído também pode funcionar como fator desencadeante da deposição de cálcio (COSTA, 2005), pois já foi demonstrado que altos teores de glutaraldeído incorporado ao tecido biológico se relacionam com maior tendência a calcificação distrófica em ratos (GRABENWÖGER, 1996 apud COSTA, 2005). Entretanto, ao analisar a ocorrência de calcificação, três animais que receberam pericárdio bovino tratado com glicerina apresentaram o acúmulo de cálcio no tecido, o que demonstra que a calcificação distrófica também pode ocorrer por várias outras razões, como idade, fatores metabólicos, desgaste mecânico, tempo e posição do implante (POMERANTZEFF, 1997), além também do estresse mecânico e da interação com componentes sanguíneos, que são fatores que comprovadamente influenciam na calcificação distrófica de próteses valvulares (BAUCIA *et al.*, 2006).

Embora nenhuma alteração que comprove a citotoxicidade da solução de glicerina tenha sido encontrada neste estudo, Rodas *et al.* (2008) comprovaram a sua existência, ao observar que 50% da população de uma colônia celular ovariana foi destruída ao entrar em contato com extrato de pericárdio bovino tratado com glicerina 78% (CI₅₀=78%), os autores

puderam presenciar o efeito citotóxico das moléculas de glicerina liberadas pelo pericárdio bovino tratado com esta solução.

A apresentação de células características da fase aguda (neutrófilos) em pequena quantidade observada no grupo 12 (1,5% - 30 dias), resultado este fora do padrão expresso pelos outros grupos no mesmo período, associado a não-persistência da fibroplasia sugere uma instalação tardia da reação inflamatória crônica neste grupo. Acredita-se que este fato, assim como a ocorrência de destruição celular e ausência de regeneração nos grupos com implantes tratados com maior concentração, seja devido a alta citotoxicidade do glutaraldeído. Fato semelhante foi observado por Maizato *et al.* (2003) ao testarem a citotoxicidade do pericárdio bovino tratado com glutaraldeído na concentração de 0,5%. Neste estudo, os autores observaram um crescimento celular em aproximadamente no máximo 25% da colônia de células ovarianas analisadas, indicando a morte de mais da metade da população celular.

Fatores sistêmicos podem influenciar na conclusão do processo inflamatório crônico como, por exemplo, a nutrição, os hormônios, o estado metabólico e o circulatório (COTRAN, 2000) dos animais. Outros fatores como o estresse cirúrgico, as atividades físicas com intenso movimento do local da lesão, a imunidade e a fisiologia de cada indivíduo, interferem diretamente no processo de reparação. Estes fatores foram definidos como os responsáveis pela observação de determinados resultados individuais. Como por exemplo, a ocorrência de encapsulamento do implante e do músculo esquelético adjacente em um animal que recebeu implante tratado com glutaraldeído 1,5% e foi analisado com 7 dias.

Este estudo, portanto, demonstrou os efeitos citotóxicos do glutaraldeído e sua capacidade de interferência na reação inflamatória e na reparação tecidual quando nas concentrações em questão. Com isso, fornece informações úteis para novos estudos que venham a avaliar esta solução como forma de tratamento e conservação de membranas biológicas.

5. CONCLUSÕES

Pericárdio bovino tratado com solução de glutaraldeído na concentração de 0,625% provoca reação inflamatória semelhante, mas ligeiramente mais intensa, quando comparado com o mesmo material tratado com glicerina 98%, indicando assim a possibilidade de utilização do glutaraldeído 0,625% no tratamento de membranas biológicas.

A maior concentração de glutaraldeído utilizada, 1,5%, apresentou uma citotoxicidade exacerbada levando a destruição das células musculares sem regeneração, o que indica a inviabilidade de sua utilização no tratamento de membranas biológicas.

A solução de glutaraldeído 1% apresentou uma citotoxicidade ligeiramente maior que a solução na concentração de 0,625%, a qual foi evidenciada através da destruição muscular com leve regeneração.

Os resultados evidenciados demonstraram a efetiva conservação das membranas pelo glutaraldeído nas diferentes concentrações utilizadas e a necessidade de novos estudos que identifiquem uma concentração entre 0,625% - 1% que seja eficiente no controle de bactérias, fungos e vírus.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADLINGTON, P.; ANSCOMBE, A.J.; PHILLIPS, J.J. Influence of the mode of preparation on the long-term efficacy of homologous costal cartilage implants. **Journal Laryngology Otology**. v. 106, n. 6, p.511-7, 1992.

ALKAN, M.; TALIM, B.; CIFTCI, A.O.; SENOCAK, M.E.; CAGLAR, M.; BÜYÜKPAMUKÇU, N. Histological response to injected glutaraldehyde cross-linked bovine collagen based implant in a rat model. **BMC Urology**. v.6, n. 3, 2006.

ALMEIDA, E. L.; ALVARENGA, J.; SILVA, J. V. Reconstrução do esôfago cervical de cães com pericárdio de caprino conservado em glicerina a 98% ou refrigerado em solução fisiológica a 0,9%: estudo experimental. In: **III Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**. Belo Horizonte, MG, p. 93. 1998.

ALVARENGA, J. **Substituição de segmento do colédoco de cão por preparado de pericárdio homólogo conservado em glicerina (estudo experimental)**. São Paulo, Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1977.

ALVARENGA J. Possibilidades e limitações da utilização de membranas biológicas preservadas em cirurgia. In: **Daleck CR. Tópicos em cirurgia de cães e gatos**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, p 33-42. 1992.

ARAÚJO, J.D.; BRAILE, D.M.; AZENHA FILHO, J.O. The use of bovine pericardium as an arterial graft. A 5-year follow-up. **Journal of Cardiovascular Surgery**. v.28, n.4, p.434-439, 1987.

BAUCIA, J.A.; NETO, R.M.L.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Tratamentos anticalcificantes do pericárdio bovino fixado com glutaraldeído: comparação e avaliação de possíveis efeitos sinérgicos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v. 21, n.2, 2006.

BARROS, P. S. M.; GARCIA, J. A.; LAUS, J. L.; FERREIRA, A. L.; GOMES, T. L. S. Aspectos clínicos do uso de membrana amniótica xenóloga conservada em glicerina nas ceratoplastias penetrantes da córnea de cães. In: **Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**. Curitiba, PR, p. 84. 1994.

BARROS, P. S. M.; SAFATLE, A. M. V.; MALERBA, T. A.; BURNIER JUNIOR, M. The surgical repair of the cornea of the dog using pericardium as a keratoprosthesis. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v.32, n. 4, p. 251-255. 1995.

BELLENZANI, M. C. R. & BACCARIN, R. Y. A. Estudo da cicatrização de lesões induzidas em serosa de cólon menor de eqüinos, tratados por implante de pericárdio homólogo – nota prévia. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias Jaboticabal**, v. 9, n. 1, suplemento., p. 98-100. 2002.

BERTGES, L. C.; ASSIS, E.A.C.P.; ITO, E. S.; BERTGES, E. R.; BERTGES, K.R.; RUBACK, M. C.; ANDRADE, M. C. V. Esophageal injury caused by glutaldehyde: histological study in rats. **GED - Gastroenterology Endoscop. Dig**, v. 21, n. 5, p.218-220, 2002.

BOIN IDE, F.; JOAQUIM, J.L.; LEONARDI, L.S. Glutaraldehyde-preserved bovine pericardium for the repair of diaphragmatic defects due to extensive metastatic liver resection. **Hepatogastroenterology**. v.50, n.51, p.839-840, 2003.

BRAILE BIOMÉDICA - INDÚSTRIA DE PRODUTOS CÁRDIOVASCULARES.

www.braile.com.br acessado no dia 17/05/07 às 13:43.

BRAILE, D. M. **Prótese valvular de pericárdio bovino: desenvolvimento e aplicação clínica em posição mitral**. São Paulo, Tese – (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, 1990.

BRAGA, F. A.; PIPPI, N. L. Uso de pericárdio heterólogo conservado em glicerina na reparação de hérnia abdominal traumática em cão. **Redevet**. 2009. site acessado em junho de 2009.

BRANDÃO, C. V. S.; PEREIRA, G.J C.; MOTTA, T.; MAMPRIM, M. J.; RANZANI, J.J.T. Reconstrução da cápsula articular com pericárdio bovino conservado em glicerina 98% para o tratamento da luxação coxofemural em cães. **Ciência Animal**, v. 11, suplemento 1. p. 248. 2001.

BRUN, M.V.; PIGATTO, J. A. T.; DRIEMEIER, D.; OLIVEIRA, L.O.; BECK, C. A. C.; AGUIAR, E. V.; FREIRE, C. D.; GAIGA, L. H. Traqueoplastia em cães com pericárdio eqüino conservado em glicerina por um período de 11 anos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 9, n. 1, p. 60-67. 2002.

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

BURUGAPALLI, K.; KOUL, V.; DINDA, A.K. Effect of composition of interpenetrating polymer network hydrogels based on poly (acrylic acid) and gelatin on tissue response: a quantitative in vivo study. **Journal Biomedical Mater Research A.**, v. 68, n. 2, p.210-8, 2004.

CARPENTIER, A.; LEMAIGRE, G.;ROBERT, L.; CARPENTIER, S.; DUBOST, C. Biologicial factors affecting long-term results of valvular heterografts. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 58, n. 4, p. 468-483. 1969.

CHAUVAUD, S.; JEBARA, V.; CHACHQUES, J.C.; EL ASMAR, B.; MIHAILEANU, S.; PERIER, P.; DREYFUS, G.; RELAND, J.; COUETIL, J.P.; CARPENTIER, A. Valve extension with glutaraldehyde-preserved autologous pericardium. Results in mitral valve repair. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 102, n. 2, p.171-7; discussion 177-8, 1991.

CONTESINI, E.A.; SALLES, M.S.; PIGATTO, J.A.T.; PIPPI, N.L.; RAISER, A.G. Reparação traqueal em case: transplante autógeno vs implante hógeno conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pina. **Ciência Rural**. v.31, n.4, p.633-637, 2001.

COSTA, J.N.L.; POMERANTZEFF, P.M.A.; BRAILE, D.M.; RAMIREZ, V.A.; GOISSIS, G.; STOLF, N.A.G. Comparação entre pericárdio bovino decelularizado e pericárdio bovino convencional utilizado na confecção de biopróteses valvares cardíacas. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**. v. 20, n. 1, 2005.

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

COVARRUBIAS, D.P.; VEJA, A. S.; JASSO VICTORIA, R.; OLMOS ZÚÑIGA, J. R.; CALOCA, J.V.; SALGADO, J.A.S.; SANTILLÁN-DOHERTY, P. Uso del pericardio bovino tratado con glutaraldehído. **Rev Inst Nal Enf Resp Mex**. v.18, n.3, p. 224-229, 2005.

CUNRATH, G. S. Pericárdio de bovino tratado pelo glutaraldeído no reparo de hérnia incisional: estudo experimental. **São José do Rio Preto**, Tese (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, 1999.

DAHM, M.; LYMAN, W.D.; SCHWELL, A.B.; FACTOR, S.M.; FRATER, R.W. Immunogenicity of glutaraldehyde-tanned bovine pericardium. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**. v. 99, n.6, p.1082-90, 1990.

GALLO, J.I.; ARTIÑANO, E.; VAL, F.; DURAN, C.G. Glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the repair of diaphragmatic defects: experimental study. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**. v.83, n.6, p.905-8, 1982.

GARCIA JÚNIOR, I.R.; BASSI, A.P.F.; MAGRO FILHO, O. Utilização experimental de implante heterógeno de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído, na reconstrução do assoalho orbitário: análise histológica em ratos. **Revista de Odontologia de Araçatuba**. v.24, n.1, p.60-64, 2003.

GOISSIS, G.; BRAILE, D.M.; GIGLIOTI, A.F. Desenvolvimento de processo automático para a reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** . Jul/Set , p.92-97, 1999.

GRECA, F.H.; NORONHA, L.; COSTA, F.D.A.; SOUZA FILHO, Z.A.; SOCCOL, A.T.; FERES, A.N.; DUDA, J.R.; ADAMS, E. Estudo Comparativo da biocompatibilidade da mucosa intestinal porcina e pericárdio bovino usados como enxertos na veia cava de cães. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 20, n. 4, 2005.

GRIFFITHS, R.W.; SHAKESPEARE, P.G. Human dermal collagen allografts: a three year histological study. **British Journal Plastic Surgery**, v. 35, n. 4, p.519-23, 1982.

GUTIÉRREZ-SAMPAIO, C.; VERA-GARCIA, F. J.; FIGUEROA-CÁRDENAS, J. D.; GALLEOS-CORONA, M. A.. Bioprótesis de pericárdio bovino tratado com glutaraldeído (PBTG) em la reconstrucción de la pared abdominal. **Cirugia y Cirujanos**, v.70, p. 257-266. 2002.

HADDAD FILHO, D.; MARQUES, A.; KAFEJIAN-HADDAD, A.P.; ZVEIBEL, D.K. Estudo Comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de politetrafluoroetileno expandido em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 19, n. 2, p.131-135, 2004.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, v.19, n.16, p.1419-1423, 1998.

HEYDORN, W.H.; DANIEL, J.S.; WADE, C.E. A new look at pericardial substitutes. **Journal Thoracic Cardiovascular Surgery**, v.94, n. 2, p.291-6, 1987.

IONESCU, I.M.; TANDON, A.P. The Ionescu-Shiley pericardial xenograft heart valve. In: Ionescu MI (ed). Tissue heart valves. London: Butterworth, p. 201, 1979.

JAYAKRISHNAN, A.; JAMEELA, S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. **Biomaterials**. v. 17, n.5, p. 471-484, 1996.

JASSO-VICTORIA, R.; OLMOS-ZUÑIGA, J.R.; GUTIERREZ-MARCOS, L.M.; SOTRES-VEGA, A.; MANJARREZ VELAZQUEZ, J.R.; GAXIOLA-GAXIOLA, M.; AVILA-CHAVEZ, A.; AVENDAÑO MORENO, G.; SANTILLAN-DOHERTY, P. Usefulness of bovine pericardium as interpositional graft in the surgical repair of nasal septal perforations (experimental study). **Journal Investigative Surgery**. v.16, n.4, p.209-17, 2003.

JENKINS, S.D.; KLAMER, T.W.; PARTEKA, J.J.; CONDON, R.E. A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects. **Surgery**, v.94, n. 2, p.392-8, 1983.

JÚNIOR, L.E.F. Manual de Técnicas de Coloração. **Laboratório de Histopatologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos – UFBA**. Salvador – BA, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemistry Journal**. v. 11, n. 4, p. 447-55, 1979.

KIM, B.S.; MOONEY, D.J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends Biotechnology**. v. 16, p. 224-230, 1998.

KIM, B.S.; BAEZ, C.E.; ATALA A. Biomaterials for tissue engineering. **World Journal of Urology**. v. 18, p. 2-9, 2000.

LANGER, R.; CIMA, L.G.; TAMADA, J.A.; WINTERMANTE, E. Future directions in biomaterials. **Biomaterials**, v.11, n.9, p.738-745, 1990.

LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B.; PEREIRA, L. C. Uso de pericárdio bovino conservado em glicerina em cão – Relato de Caso. In: **III Congresso Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária**. Belo Horizonte, MG, p. 109. 1998.

LEITE, J.B.F.; MARQUES, A.F.; GOMES, O.M.; PIGOSSI, N. A glicerina e a preservação dos tecidos. **Revista Paulista Médica**, v.93, p.81-4, 1979.

LUNA, S.P.L.; TEIXEIRA, M.W. Eutanásia: considerações éticas e indicações técnicas. **Revista CFMV**, Ano XIII, n. 41, p.60-69, 2007.

MAIZATO, M. J.S. Avaliação das propriedades do pericárdio bovino liofilizado. Campinas, 2003. 145p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Mecânica.

MAIZATO, M. J.S.; HIGA, O.Z.; MATHOR, M.B.; CAMILLO, M.A.P.; SPENCER, P.J.; PITOMBO, R.N.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; LEIRNER, A.A. Glutaraldehyde-treated bovine pericardium: effects of lyophilization on cytotoxicity and residual aldehydes. **Artificial Organs** v.27, n.8, p.692–694, 2003.

MAIZATO, M. J.S.; PIRES, M.D.; CANZIAN, M.; HIGA, O.Z.; PITOMBO, R.N.M.; LEIRNER, A.A. Histological Evaluation of Biocompatibility of Lyophilized Bovine Pericardium Implanted Subcutaneously in Rats. **Artificial Organs**. v. 32, n. 4, 2008.

MARQUES, A. Pericárdio bovino na reparação da parede abdominal de cães. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, n. 3, p.195-200, 1987.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SCIENCE - NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, site acessado em Janeiro/2009.

OLIVEIRA, V. A. & ALVARENGA, J. Uso de membrana amniótica preservada em glicerina no reparo de feridas cutâneas de membros locomotores de equinos. **In: 15º Congresso Pan-Americano de Ciências Veterinárias**, Campo Grande, 1996.

OLIVER, R.F.; HULME, M.J.; MUDIE, A.; GRANT, R.A. Skin collagen allografts in the rat. **Nature**. v. 258, n. 5535, p.537-9, 1975.

OLIVER, R.F.; GRANT, R.A. Reconstruction of full-thickness loss skin wounds using collagen allografts. **British Journal of Plastic Surgery**. v.32, p.87, 1979.

OLIVER, R.F.; GRANT, R.A.; COX, R.W.; COOKE, A. Effect of aldehyde cross-linking on human dermal collagen implants in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 61, n. 5, p.544-9, 1980.

OLMOS-ZUNIGA, J.R.; JASSO-VICTORIA, R.; SOTRES-VEJA, A.; ARREOLA-RAMÍREZ, J.L.; GAXIOLA-GAXIOLA, M.; VANDA-CANTÓN, B.; SANTILLAN-DOHERTY, P. Utilización de pericardio bovino tratado com glutaraldehido liofilizado, em la reparación de defectos abdominales em ratas. **Cir. gen.** v. 18, n. 3, p.161-5, 1996.

OLMOS-ZUNIGA, J.R.; JASSO-VICTORIA, R.; SOTRES-VEJA, A.; GAXIOLA-GAXIOLA, M.O.; ARGOTE-GREEN, L.M.; LARA-GUERRA, H.; SANTILLAN-DOHERTY, P. Evaluation of the use of bovine pericardium in non-anatomical lung resections in dogs. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 54, n. 4, p.334-41, 2002.

PAIVA, F.P.; MAFFILI, V.V.; SANTOS, A.C.S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. p. 14, 2005.

PIGOSSI, N. Implantação da dura-máter homogênea conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 22, p. 204-212, 1967.

PIGOSSI, N.; RAIA A ALEX A.; GAMA A. H; SOMOSEN O.; HADDAD J.; STOLF, N. A.G.; ZERBINI, E. J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico de dura-máter homóloga conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 17, n. 8, p. 263-278, 1971.

PINTO, T.J. A.; SAITO, T.; GLEREAN, A. Biocompatibilidade de materiais empregados na confecção de próteses cardiovasculares: comparação entre pericárdio de bovino e dacron. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 3, 1993.

PIRES, A.C.; SAPORITO, W.F.; LEÃO, L.E.V.; FORTE, V.; CARDOSO, S.H.; RAMACIOTTI, O. Pericárdio bovino utilizado como remendo no sistema cardiovascular. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 12, n. 2, p. 176-87, 1997

PLUNKETT, S.J. **Procedimentos de Emergência em Pequenos Animais**. 2^a ed. Ed. Revinter, Rio de Janeiro, 2006.

POMERANTZEFF, P.M.A.; BRANDÃO, C.M.A.; CAUDURO, P.; PUIG, L.B.; GRINBERG, M.; TARASOUTCHI, F.; CARDOSO, L.F.; LERNER, A.; STOLF, N.A.G.; VERGINELLI, G.; JATENE, A.D. Biopróteses de pericárdio bovino Fisics-Incor: 15 anos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular** v. 12, n. 4, p.359-366, 1997.

POMERANTZEFF, P.M.A.; BRANDÃO, C.M.A.; GUEDES, M.A.V.; BRAILE, D.M. “Less Stended” bovine pericardial xenograft: A new concept. **Artificial Organs**. v.31, n.1, p.70-86, 2007.

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

RABELO, R.E.; TAVARES, G.A.; PAULO, N.M.; SILVA, L.A.F.; DAMASCENO, A.D.; ANDRADE, M.A.; MARTINS, F.G.; ROMANI, A.F.; SILVA, O.C.; TRINDADE, B.R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4%. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 229-238, 2004.

RAMOS, E.J.B. Biocompatibilidade da tela de polipropileno e da submucosaintestinal de porco na correção de defeitos criados na parede abdominal de cães. Estudo comparativo. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. Dissertação (Mestrado). - Curitiba, 2002.

RANZANI, J. J. T.; GANDOLFI, W.; FRANCO, M.; CASTRO, G. B.; NICOLETTI, J. L. M. Implante de pericárdio de equino preservado em solução de continuidade do diafragma de cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research And Animal Science**, v. 27, n. 1, p. 65-73. 1990.

RICHARDS, W.O.; DOOLIN, E.J.; MIGINSKY, M.P.; MOULTON, A.L. Pharmacologic inhibition of scar contracture of intracardiac prosthetic patches. **Journal Surgery Research**, v.37, n. 1, p.33-42, 1984.

ROBBINS; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed. Ed. Guanabara Koogan, São Paulo, Capítulos 3 e 4. p. 44-45 e 91-93, 2000.

ROBBINS; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª ed. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, Capítulos 2 e 3. p. 50-84 e 92-121, 2005.

SANTILLAN – DOHERTY, P.; JASSO – VICTORIA, R.; SOTRES – VEGA, A.; OLMOS, R.; ARREOLA, J.L.; GARCIA, D.; VANDA, B.; GAXIOLA M. Repair of thoracoabdominal wall defects in dogs using a bovine pericardial bioprosthesis. **Revista de Investigacion Clinica**. v. 47, n. 6, p.439-46, 1995.

SANTILLAN – DOHERTY, P.; JASSO – VICTORIA, R.; SOTRES – VEGA, A.; OLMOS, R.; ARREOLA, J.L.; GARCIA, D.; VANDA, B.; GAXIOLA M.; SANTIBANEZ, A.; MARTIN, S.; CABELLO, R. Thoracoabdominal wall repair with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium. **Journal of Investigative Surgery**. v. 9, n. 1, p.45-55, 1996.

SCHOEN, F.J.; TSAO, J.W.; LEVY, R.J. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. **American Journal of Pathology**. v. 123, p.134-145, 1986.

SCHOEN, F.J. Future directions in tissue heart valves: impact of recent insights from biology and pathology. **Journal of Heart Valve Disease**. v.8, n.4, p.350-8, 1999.

SMITH, V.C.; KNAUF, D.G.; ALEXANDER, J.A. Bovine pericardial patch fibrosis requiring reoperation. **Journal of Investigative Surgery**, v. 1, n. 4, p.289-90, 1988.

SUCU, N.; KARACA, K.; YILMAZ, N.; COMELEKOGLU, U.; AYTACOGLU, B.N.; TAMER, L.; OZEREN, M.; DONDAS, H.A.; OGUZ, Y.; OGENLER, O.; DIKMENGIL, M. Two stage EDTA anti-calcification method for bioprosthetic heart valve materials. **Medical Science Monitoring**., v.12, n. 6, p.MT33-8, 2006.

TAKIGAWA, T.; ENDO, Y. Effects of glutaraldehyde exposure on human health. **Journal Occupation Health**, v.48, n. 2, p.75-87, 2006.

TANAKA, T. Surgical application of glutaraldehyde treated bovine pericardium. **Japanese Journal of Thoracic Surgery**. v. 34, n. 2, p. 107-109, 1981.

TANG, L.; EATON, J. W. Inflammatory Responses to Biomaterials. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 103, p.466-471, 1995.

TRANI, R.A.S. Eficácia das soluções de Glicerina 98% e Glutaraldeído 0,625% na desinfecção de pericárdio de camundongos (*Mus musculus*) experimentalmente inoculados com vírus da Raiva. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

WERLEY, M.S.; BALLANTYNE, B.; NEPTUN, D.A.; LOSCO, P.E. Four-Week repeated skin contact study with glutaraldehyde in rats. **Journal of Toxicology-Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 15, n. 2, p. 179-193, 1996.

VINCENTELLI, A.; LATREMOUILLE, C.; ZEGDI, R.; SHEN, M.; LAJOS, P.S.; CHACHQUES, J.C.; FABIANI, J.N. Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues?. **Annals of Thoracic Surgery**. v.66, n.6, p.55-8, 1998.

VICENTI, F.A. M.; COSTA NETO, J. M.; TALIERI, I. C.; CAMPOS, C. F.; JORGE, A. T.; FERREIRA, A. L.; LAUS, J. L. Emprego da túnica vaginal alógena, preservada em glicerina 98%, no reparo de ceratectomias superficiais em cães. Estudo dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade sobre a reparação cicatricial na transição enxerto-córnea. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, suplemento, p. 40. 2000.

WOODROF, E.A. Use of glutaraldehyde and formaldehyde to process tissue heart valves. In: Ionescu MI (ed). Tissue heart valves. London: Butterworth, p. 347, 1979.

YAMATOOGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIMA, A.F.M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Revista Ciência Rural**, v.35, n.4, jul-ago, 2005.

ZHENG, H.E. Pathological changes in allogenic skin combined radiation-burn injury in rats. **Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Waike Zazhi**. v. 7, n. 2, p. 116-8 e 158, 1991.

ZÚNIGA, J. R. O.; VICTORIA, R.J.; VEJA, A. S.; GAXIOLA, M. O. G.; GREEN, L. M. A.; GUERRA, H. L.; DOHERTY, P. S. Evaluación de la utilidad del pericárdio bovino em resecciones pulmonares no antómicas em perros. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 54, n. 4, p. 334-341. 2002.

ANEXOS

ANEXO 1A – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 1, 2 e 3 (Glicerina 98% - 7, 14 e 30 dias).

ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS		GRUPO 1					GRUPO 2					GRUPO 3				
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5
CÉLULA INFLAMATÓRIA	NEUT.	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
	EOSIN.	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
	MACR.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
	LINF.	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2
	PLASM.	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	2	2	2
	CEL. GIG.	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2
	MAST.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0
LOCAL.	Entre o implante e o músculo					Sobre o implante e entre ele e o músculo					Ao redor do implante					
REPARAÇÃO	ANGIO.	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3	2
	FIBROP.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
	FIBROS.	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	NECR.	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	0	0	2	2	0
	ENCAP.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	REGEN.	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Calcificação		1*	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

* ocorrência de calcificação distrófica na fibra muscular.

S – presença de encapsulamento

ANEXO 1B – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 4, 5 e 6 (Glutaraldeído 0,625% - 7, 14 e 30 dias).

ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS		GRUPO 4					GRUPO 5					GRUPO 6				
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5
CÉLULA INFLAMATÓRIA	NEUT.	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2
	EOSIN.	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	MACR.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	LINF.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	PLASM.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	CEL. GIG.	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	2	2
	MAST.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
LOCAL.	Ao redor do implante					No meio do implante e ao seu redor					No meio do implante e ao seu redor					
REPARAÇÃO	ANGIO.	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3
	FIBROP.	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3
	FIBROS.	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	2	3
	NECR.	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	3	1	1	1	2
	ENCAP.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
REGEN.	2	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	
Calcificação		0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

S – presença de encapsulamento

ANEXO 2A – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 7, 8 e 9 (Glutaraldeído 1,0% - 7, 14 e 30 dias).

ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS		GRUPO 7					GRUPO 8					GRUPO 9				
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5
CÉLULA INFLAMATÓRIA	NEUT.	3	3	2	2	2	2	**	2	3	2	3	2	2	2	2
	EOSIN.	0	0	0	0	0	1	**	1	2	1	0	0	0	0	0
	MACR.	3	3	2	2	2	2	**	2	3	2	3	3	3	3	3
	LINF.	2	2	2	2	2	1	**	1	2	1	2	2	2	2	2
	PLASM.	2	2	2	2	2	0	**	0	0	0	1	1	1	1	2
	CEL. GIG.	1	1	1	1	1	2	**	2	3	2	1	1	1	3	1
	MAST.	0	0	0	2	0	0	**	0	0	0	0	0	1	0	2
	LOCAL.	Ao redor do implante e entre as fibras musculares					Ao redor do implante					No meio do implante e ao seu redor				
REPARAÇÃO	ANGIO.	3	3	3	3	3	**	3	3	3	3	3	3	2	3	2
	FIBROP	3	3	3	3	3	2	**	2	3	2	3	3	1	1	1
	FIBROS	1	1	1	1	1	2	**	2	3	2	3	3	3	3	3
	NECR.	3	3	1	1	1	3	**	1	2	1	3	3	2	1	2
	ENCAP.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	REGEN	2	3	3	2	2	0	**	1	2	1	D	D	D	D	D
Calcificação		0	2*	1*	0	0	0	**	0	0	0	3	1	0	0	1

* ocorrência de calcificação distrófica na fibra muscular. ** material não viável para avaliação microscópica

S – presença de encapsulamento

D – destruição muscular

ANEXO 2B – Tabela com os resultados microscópicos referentes aos Grupos 10, 11 e 12 (Glutaraldeído 1,5% - 7, 14 e 30 dias).

ALTERAÇÕES MICROSCÓPICAS		GRUPO X					GRUPO XI					GRUPO XII				
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5
CÉLULA INFLAMATÓRIA	NEUT.	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2
	EOSIN.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
	MACR.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	LINF.	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	PLASM.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	CEL. GIG.	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	3	1
	MAST.	0	0	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2
	LOCAL.	Entre o implante e o músculo, meio do implante e entre as fibras musculares					No meio do implante e ao seu redor					No meio do implante e ao seu redor				
REPARAÇÃO	ANGIO.	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	2	3	2
	FIBROP	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1
	FIBROS	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	NECR.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	2
	ENCAP.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	REGEN	D/1	D/1	D/1	D/1	D/1	1	1	1	1	1	D	D	D	D	D
Calcificação		0	0	0	0	3	0	1	0	0	0	3	1	0	0	1

S – presença de encapsulamento

D/1 – destruição muscular com leve regeneração

D – destruição muscular

ANEXO 3

GIEMSA - MODIFICADO (LENNERT)

SOLUÇÃO ESTOQUE

Glicerina 54ml

Metanol 84ml

Giemsa 1g

Preparo da solução estoque:

Misturar o giemsa com a glicerina aquecida (60 graus centígrados), deixar esfriar à temperatura ambiente e em seguida adicionar metanol. Estocar em frasco escuro.

SOLUÇÃO DE USO

Água destilada 80ml

Solução de giemsa 20ml

TÉCNICA:

1- Desparafinizar

2- Solução de giemsa 1hora

3- As secções são removidas da solução de giemsa e passadas rapidamente, em poucos segundos, em solução de 100ml de água destilada com 3 a 4 gotas de ácido acético glacial.

4- Diferenciação, com controle microscópico, em solução de álcool a 95%.

5, 6 e 7- Desidratação em álcool isopropílico (rapidamente)

8,9 e 10- Xilol 2'

11- Montar em bálsamo do Canadá

Resultados: Núcleo: azul. Citoplasma: levemente azulado. Hemácia: vermelha

ANEXO 4

HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

SOLUÇÕES:

HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina: 5g

Sulfato de alumínio e potássio

(alumen de potássio): 100g

Óxido amarelo de mercúrio: 2,5g

Água destilada: 1000ml

Álcool absoluto: 50ml

PREPARO DA HEMATOXILINA

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alumen na água morna. Juntam-se as duas soluções adicionando-se o óxido amarelo de mercúrio e deixar ferver em um balão volumétrico durante 5 minutos. Resfriar à temperatura ambiente e, em seguida, filtrar com papel de filtro.

EOSINA A 1%

Eosina: 1g

Água destilada: 100ml

ÁGUA ACÉTICA A 1%

Ácido acético glacial 1ml

Água destilada 100ml

TÉCNICA DE COLORAÇÃO:

- 1- Desparafinizar
- 2- Lavar em água corrente 5'
- 3- Corar com hematoxilina 2'
- 4- Lavar em água corrente 10'
- 5- Corar com eosina 1'
- 6- Passar em água acética a 1% 1'

- 7- Álcool absoluto 5'
- 8- Álcool absoluto 5'
- 9- Álcool absoluto 5'
- 10- Xilol 5'
- 11- Xilol 5'
- 12- Montar no bálsamo do Canadá

Resultados: Núcleo: azul-escuro. Citoplasma: róseo-avermelhado.

ANEXO 5

TRICRÔMICO DE MASSON

SOLUÇÃO 1 (Hematoxilina férrica de Weigert)

Solução A

Hematoxilina 1g

Álcool a 95% 100ml

Solução B

Cloreto férrico a 29% 4ml

Água destilada 95ml

Ácido clorídrico concentrado 1ml

Obs: Misturar as soluções A e B em partes iguais

Solução 2

Solução de biebrich escarlata aquosa a 1% 90ml

Fucsina ácida aquosa a 1% 10ml

Ácido acético glacial 1ml

Solução 3

Ácido fosfomolibdico 5g

Ácido fosfotúngstico 5g

Água destilada 200ml

Solução 4

Azul de anilina 2,5g

Ácido acético 2ml

Água destilada 100ml

Solução 5

Ácido acético glacial 1ml

Água destilada 100ml

TÉCNICA DE COLORAÇÃO

- 1- Desparafinizar
- 2- Fixar em solução de bouin por 1h a 56°C, na estufa.
- 3- Esfriar, lavar em água corrente até remover a tonalidade amarelada
- 4- Lavar em água destilada
- 5- Solução 1 10'
- 6- Lavar em água corrente 10'
- 7- Lavar em água destilada
- 8- Solução 2 5'
- 9- Lavar em água destilada
- 10- Solução 3 10'
- 11- Solução 4 5'
- 12- Lavar em água destilada
- 13- Solução 5 3 a 5'
- 14- Álcool a 95%
- 15- Álcool absoluto 5'
- 16- Álcool absoluto 5'
- 17- Xilol 5'
- 18- Xilol 5'
- 19- Montar em bálsamo do Canadá

Resultados: Fibras colagênicas: azuis. Fibras musculares: verm