

Cristina Gama Pereira Lucena

**ANÁLISE COMPARATIVA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA
E DA MORFOMETRIA DO COLÁGENO PRECOSES E
TARDIAS ENTRE AS TELAS DE POLIPROPILENO,
POLIPROPILENO + POLIGLACTINA E POLIPROPILENO
+ TITÂNIO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2012

Cristina Gama Pereira Lucena

**ANÁLISE COMPARATIVA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA
E DA MORFOMETRIA DO COLÁGENO PRECOSES E
TARDIAS ENTRE AS TELAS DE POLIPROPILENO,
POLIPROPILENO + POLIGLACTINA E POLIPROPILENO
+ TITÂNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Moura Linhares

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Artigiani Neto

São Paulo

2012

Lucena, Cristina Gama Pereira.

Análise comparativa da reação inflamatória e da morfometria do colágeno precoces e tardias entre as telas de polipropileno, polipropileno + poliglactina e polipropileno + titânio. / Cristina Gama Pereira Lucena. - - São Paulo, 2012.
xv, 78f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar.

Título em Inglês: Comparative analysis between polypropylene, polypropylene + poliglactin and polypropylene + titanium meshes: early and late inflammatory response and collagen deposition.

1. hérnia. 2. telas. 3. colágeno. 4. inflamação. 5. VEGF.
6. COX2.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
CIRÚRGICA INTERDISCIPLINAR**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. João Nelson Rodrigues Barroso

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Délcio Matos.

Cristina Gama Pereira Lucena

**ANÁLISE COMPARATIVA DA INFLAMAÇÃO E DA
MORFOMETRIA DO COLÁGENO PRECOSES E
TARDIAS ENTRE AS TELAS DE POLIPROPILENO,
POLIPROPILENO + POLIGLACTINA E POLIPROPILENO
+ TITÂNIO**

Presidente da banca: Prof. Dr. Marcelo Moura Linhares

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gaspar de Jesus Lopes Filho

Prof. Dr. Marcello Fabiano de Franco

Prof. Dr. Marco Antônio Prado Nunes

Prof. Dr. Josiel Paiva Vieira

Dedicatória

A Deus, Inteligência Suprema.

À minha mãe, Liete, e ao meu pai, Gerado, especialmente pelos exemplos.

Ao meu marido, Augusto, e às minhas filhas Laysa e Isabelle pelo amor e pela compreensão.

Ao meu irmão Ricardo, à minha cunhada Eliane ao e meu sobrinho Vinícius.

À minha avó, Laura, e às minhas tias Lizete e Lindinete.

À Aparecida, amiga-irmã.

Aos Drs. Jose Augusto Bezerra, Luiz Carlos Soares de Mello e Nelma Maria Barbosa da Silva, meus primeiros mestres em Cirurgia.

Aos Drs. Wilson Luís Abrantes, Domingos André Drummond, Guilherme Durães Rabelo e Marcus Antônio Oliveira, preceptores da Residência em Cirurgia da Fundação Hospitalar de Minas Gerais.

Ao paciente.

Ao animal de experimentação.

A todos aqueles que, apesar de obstáculos, derrotas e frustrações, persistem determinados na realização de seus ideais com força, coragem, honestidade, dignidade, alegria, esperança e fé. Estas pessoas, embora pareçam comuns, são iluminadas. Basta sua simples presença para encorajar e animar àqueles cuja fé ainda é vacilante e por isso mesmo não descobriram ainda ou duvidam de seus próprios dons e potenciais.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Moura Linhares, orientador desta tese, pela amizade, pelo entusiasmo, pelas correções e pelo rigor com todos os seus orientandos. Particularmente, agradecemos por ampliar nossa perspectiva sobre a ciência e a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Artigiani Neto, nosso co-orientador, pela participação indispensável na avaliação dos parâmetros histológicos e imunohistoquímicos nesta tese.

À Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em especial ao programa de Pós-graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar e ao seu coordenador, o Prof. Dr. Délcio Matos, a quem dedicamos profundo respeito.

Ao Departamento de Patologia da UNIFESP. Ao técnico em Patologia Joaquim Almeida pela colaboração preciosa na confecção das lâminas para avaliação histológica e Imunohistoquímica.

Ao Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), da UNIFESP, ao Prof. Dr. Joao Bosco Pesqueiro e à Dra. Heloísa Alegro. Ao Sr. Emanuel Cardoso, técnico de laboratório, pelo auxílio indispensável.

Às secretárias da Pós-Graduação, os Sras. Cláudia Joanete da Silva e Monica Noleto Miranda pelo apoio eficiente e carinhoso.

À estaticista Gianni Santos pela simpatia e eficiência.

Aos professores e orientadores da Pós-Graduação, especialmente ao Prof. Dr. Alberto Goldenberg pela ajuda direta na aquisição da tela de polipropileno + poliglactina, utilizada nesta pesquisa.

Ao acadêmico Daniel Rezende pela disponibilidade e pelo entusiasmo.

A todos os colegas da Pós-Graduação, destacando-se a Dra. Loreley Luderer pela convivência harmoniosa, amiga divertida e enriquecedora.

Agradecimentos especiais

À FAPESP, pelo “Auxílio a pesquisa”, com o processo 2010/508301.

Ao CAPES, pela “bolsa de Doutorado”, desde 2010.

Sumário

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Agradecimentos Especiais.....	vii
Sumário.....	viii
Listas.....	ix
Resumo.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	7
2 MÉTODO.....	8
4 RESULTADOS.....	20
5 DISCUSSÃO.....	39
6 CONCLUSÕES.....	52
7 ANEXOS.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	71
Abstract	
Bibliografia consultada	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fotografia de um experimento mostrando a anestesia do rato por meio de injeção intraperitoneal, com associação de ketamina 10% e xilazina 2%.....9
- Figura 2. Fotografia de um experimento mostrando a coleta de sangue para a dosagem de citocinas no plexo retro ocular do animal anestesiado....9
- Figura 3. Fotografia de um experimento mostrando a antissepsia com iodopovidine, após a tricotomia da parede abdominal em rato.....10
- Figura 4. Fotografia de um experimento mostrando a incisão para-mediana em .flanco direito do rato (círculo vermelho).....10
- Figura 5. Fotografia: Telas utilizadas nos grupos A (PP – alta densidade), B (PP + PG – baixa densidade) e C (PP + TI – baixa densidade), respectivamente.....11
- Figura 6. Fotografia de um experimento mostrando o aspecto final da fixação da tela na parede abdominal do rato. (círculo vermelho).....11
- Figura 7. Fotografia de um experimento mostrando a sutura da pele do animal com pontos separados de nylon 40.....12
- Figura 8. Quadro demonstrativo da escala empregada para a avaliação da reação inflamatória tecidual.....13
- Figura 9. Quadro demonstrativo da escala complementar para a avaliação da reação inflamatória tecidual.....14
- Figura 10. Fotografia de um experimento: aspecto final do soro armazenado, após a centrifugação das amostras de sangue colhidas para dosagem das citocinas nos ratos.....15
- Figura 11. Quadro demonstrativo da escala para avaliação da expressão imunohistoquímica do VEGF.....17
- Figura 12. Quadro demonstrativo da escala para avaliação da expressão imunohistoquímica da COX2.....17
- Figura 13. Organograma demonstrativo do desenho desta pesquisa, na qual os parâmetros avaliados no estudo anterior (período pós-operatório tardio) são estudados precocemente e comparados com os primeiros.....18

Figura 14. Gráfico tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina IL6 no pré-operatório, 1ºDPO e 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).	20
Figura 15. Gráfico do tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina IL10 no pré-operatório, 1ºDPO e 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	21
Figura 16. Gráfico do tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina TNF α no pré-operatório, 1º DPO e 7º DPO, dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	21
Figura 17. Gráfico do tipo boxplot que ilustra a soma das médias dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual ($S=a+b+c+d+e+f$) nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	23
Figura 18. Fotomicrografia: invasão do infiltrado inflamatório (círculos vermelhos) entre as fibras musculares (setas azuis) em animal do grupo A (PP). Observar a presença de granulomas (setas amarelas). Tricromo de Masson - 200X.....	25
Figura 19. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo do percentual de pixels correspondentes ao colágeno nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	26
Figura 20. Fotomicrografia: deposição de colágeno (coloração vermelho alaranjada – setas), em animais dos grupos A (PP), B(PP + PG) e C (PP + TI). Observar deposição mais uniforme, homogênea no grupo A e a deposição errática, pobre e irregular no grupo B. Picrossirius - 400X.....	26
Figura 21. Gráfico do tipo diagrama de dispersão unidimensional do escore da expressão imunohistoquímica do VEGF nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	27
Figura 22. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para VEGF (em marrom) em animais do grupo A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI). Observar expressão mais intensa no grupo A.....	28

Figura 23. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para VEGF (em marrom) em animal do grupo C (PP + TI). Notar granuloma corpo estranho em animal do grupo C (seta vermelha).....	28
Figura 24. Gráfico: diagrama de dispersão unidimensional do escore da imunohistoquímica para a COX2 nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	29
Figura 25. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para COX2 (em marrom) em animais do grupo A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI)..	30
Figura 26. Fotomicrografia (400X): imunohistoquímica para COX2 (em marrom) em animal do grupo A (PP).....	30
Figura 27. Gráfico do tipo boxplot comparativo da soma ($S=a+b+c+d+e+f$) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos períodos de eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	33
Figura 28. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da contagem dos pixels correspondentes ao colágeno nos animais submetidos a eutanásia nos 7ºDPO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	34
Figura 29. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da expressão imunohistoquímica do VEGF nos períodos de eutanásia no 7ºD PO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	36
Figura 30. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da expressão imunohistoquímica da COX2 nos períodos de eutanásia no 7ºD PO e 40DPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soma (S) da média da pontuação em cada item para a avaliação histológica da reação inflamatória nos animais dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	23
Tabela 2. Escores dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	24
Tabela3. Percentagem de pixels correspondente ao colágeno nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	25
Tabela 4. Demonstração dos escores para expressão imunohistoquímica do VEGF nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	27
Tabela 5. Resultados dos escores da expressão imunohistoquímica da COX2 nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	29
Tabela 6. Comparação da soma (S) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual entre os animais que sofreram eutanásia nos 7ºDPO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI)....	32
Tabela 7. Comparação dos resultados da contagem de pixels correspondentes ao colágeno, nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO, dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	34
Tabela 8. Resultados da imunohistoquímica para VEGF e COX2 nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	35
Tabela 9. Resultados da imunohistoquímica para a COX2 nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).....	37

Lista de abreviaturas

αalfa

βbeta

cm... ..centímetros

cm².centímetros quadrados

400X.....quatrocentas vezes

200X.....duzentas vezes

°C.....graus Celsius

ml.mililitros

μ m.micrômetros

Resumo

Objetivo: avaliar a resposta inflamatória sérica e tecidual, além da morfometria do colágeno nas telas de alta densidade de polipropileno e de baixa densidade de polipropileno + poliglactina e polipropileno + titânio, nos períodos precoce e tardio de pós-operatório. **Método:** trinta ratos machos Wistar, foram alocados aleatoriamente em grupos de 10. No grupo A, foi posicionada uma tela de polipropileno de alta densidade. Nos grupos B e C, implantaram-se telas de baixa densidade, em associação com poliglactina e titânio, respectivamente. No pré-operatório imediato e nos 1ºDPO (dia de pós-operatório) e 7ºDPO, foram dosados as citocinas séricas: VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), IL6 (interleucina 6), TNF α (fator de necrose tumoral alfa) e IL10 (interleucina 10). No 7ºDPO, realizou-se a eutanásia dos ratos com biópsia de fragmento central no sítio de inserção da tela. Usaram-se as colorações hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson para a análise histológica da reação inflamatória através de escala objetiva de pontos. Para a morfometria do colágeno usou-se a coloração picrossirius, sob luz polarizada, com leitura pelo programa de computador *Image Tool*. Estudou-se também a expressão imunohistoquímica do VEGF e da COX2 (ciclooxigenase2), marcadores clássicos da inflamação. Os resultados obtidos foram comparados àqueles provenientes de um estudo anterior, realizado com a mesma metodologia pelo nosso grupo, no qual os parâmetros já descritos foram avaliados no 40ºDPO. As ferramentas estatísticas empregadas foram a Análise de Variância (ANOVA), o método de Tukey, além dos testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e t de Student. Nível de significância α igual a 5%. Software utilizado: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 19.0 for Windows, R-Program versão 2.11.1. **Resultados:** Não houve diferenças estatisticamente significantes nas dosagens de citocinas. No 7º DPO a reação inflamatória tecidual foi similar entre os grupos. O grupo A apresentou maior expressão imunohistoquímica do VEGF ($p < 0,001$) e da COX2 ($p < 0,001$), além da maior deposição de colágeno ($p = 0,03$). O grupo B apresentou menor expressão do VEGF e da COX2 e deposição de colágeno menos intensa. O grupo C apresentou resultados intermediários. Comparando-se os períodos precoce e

tardio, observou-se: semelhante reação inflamatória tecidual entre os períodos estudados, nos grupos A e C, e aumento no grupo B ($p < 0,001$) no 40ºDPO; redução da expressão do VEGF em todos os grupos tardiamente ($p < 0,001$); redução da COX2 no tecido no grupo A ($p = 0,011$) e níveis semelhantes nos grupo B e C no 40ºDPO; redução da deposição de colágeno tardiamente ($p < 0,001$), porém mantendo-se mais intensa no grupo A. **Conclusões:** 1 – Todas as telas apresentaram semelhança nos níveis séricos de citocinas e escores da análise histológica da reação inflamatória precocemente. 2 – A tela de polipropileno + poliglactina, apresentou acentuação do processo inflamatório no 40ºDPO, menor expressão de VEGF e COX2 no tecido e menor deposição de colágeno precoce e tardiamente. 3 - Houve maior expressão do VEGF e da COX2, além da deposição do colágeno mais intensa e organizada, na tela de polipropileno de alta densidade tanto precoce e tardiamente. 3 - A tela de baixa densidade de polipropileno + titânio apresentou resultados intermediários em relação às demais, com redução da expressão do VEGF e manutenção do processo inflamatório tardiamente.

1 INTRODUÇÃO

As hérnias da parede abdominal estão presentes em cerca de 10% da população em geral, constituindo-se em uma afecção encontrada em qualquer faixa etária, mas cuja prevalência tende a aumentar com a idade.⁽¹⁾ Sua correção é a intervenção cirúrgica mais realizada pelos cirurgiões gerais e digestivos. Somente nos Estados Unidos, são realizadas, anualmente, 600.000 reparos cirúrgicos de hérnias.⁽²⁾ Estima-se que mundialmente são realizados mais de 20 milhões de reparos cirúrgicos de hérnias inguinais por ano.⁽³⁾

Enquanto a hérnia inguinal é mais frequente em pacientes do sexo masculino, nas outras hérnias abdominais não há predominância de gênero. A hérnia incisional é a complicação mais comum das laparotomias, especialmente as medianas, e pode ser encontrada em 11% a 23% dos pacientes operados.⁽¹⁾ Esta hérnia é a causa mais frequente de reoperações, após a realização de laparotomias.⁽⁴⁾

Existem vários fatores de importância reconhecida na patogênese das hérnias, especialmente as incisionais, tais como alterações anatômicas, elevação da pressão intra-abdominal, má técnica e infecções cirúrgicas, obesidade, desnutrição, tabagismo, entre outros. No entanto, mais recentemente, alguns estudos implicam alterações na formação da matriz extracelular e do colágeno como mecanismos importantes no aparecimento e na recidiva das hérnias.⁽⁴⁻⁶⁾

No processo de cicatrização da parede abdominal, vários mediadores são sintetizados na região lesada, os quais modulam a cascata inflamatória na fase inicial do processo de reparo da lesão e na formação da cicatriz definitiva.⁽⁷⁾ Destas, as citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas, os fatores de crescimento e de necrose tumoral, são fundamentais na proliferação celular e na síntese da matriz extracelular.⁽⁸⁾

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis para substituir os tecidos orgânicos lesados decorreu do alto índice de recidiva após as cirurgias com sutura primária para correção das hérnias incisionais. Estes implantes, as

chamadas telas, foram responsáveis pela redução da recorrência nestas hérnias de índices superiores a 50% a níveis aproximados de 10%.⁽⁴⁾

As telas são os biomateriais mais utilizados na prática médica, sendo responsáveis por uma taxa de cerca de um milhão e meio de implantes por ano.⁽⁹⁾ Contudo, o mecanismo responsável pela redução da recidiva das hérnias ainda não é completamente conhecido. Embora seja utilizado o tradicional conceito de “reparo livre de tensão”, estudos experimentais apontam outras possibilidades para explicar a atuação da tela na parede abdominal, como, por exemplo, o aumento das propriedades de elasticidade da mesma⁽³⁾ e a suposta capacidade de reverter sua atrofia.⁽¹⁰⁾

Não obstante a redução da taxa de recidivas na correção das hérnias, a aposição de telas na parede abdominal provoca o aumento de complicações pós-operatórias de natureza inflamatória, como seromas, dor crônica, celulite, fístulas, sensação de corpo estranho e rigidez, entre outras.⁽¹¹⁾ Há, inclusive, relato de alteração na fertilidade de homens submetidos ao tratamento cirúrgico de hérnias inguinais com o implante de telas, complicação provavelmente relacionada à reação inflamatória decorrente do contato deste biomaterial com os elementos do cordão espermático.⁽³⁾

Di Vita et al. (2005), demonstraram que a presença da tela no reparo das hérnias está associada a uma elevação dos mediadores pró-inflamatórios. Tal elevação seria proporcional à área da tela implantada.⁽¹²⁾

O polipropileno (PP) ainda é a matéria prima mais largamente utilizada para confecção das telas.⁽¹¹⁻¹⁷⁾ Este biomaterial induz no organismo do hospedeiro uma rápida reação inflamatória local e sistêmica. Esta resposta seria caracterizada pelo aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias. Nesta reação, o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) e o β -FGF (Fator de Crescimento Ativador dos Fibroblastos β) relacionam-se com a angiogênese, com a formação de tecido de granulação e com a proliferação de fibroblastos⁽¹⁴⁾, eventos indispensáveis para a síntese do colágeno, da matriz extracelular e do tecido cicatricial resistente.⁽¹¹⁾

Vaz et al. (2009), em estudo experimental em ratos, demonstraram que o implante da tela de PP na parede abdominal levaria à deposição de colágeno tipo III (imaturo) após o terceiro dia de pós-operatório (DPO). Também, seus resultados mostraram que a produção do colágeno tipo III atingiria o pico no 21ºDPO e decresceria drasticamente no 30ºDPO, quando a deposição do colágeno tipo I (maduro, definitivo) atingiria seu ápice.⁽¹⁸⁾

A reação inflamatória local induzida pelo PP provocaria uma série de inconvenientes como dor, desconforto e sensação de corpo estranho, que afetariam a qualidade de vida do paciente no pós-operatório. Como a magnitude da inflamação dependeria da massa da tela, alguns autores passaram então a comparar telas de menor densidade (*light*), com poros maiores, de diâmetro superior a 1000µm, com a tela de polipropileno convencional, de alta densidade (*heavy*), com poros de cerca de 130-400µm de diâmetro. Teoricamente, para que houvesse uma boa integração do biomaterial no tecido do hospedeiro e profilaxia da infecção, seriam necessários poros com, no mínimo, 75-100µm de diâmetro.⁽⁹⁾

Outros materiais, absorvíveis ou não, foram incorporados na confecção das telas, em associação com o PP.⁽¹⁹⁾ Inúmeras telas de baixa densidade passaram a ser desenvolvidas. Dentre estas, a associação do PP com a poliglactina (PG), material multifilamentar de absorção precoce, que tem sido amplamente estudada.^(8,19)

A tela de PP revestida por titânio (TI) também tem sido objeto de estudos, pois, teoricamente, a conhecida propriedade inerte deste metal contribuiria para diminuir o processo inflamatório desencadeado pelo polipropileno, levando a redução da dor e desconforto pós-operatórios.⁽²⁰⁻²⁵⁾ Esta tela tem sido indicada, inclusive, no reparo de hérnias hiatais,⁽²⁴⁾ embora já existam relatos recentes de complicações.⁽²⁶⁾

Ainda existem divergências sobre o real avanço trazido pelas telas de baixa densidade. Em revisão bibliográfica, Wheyhe et al. (2007) chegaram a conclusão de que estas telas poderiam apresentar algumas vantagens na dor pós-operatória e na sensação de corpo estranho. Porém, possivelmente estariam também associadas a um maior índice de recidiva.⁽⁹⁾

Em uma metanálise, na qual foram comparadas a tela tradicional de PP com a de baixa densidade de PP + PG, implantadas para a correção de hérnias inguinais, Gao et al. (2010) não encontraram diferenças na efetividade de ambas em curto prazo.⁽²⁷⁾ A tela de PP + PG, no entanto, estaria associada à redução da sensação de corpo estranho.⁽²⁷⁾

Smietanski et al. (2012) em metanálise sobre o uso de telas de alta e baixa densidade, também no reparo de hérnias inguinais, não encontraram diferenças entre as mesmas nos índices de recidiva e dor intensa no pós-operatório. Entretanto, notaram menor referência espontânea à dor e à sensação de corpo estranho por parte dos pacientes no implante da tela de PP + PG.⁽²⁸⁾ Tendo em vista os dados descritos acima, estes autores recomendam o emprego das telas de baixa densidade como primeira escolha na cirurgia das hérnias inguinais.⁽²⁸⁾

Todavia, em estudo retrospectivo, comparando-se as duas telas citadas anteriormente, Ladurner et al. (2012), não encontraram diferenças, em longo prazo, relacionadas à qualidade de vida de pacientes submetidos ao reparo de hérnias incisionais.⁽²⁹⁾

A grande questão é que da reação inflamatória dependem a formação da matriz extracelular e a deposição do colágeno, fatores primordiais para evitar a recidiva das hérnias. Portanto, em longo prazo, o resultado da redução da densidade das telas ainda precisa ser melhor esclarecido.⁽¹⁹⁾

A tela ideal seria aquela que atendesse ao binômio: menor complicação e menor recidiva. As dúvidas são inúmeras, não somente quanto à reação inflamatória causada por cada tipo de implante em diferentes etapas do pós-operatório, como também nos seus efeitos na síntese e deposição do colágeno na cicatriz definitiva.

Ao longo dos últimos anos, pesquisas realizadas por diferentes autores apresentaram resultados conflitantes. Brittner et al. (2011) concluíram que, quando comparadas com as a telas de PP de alta densidade, as telas de PP + TI de baixa densidade não afetariam significativamente a dor pós-operatória crônica em reparos vídeo-laparoscópicos.⁽³⁰⁾ Porém, Huber et al. (2012), em

metanálise, consideraram que as telas constituídas inteiramente de PP apresentaram a pior resposta tecidual no hospedeiro, quando comparadas às telas mistas.⁽³¹⁾

Alguns autores propõem o tratamento ou cobertura da superfície das telas com diversas substâncias cuja finalidade seria diminuir a reação inflamatória provocada pelas mesmas. Regis et al. (2012) consideram que o PP seria o material mais adequado na confecção das telas e propuseram seu tratamento com hidróxido de sódio, método o qual poderia reduzir a sua reação inflamatória, sem o comprometimento das suas características estruturais.⁽³²⁾ Já Altinel et al. (2012) afirmaram que a cobertura da tela de PP com quitosana seria ineficiente na redução da formação de aderências, no aumento da força tênsil da parede abdominal e da atenuação da resposta tecidual do hospedeiro.⁽³³⁾

Após a realização de um estudo experimental em coelhos, Pascual et al. (2012) sugeriram que a presença de material absorvível nas telas de baixa densidade poderia aumentar o processo inflamatório e reduzir a síntese dos fatores de crescimento e a deposição do colágeno, indispensáveis à formação de uma cicatriz definitiva adequada.⁽³⁴⁾

Em revisão sistemática, realizada pela Cochrane em 2008, para analisar os procedimentos cirúrgicos abertos no reparo de hérnias incisionais, os autores mostraram que existe um bom nível de evidência indicando que o implante de telas seria superior à sutura primária na prevenção da recidiva.⁽³⁵⁾ Contudo, este procedimento seria inferior à sutura simples em relação à presença da infecção de parede. Além disso, haveria evidências insuficientes para estabelecer o melhor tipo de tela, o melhor posicionamento da mesma, ou a melhor técnica cirúrgica a ser utilizada na correção das hérnias incisionais.⁽³⁵⁾

Em estudo experimental em ratos, nosso grupo comparou a tela de alta densidade de PP com uma tela de baixa densidade de PP + PG e outra, também de baixa densidade, constituída de PP + TI, em relação a mediadores inflamatórios séricos, reação inflamatória tecidual e deposição de colágeno tardias (40ºDPO). Nossos resultados mostraram semelhança entre os grupos em relação à resposta inflamatória sérica. Houve maior reação inflamatória

tecidual tardia na tela de PP + PG e menor na tela de PP, enquanto a deposição de colágeno tardio foi maior na tela de PP e menor da tela de PP + PG. A tela de PP + TI apresentou valores intermediários em relação às demais, quanto às variáveis estudadas acima.^(36,37)

Estes resultados levantaram aos seguintes questionamentos:

- Se da reação inflamatória depende a deposição de colágeno, há uma aparente contradição: a tela convencional de PP apresentou tardiamente menor reação inflamatória, porém com uma maior deposição desta proteína, exatamente o oposto da tela de baixa densidade de PP + PG.

- Se fosse estudado um período mais precoce de pós-operatório, seria possível documentar uma resposta inflamatória tecidual mais intensa na tela de PP e, que poderia ter associação com a maior deposição tardia nesta tela?

- O prolongamento da reação inflamatória na tela de PP + PG poderia ter sido o fator responsável pela inibição de uma maior deposição de colágeno tardiamente?

- Poderiam ser evidenciadas diferenças entre as telas em relação às moléculas pró-inflamatórias presentes no tecido do hospedeiro, especialmente os fatores de crescimento relacionados com a deposição do colágeno, os quais não foram detectados no sangue dos animais?

- Poder-se-ia estabelecer um padrão para a resposta inflamatória provocada no hospedeiro pelo implante de cada uma das telas estudadas ao longo do tempo?

Este estudo, já inserido numa linha de pesquisa sobre o tema *reparo cirúrgico das hérnias abdominais com tela*, foi realizado para tentar responder algumas das perguntas enumeradas acima.

1. 1 - Objetivos.

1 – Comparar (no 7ºDPO) a tela convencional de PP com as telas de baixa densidade de PP + PG e PP + TI em relação à reação inflamatória precoce sérica (citocinas inflamatórias) e tecidual (Histologia e Imunohistoquímica), bem como à morfometria do colágeno.

2 – Comparar a reação inflamatória precoce (7ºDPO) e tardia (40ºDPO) na tela de PP com as telas de baixa densidade de PP + PG e PP + TI em relação às alterações histológicas, às citocinas inflamatórias séricas e teciduais, bem como à morfometria do colágeno.

2 MÉTODO

O protocolo desta pesquisa foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP e aprovado em maio de 2010 (CEP 0285/07), conforme registro no anexo 1.

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP com recursos do fundo de auxílio à pesquisa, de acordo com o protocolo nº 2010508301, conforme registro no anexo 2.

3.1 – Amostra

Utilizaram-se 30 ratos machos da linhagem albina da raça Wistar, com idade de três meses e cujos pesos variaram de 250 a 300 gramas. A amostra foi proveniente do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais da UNIFESP (CEDEME).

Os animais foram aleatoriamente alocados em três grupos com 10 ratos cada, de acordo com o tipo de tela empregada.

Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos em condições constantes e similares de temperatura, luminosidade e alimentação. Os ratos foram acompanhados pela equipe de Veterinária da Instituição, seguindo-se as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 - Cirurgias

Os procedimentos operatórios foram realizados no CEDEME.

Inicialmente, realizou-se um estudo piloto com cinco animais, de modo a permitir a aplicabilidade do método cirúrgico e da coleta de amostras de sangue para marcadores séricos.

Os ratos permaneceram em jejum por período de 8 horas antes da cirurgia. A anestesia foi feita com a associação de cloridrato de ketamina a 10% + xilazina a 2%, por injeção intraperitoneal, na dose de 0,1ml da solução por 100g de peso, conforme demonstrado na figura 1.



Figura 1. Fotografia de um experimento mostrando a anestesia do rato por meio de injeção intraperitoneal, com associação de ketamina 10% e xilazina 2%.

Imediatamente após a anestesia, foi realizada coleta de sangue no plexo retro ocular de cada animal para dosagens de citocinas, utilizando-se um capilar de vidro, conforme mostra a figura 2.



Figura 2. Fotografia de um experimento mostrando a coleta de sangue para dosagem de citocinas no plexo retro ocular do animal anestesiado.

Realizou-se, a seguir, a tricotomia da parede anterior do abdome com aparelho elétrico, seguida de antissepsia com solução de iodopovidine tópico, conforme mostra a figura 3.



Figura 3. Fotografia de um experimento mostrando a antissepsia com iodopovidine tópico, após a tricotomia da parede abdominal em rato.

Utilizou-se técnica asséptica nas cirurgias.

O procedimento cirúrgico iniciou-se com uma incisão longitudinal de 4cm de extensão no flanco direito de cada animal, como ilustra a figura 4. Em seguida, foi retirado um fragmento da musculatura anterior do abdome, medindo 2cm x 1cm.



Figura 4. Fotografia de um experimento mostrando a incisão paramediana em flanco direito do rato.

No grupo A, posicionou-se uma tela constituída de polipropileno (PP) monofilamentar, de alta densidade (Intracorp[®], Venkuri – BR). No grupo B, a tela utilizada foi a de poros grandes, constituída de polipropileno e poliglactina (PP + PG), de baixa densidade (Vyproll[®], Ethicon – USA) e no grupo C usou-se uma tela de poros grandes de polipropileno, revestida de titânio (PP + TI), de

baixa densidade (Timesh[®], GfE – GER). A figura 5 ilustra as telas utilizadas neste estudo.

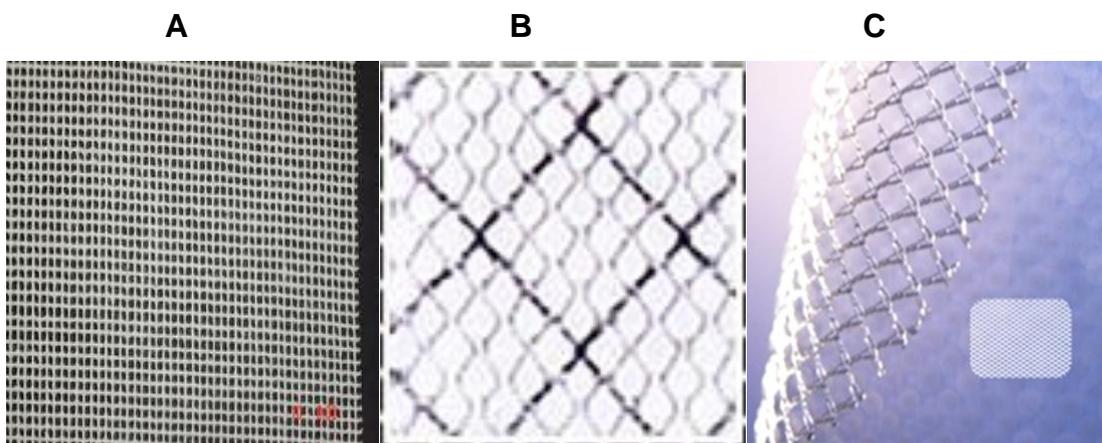


Figura 5. Fotografia: Telas utilizadas nos grupos A (PP – alta densidade), B (PP + PG – baixa densidade) e C (PP + TI – baixa densidade), respectivamente.

Todas as telas tiveram a mesma medida, 6 cm² (3cm x 2cm). Como método padronizado para todos os animais, as telas foram fixadas com seis pontos separados de fio de polipropileno número 3-0, sendo três pontos posicionados em cada borda lateral das mesmas (figura 6).

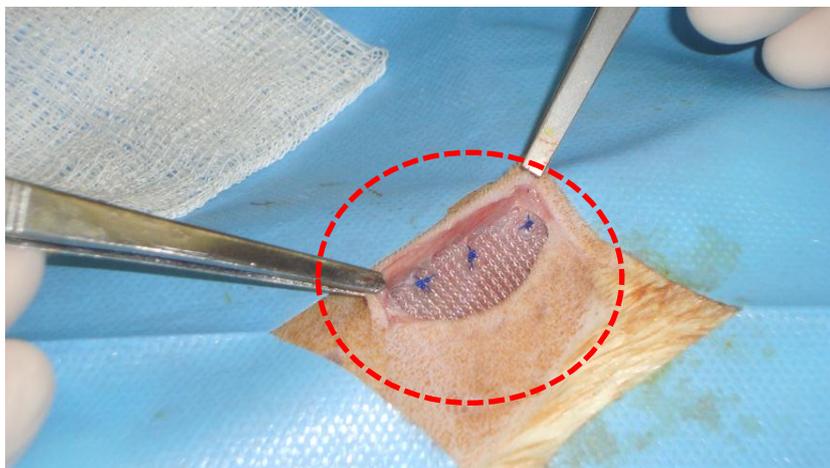


Figura 6. Fotografia de um experimento mostrando o aspecto final da fixação da tela na parede abdominal do rato (círculo vermelho).

Finalmente, realizou-se a sutura da pele dos animais com pontos separados de fio de nylon 4-0, como mostra a figura 7.



Figura 7. Fotografia de um experimento mostrando a sutura da pele do animal com pontos separados de nylon 40.

Os animais foram avaliados diariamente, observando-se complicações, conforme protocolo estabelecido (anexo 3).

No sétimo dia pós-operatório (7^oDPO) procedeu-se a eutanásia dos animais com dose letal de ketamina. Retirou-se um fragmento da área central da região da tela, distando o máximo possível das suas bordas nas quais foram fixados os pontos.

O material foi encaminhado para análise histológica, após fixação com formol tamponado a 10%.

3.3 – Histologia

A análise histológica desta tese foi realizada no Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, por um patologista especializado e com grande experiência (RAN).

3.3.1 – Reação inflamatória

Apos fixação, as peças foram submetidas a processamento de rotina, recebendo tratamento com xilol e inclusão em parafina. As mesmas foram submetidas à microtomia e à coloração pelos métodos hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson.

Para uma análise mais objetiva, utilizou-se uma escala numérica com pontuação atribuída a cada item, conforme demonstrado na figura 8.⁽³⁸⁾

<p>A* - Camadas de células na periferia dos granulomas.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - 01 a 04 camadas.</p> <p>2 - 05 a 09 camadas.</p> <p>3 - 10 a 30 camadas.</p> <p>4 - > 30 camadas.</p> <p>B* - Reação inflamatória no tecido do hospedeiro.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - Tecido fibroso, maduro, não denso.</p> <p>2 - Tecido fibroso imaturo, com fibroblastos e pouco colágeno.</p> <p>3 - Tecido granuloso e denso, com fibroblastos e muitas células inflamatórias.</p> <p>4 - Massa de células inflamatórias, com desorganização do tecido conjuntivo.</p> <p>C* - Resposta inflamatória na superfície da tela.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - Fibroblastos, sem macrófagos ou células corpo estranho.</p> <p>2 - Focos isolados de macrófagos ou células corpo estranho.</p> <p>3 - Uma camada de macrófagos e células corpo estranho.</p> <p>4 - Múltiplas camadas de macrófagos e células corpo estranho.</p> <p>D* - Maturação tecidual.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - Tecido intersticial, maduro, denso, semelhante ao conjuntivo ou adiposo normais.</p> <p>2 - Interstício com vasos sanguíneos, fibroblastos e poucos macrófagos.</p> <p>3 - Interstício com células gigantes e inflamatórias, mas com conjuntivo de permeio.</p> <p>4 - Massa de células inflamatórias, sem tecido conjuntivo de permeio</p> <p style="text-align: right;">Harrell et al⁽³⁸⁾</p>

Figura 8. Quadro demonstrativo da escala empregada para a avaliação da reação inflamatória tecidual.

Foram acrescentados ainda dois itens complementares, incluídos também em nosso estudo anterior (aos quais também foi atribuída pontuação de valores de 01 a 04), conforme pode ser observado na figura 9.⁽³⁶⁾

<p>E - Presença de células gigantes.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - Ausente.</p> <p>2 - Isoladas</p> <p>3 - Em grupos de até 3.</p> <p>4 - Em grupos superiores a 3.</p> <p>F – Invasão inflamatória na musculatura adjacente a tela.</p> <p>PONTOS LEGENDA</p> <p>1 - Ausente.</p> <p>2 - Presença de infiltrado inflamatório em focos isolados.</p> <p>3 - Presença de infiltrado inflamatório entre fibras musculares.</p> <p>4 - Presença de infiltrado inflamatório entre feixes de fibras.</p> <p style="text-align: right;"><i>Lucena et al</i> ⁽³⁶⁾</p>

Figura 9. Escala complementar para a avaliação da reação inflamatória tecidual.

A avaliação histológica foi realizada em microscópio óptico com aumento de 400X, após a escolha dos campos em aumentos inferiores. Todas as análises foram realizadas de modo independente pela autora e por um patologista de reconhecida experiência (RAN), o qual desconhecia o grupo de procedência das mesmas.

O campo avaliado foi escolhido em aumento de 200X na transição entre a tela e o tecido do hospedeiro, onde houve maior concentração dos elementos a serem estudados, em cada item.

3.3.2 – Análise morfométrica do colágeno.

Utilizou-se a coloração Picosirius com luz polarizada. Os cortes foram desparafinados, hidratados e corados em solução de Sirius Red a 0,1% por um período de uma hora (Sirius Red F3B200[®], Mobay Chemical Co. Union, EUA). Em seguida, as lâminas foram banhadas com ácido pícrico aquoso saturado. Posteriormente, foram lavados em água corrente e contra-corados com Hematoxilina de Harris por cinco minutos.

As lâminas foram submetidas à luz polarizada e suas imagens foram capturadas por um sistema constituído por microscópio Olympus BX51 (acoplado a uma câmara de marca Olympus) e um computador Pentium com quatro gigabytes de memória.

Empregou-se o aumento de 400X e a escolha do campo a ser utilizado foi definida pela área de maior concentração de colágeno, ou seja, de coloração vermelho alaranjada.

A contagem dos pixels, correspondentes ao colágeno, foi feita em um microcomputador de marca Sony com quatro gigabytes de memória, pelo programa “*Image Tool*” (versão 3.0).

Foram obedecidos os seguintes passos para a contagem dos pixels correspondentes ao colágeno no “*Image Tool*”:

- A imagem colorida (picrossirius) selecionada foi transformada para a escala de cinza.
- A seguir, foi acionado o comando “*threshold*” automático.
- Para melhor visualização, inverteu-se a imagem. O colágeno passou então a corresponder à cor branca.
- A contagem dos pixels brancos e pretos e sua percentagem foram feitas pelo comando “*Count Black/White Pixels*”, sendo apresentadas na forma de tabela para o leitor.

3.4 – Citocinas.

Após anestesia dos animais, colheu-se 0,1ml de sangue antes da cirurgia, no 1ºDPO e no 7ºDPO. A amostra foi centrifugada. O soro sobrenadante foi pipetado e armazenado a -20°C (figura 10).

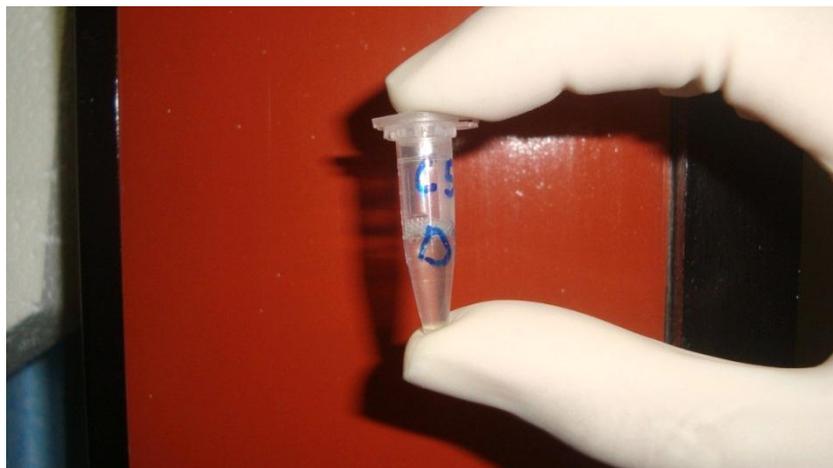


Figura 10. Fotografia de um experimento: aspecto final do soro armazenado após centrifugação das amostras de sangue colhidas para dosagem das citocinas nos ratos.

Dosagens de IL10, IL6, VEGF E TNF α foram realizadas através do método *Lincoplex*[®], no qual anticorpos de captura em microesferas ligam-se à substância específica estudada. Em seguida são adicionados anticorpos de detecção, os quais também se ligam ao complexo anticorpo de captura-substância e possibilitam a emissão de um sinal fluorescente. Realiza-se a leitura do valor da dosagem no equipamento *Luminex 100*[®] através de sistema duplo de lasers.

3.5 – Imunohistoquímica

Dos blocos parafinados, contendo o material histológico dos ratos que sofreram eutanásia no 7^oDPO, foram preparadas lâminas silanizadas para a pesquisa de VEGF e COX2 no tecido através de reação de imunohistoquímica padronizadas (anexos 4 e 5).

Para a pesquisa do VEGF e da COX2 foram seguidas as seguintes etapas, nesta ordem:

- identificação do anticorpo;
- recuperação antigênica;
- bloqueio da peroxidase endógena;
- incubação com o anticorpo primário;
- incubação com o polímero de uma etapa;
- revelação e contra coloração;
- desidratação e montagem.

Foram utilizados anticorpos policlonais de coelho das marcas Dbs (Santa Cruz Biotechnology, inc.) e Spring (Spring Cold Spring Harbor Laboratory, USA) para o VEGF e a COX2, respectivamente.

Os blocos dos animais de estudo anterior, realizado pelo nosso grupo, os quais sofreram eutanásia no 40^o DPO, passaram pelo mesmo processo descrito acima.

Para análise objetiva dos dados, empregaram-se escalas,^(39, 40) as quais atribuíram pontuações para a expressão dos marcadores estudados, baseadas na porcentagem de células coradas e na intensidade da reação, conforme pode ser observados nas figuras 11 e 12.

VEGF – % de células coradas	pontuação
Até 25%	1
26 a 50%	2
51 a 75%	3
76 a 100%	4
VEGF – intensidade da reação	
Fraca	1
Média	2
Forte	3
<i>Henriques et al.⁽³⁹⁾</i>	

Figura 11. Quadro demonstrativo da escala para avaliação da expressão imunohistoquímica do VEGF.

COX2 – % de células coradas	pontuação
Até 25%	1
26 a 50%	2
51 a 100%	3
COX2 – intensidade da reação	
Fraca	1
Média	2
Forte	3
<i>Kim et al.⁽⁴⁰⁾</i>	

Figura 12. Quadro demonstrativo da escala para avaliação da expressão imunohistoquímica da COX2.

O Organograma representativo do desenho deste estudo pode ser observado na figura 13.

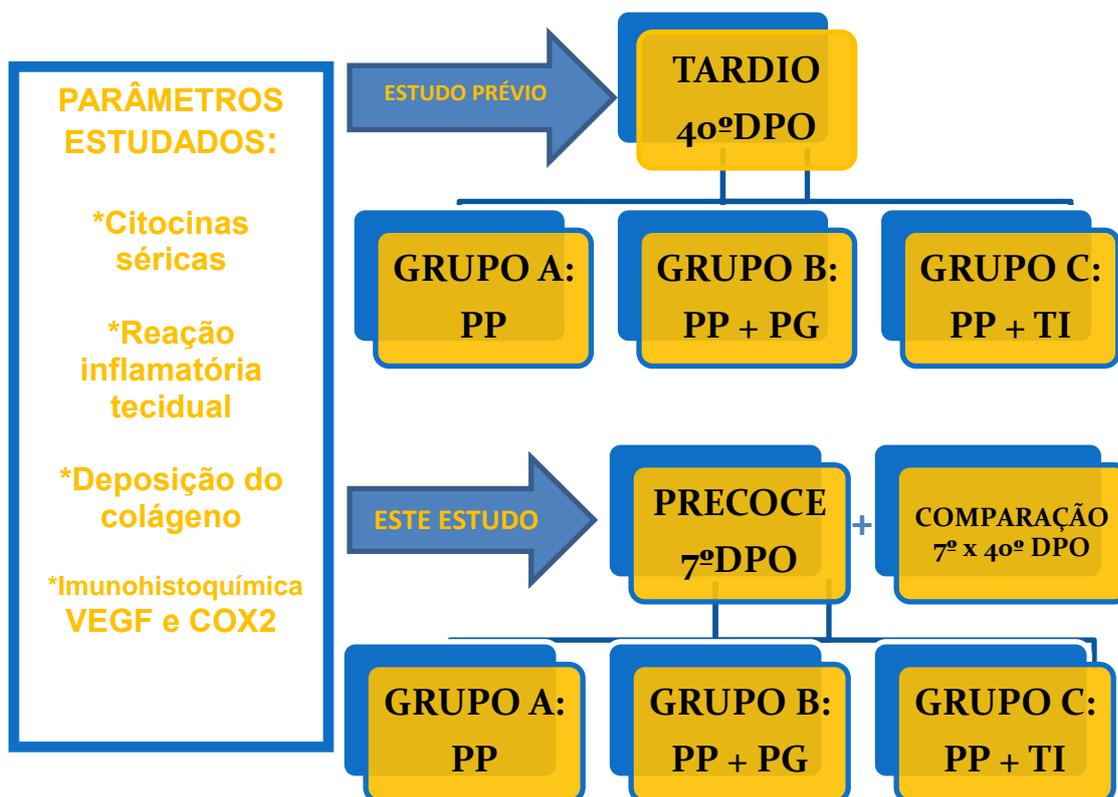


Figura 13. Organograma demonstrativo do desenho desta pesquisa, na qual os parâmetros avaliados no estudo anterior (período pós-operatório tardio) são estudados precocemente e comparados com os primeiros.

3.7 - Análise estatística.

A análise estatística de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva.

Para as variáveis de natureza quantitativa (numérica) foram calculadas algumas medidas-resumo, como média, mediana, valores mínimo e máximo, desvio-padrão, e confeccionados gráficos do tipo diagrama de dispersão unidimensional e boxplot. As variáveis de natureza qualitativa (categorizada) foram analisadas através do cálculo de frequência absoluta e relativa.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância α igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do *Excel 2010 for Windows* para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o software *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 19.0 for Windows*, *R-Program* versão 2.11.1.

3.6.1 – Análise dos dados referentes aos animais que sofreram eutanásia no 7º DPO.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Análise de Variância com Medidas Repetidas para as citocinas, além das comparações múltiplas pelo método de Tukey, quando necessário.

- Teste de Kruskal-Wallis nas comparações dos escores dos itens da reação inflamatória tecidual e de VEGF e COX2.

- Análise de Variância com um Fator Fixo nas comparações da soma dos itens **a, b, c, d, e, f** da reação inflamatória tecidual, além da morfometria do colágeno.

Ressalte-se que, nas análises estatísticas, as medidas consideradas indetectáveis nas dosagens da citocinas foram padronizadas com o valor **zero**.

3.6.2 – Comparação entre os animais submetidos à eutanásia nos 7º e 40º DPO.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Teste de Mann-Whitney na comparação dos escores da reação inflamatória, do VEGF e da COX2.

- Teste t de Student para amostras independentes nas comparações da soma dos itens **a, b, c, d, e, f** da reação inflamatória e da morfometria do colágeno.

3 RESULTADOS

1 – Animais submetidos à eutanásia no 7º DPO.

Na amostra utilizada neste estudo, houve dois óbitos nos animais do grupo A, um óbito no grupo B e outro no grupo C. Todos os óbitos ocorreram no período do pós-operatório imediato e foram relacionados com a necessidade de aumento da dose de anestésicos para a realização dos procedimentos cirúrgicos.

1.1 – Citocinas

As dosagens das citocinas (VEGF, IL6, IL10 e TNF) foram mensuradas em três momentos de tempo distintos: no pré-operatório imediato, no 1ºDPO e no 7ºDPO. As figuras 14 a 16 trazem o resumo da evolução das dosagens de IL6, IL10 e TNF α no período avaliado.

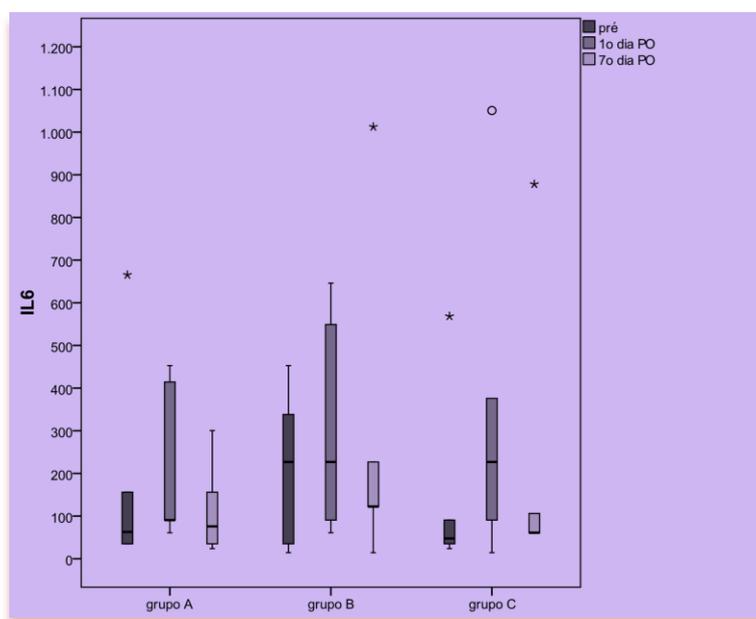


Figura 14. Gráfico tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina IL6 no pré-operatório, 1ºDPO e 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

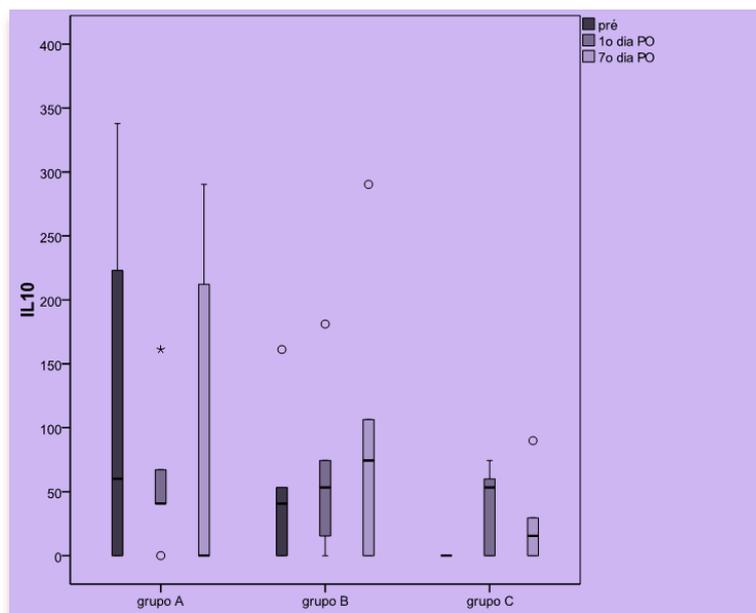


Figura 15. Gráfico do tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina IL10 no pré-operatório, 1ºDPO e 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

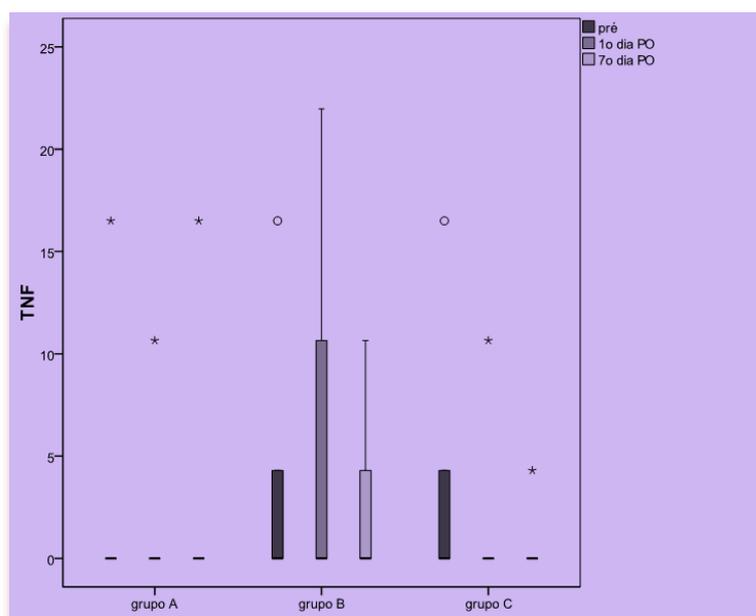


Figura 16. Gráfico do tipo boxplot, demonstrativo dos valores das dosagens da citocina TNF α no pré-operatório, 1º DPO e 7º DPO, dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

Na avaliação individual de cada grupo, os níveis médios das citocinas IL6 ($p=0,916$), IL10 ($p=0,812$) e TNF α ($p=0,886$) não sofreram alteração estatisticamente significativa ao longo dos três momentos de tempo estudados.

Do mesmo modo, na comparação dos níveis médios entre os grupos, em momentos similares de tempo, também não houve alteração estatisticamente significativa para IL6 ($p=0,470$), IL10 ($p=0,855$) e TNF α ($p=0,778$).

A comparação do nível médio geral das citocinas mostrou similaridade entre os grupos para IL6 ($p=0,577$) e TNF α ($p=0,536$). Porém, houve diferença estatisticamente significativa na média da dosagem da IL10 (**$p=0,030$**), onde:

- o grupo A teve nível médio de IL10 semelhante quando comparado ao grupo B ($p=0,563$)
- o grupo A teve nível médio de IL10 maior quando comparado ao grupo C (**$p=0,026$**)
- o grupo B teve nível médio de IL10 semelhante quando comparado ao grupo C ($p=0,156$).

Neste estudo, a dosagem sérica do VEGF mostrou-se indetectável em todos os animais, exceto no animal B7 no 7ºDPO, razão pela qual a mesma não foi submetida à análise estatística.

1.2 – Reação inflamatória tecidual

A soma da média dos itens relacionados à resposta tecidual inflamatória nos grupos estudados é apresentada na tabela 1 e na figura 17.

Tabela 1: Soma (S) da média da pontuação em cada item para a avaliação histológica da reação inflamatória nos animais dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

		$S=a^*+b^*+c^*+d^*+e^*+f^*$
grupo A	N	8
	média	14,5
	desvio-padrão	2,1
grupo B	N	9
	média	13,3
	desvio-padrão	1,9
grupo C	N	9
	média	13,3
	desvio-padrão	1,8
Total	N	26
	média	13,7
	desvio-padrão	1,9
p		0,380*

LEGENDA: *Análise de Variância (ANOVA) com 1 Fator Fixo; a* = camadas de células na periferia dos granulomas; b* = reação inflamatória no tecido do hospedeiro; c* = resposta inflamatória na superfície da tela; d* = maturação tecidual; e* = presença de células gigantes, f* = invasão inflamatória na musculatura adjacente a tela.

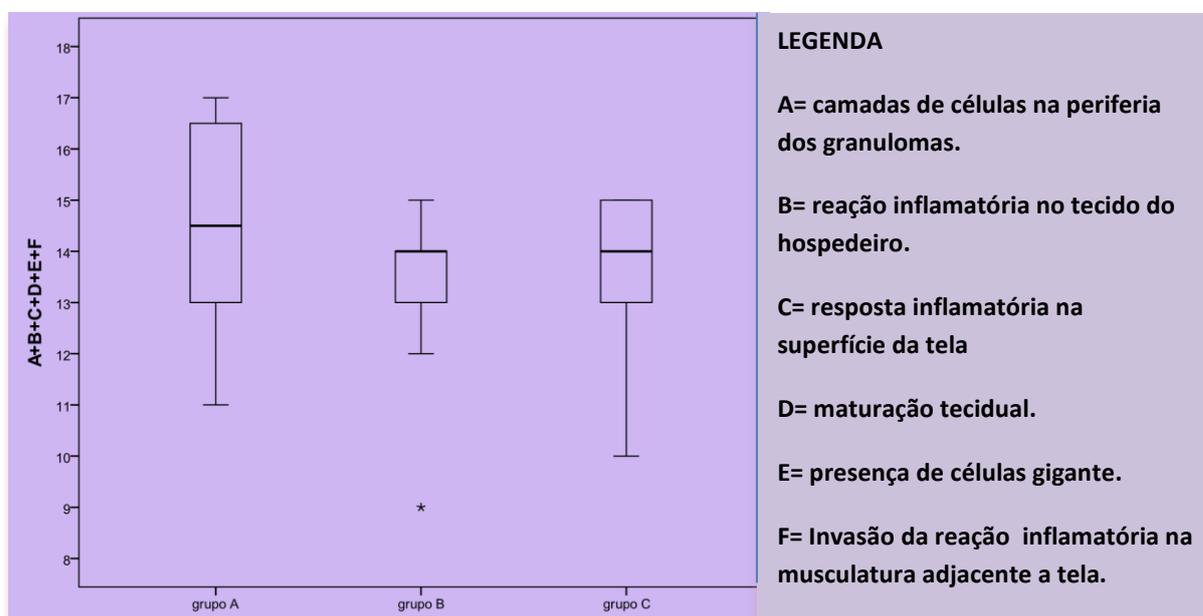


Figura 17. Gráfico do tipo boxplot que ilustra a soma das médias dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual ($S=A+B+C+D+E+F$), nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

Não houve diferença do ponto de vista estatístico na soma da pontuação dos itens relativos à inflamação tecidual entre os grupos ($p=0,380$).

Entretanto, isoladamente, no item *f* (invasão da musculatura da parede abdominal do hospedeiro pelo processo inflamatório decorrente do implante da tela) houve maior escore no grupo A ($p=0,006$), conforme demonstrado na tabela 2 e na figura 18.

Tabela 2: Medidas-resumo dos escores dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

		item a*	item b*	item c*	item d*	item e*	item f*
grupo A							
	N	8	8	8	8	8	8
	média	1,38	2,50	3,00	2,63	2,00	3,00
	desvio-padrão	0,52	0,53	1,20	0,52	0,00	1,07
grupo B							
	N	9	9	9	9	9	9
	média	1,56	2,67	2,33	2,89	2,56	1,33
	desvio-padrão	0,53	0,50	0,87	0,33	1,01	0,50
grupo C							
	N	9	9	9	9	9	9
	média	1,33	2,56	2,00	3,00	2,56	1,89
	desvio-padrão	0,50	0,73	0,50	0,00	0,53	0,78
Total							
	N	26	26	26	26	26	26
	média	1,42	2,58	2,42	2,85	2,38	2,04
	desvio-padrão	0,50	0,58	0,95	0,37	0,70	1,04
	p	0,612*	0,764*	0,134*	0,101*	0,087*	0,006*

LEGENDA: * = teste de Kruskal-Wallis, a* = camadas de células na periferia dos granulomas, b* = reação inflamatória no tecido do hospedeiro, c* = resposta inflamatória na superfície da tela, d* = maturação tecidual, e* = presença de células gigantes e f* = Invasão da reação inflamatória na musculatura adjacente a tela.

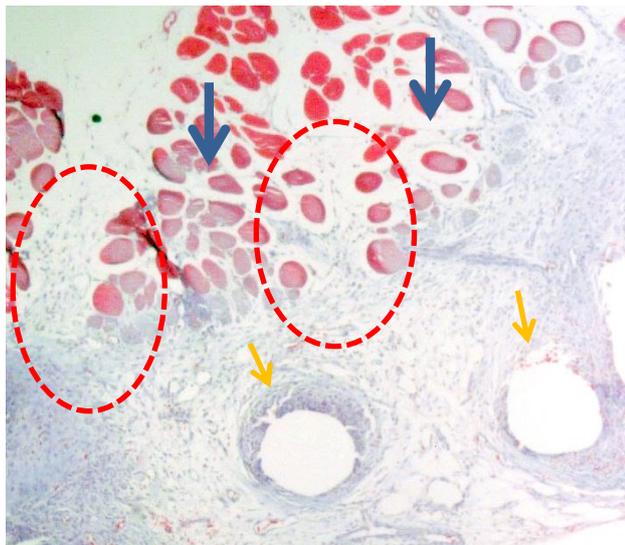


Figura 17. Fotomicrografia: invasão do infiltrado inflamatório (círculos vermelhos) entre as fibras musculares (setas azuis) em animal do grupo A (PP). Observar a presença de granulomas (setas amarelas). Tricrômico de Masson - 100X.

1.3 – Colágeno

Os resultados da avaliação da percentagem de pixels correspondentes ao colágeno nos grupos A, B e C encontram-se na tabela 3 e nas figuras 19 e 20.

Tabela 3. Percentagem de pixels correspondente ao colágeno nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

grupo	N	média	mínimo	máximo	desvio-padrão	p^*
A	7	33,62	22,62	40,50	6,43	
B	8	20,89	4,38	36,99	9,94	
C	9	26,27	13,71	40,84	8,55	
Total	24	26,62	4,38	40,84	9,63	($p=0,030$)*

*ANOVA com um fator fixo

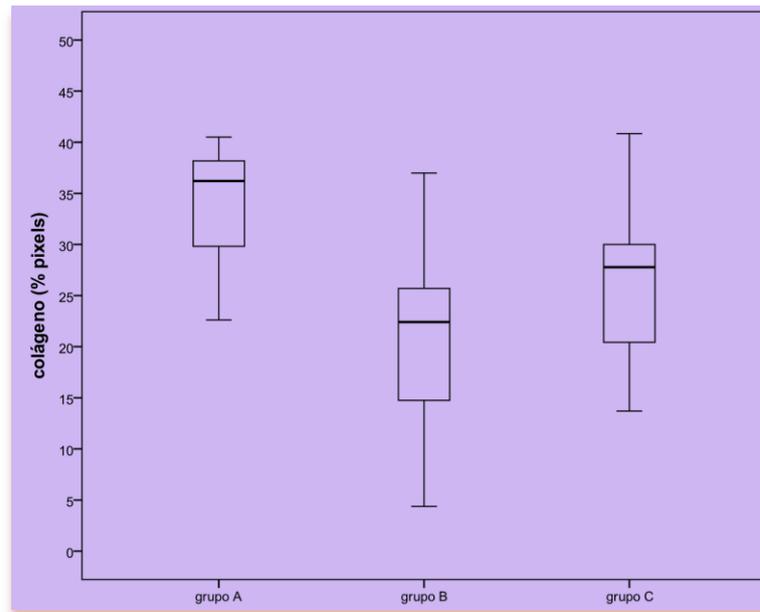


Figura 19. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo do percentual de pixels correspondentes ao colágeno nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).



Figura 20. Fotomicrografia: deposição de colágeno (coloração vermelho alaranjada – setas vermelhas), em animais dos grupos A (PP), B(PP + PG) e C (PP + TI). Observar deposição mais uniforme e homogênea no grupo A e a deposição errática, pobre e irregular no grupo B. Picrossirius – 400X.

O nível médio de colágeno foi diferente entre os grupos ($p=0,030$), conforme demonstrado a seguir:

- o grupo A apresentou nível médio de colágeno maior quando comparado ao grupo B ($p=0,023$).
- o grupo A apresentou nível médio de colágeno semelhante quando comparado ao grupo C ($p=0,225$).
- o grupo B apresentou nível médio de colágeno semelhante quando comparado ao grupo C ($p=0,411$).

1.4 – Imunohistoquímica

1.4.1 – VEGF

A tabela 4 e as figuras 21 a 23 resumem as informações sobre os escores obtidos para imunohistoquímica do VEGF dos grupos A, B e C.

Tabela 4: Demonstração dos escores para expressão imunohistoquímica do VEGF nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

		VEGF
grupo A	N	8
	média	6,9
	desvio-padrão	0,4
grupo B	N	9
	média	4,3
	desvio-padrão	0,5
grupo C	N	9
	média	5,2
	desvio-padrão	0,8
Total	N	26
	média	5,4
	desvio-padrão	1,2
p		<0,001*

*teste de Kruskal-Wallis

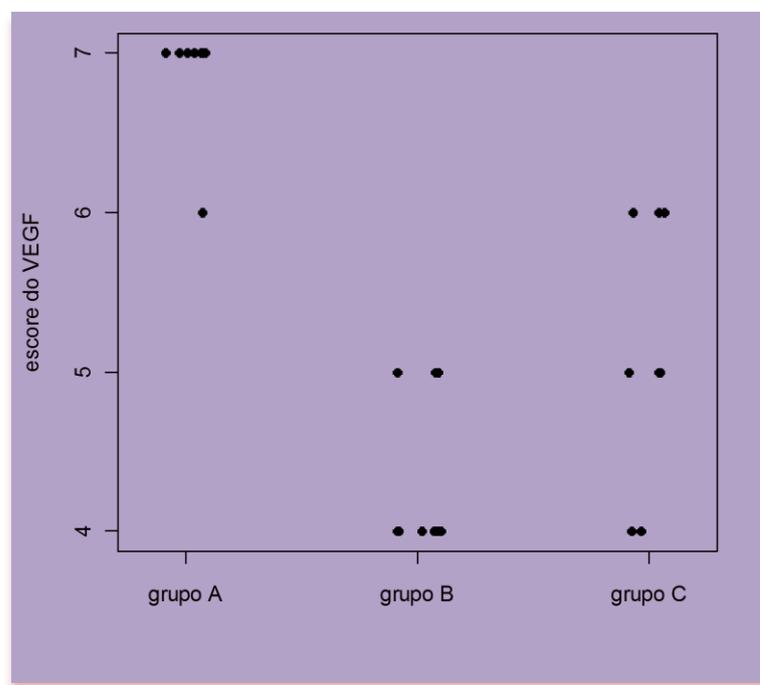


Figura 21. Gráfico do tipo diagrama de dispersão unidimensional do escore da expressão imunohistoquímica do VEGF nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

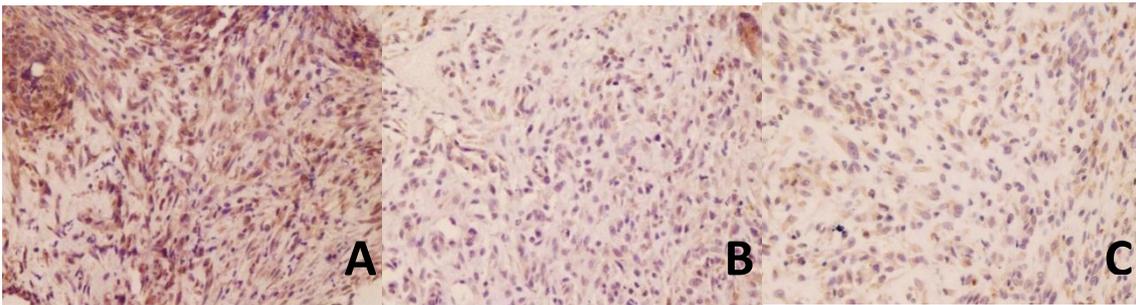


Figura 22. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para VEGF (em marrom) em animais do grupo A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI). Observar expressão mais intensa no grupo A.

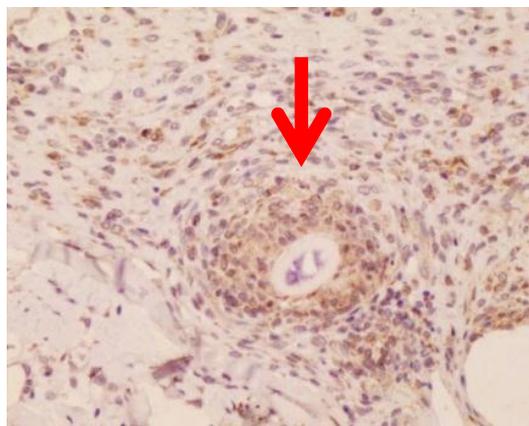


Figura 23. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para VEGF (em marrom) em animal do grupo C (PP + TI). Notar granuloma corpo estranho em animal do grupo C (seta vermelha).

Os resultados das comparações revelaram que os escores de VEGF ($p < 0,001$) não foram semelhantes entre os grupos, onde:

- o grupo A apresentou escore de VEGF maior quando comparado ao grupo B ($p < 0,001$).
- o grupo A apresentou escore de VEGF maior quando comparado ao grupo C ($p < 0,001$).
- o grupo C tem escore de VEGF maior quando comparado ao grupo B ($p < 0,001$).

1.4.2 – COX2

Os resultados da pesquisa da COX2 no tecido através de imunohistoquímica podem ser observados na tabela 5 e nas figuras 24 a 26.

Tabela 5. Resultados dos escores da expressão imunohistoquímica da COX2 nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

		COX2
grupo A	N	8
	média	5,4
	desvio-padrão	0,7
grupo B	N	9
	média	1,6
	desvio-padrão	1,2
grupo C	N	9
	média	4,2
	desvio-padrão	1,1
Total	N	26
	média	3,7
	desvio-padrão	1,9
p		<0,001*

*teste de Kruskal-Wallis

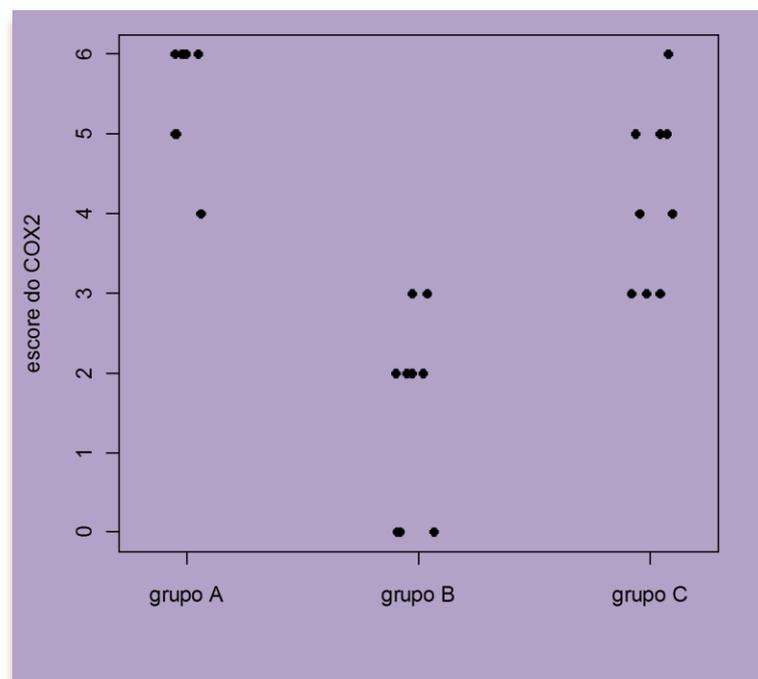


Figura 24. Gráfico: diagrama de dispersão unidimensional do escore da imunohistoquímica para a COX2 nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

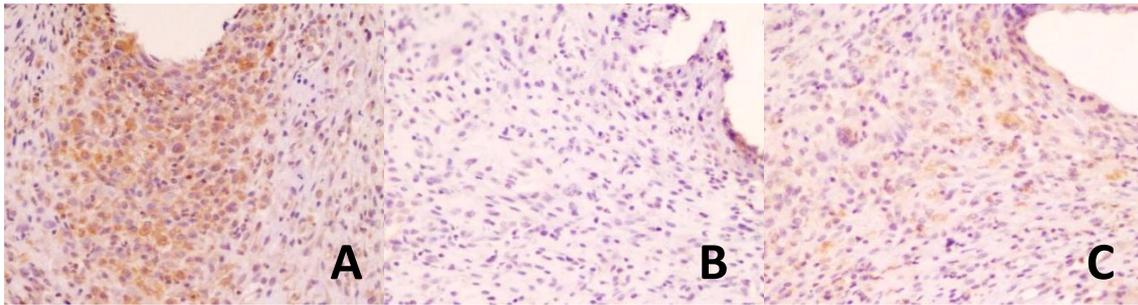


Figura 25. Fotomicrografia (200X): imunohistoquímica para COX2 (em marrom) em animais do grupo A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

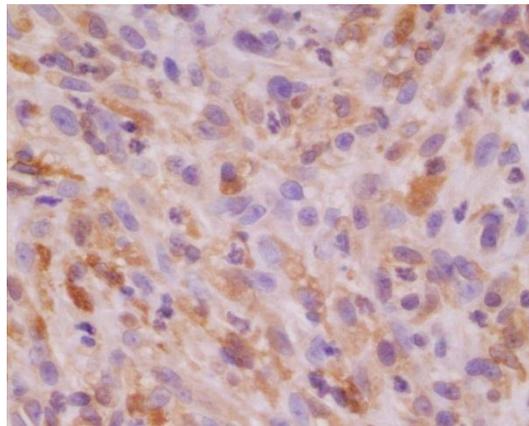


Figura 26. Fotomicrografia (400X): imunohistoquímica com intensa expressão da COX2 (em marrom) em animal do grupo A (PP).

Os resultados das comparações revelaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os escores de COX2 ($p < 0,001$), onde:

- o grupo A apresentou escore de COX2 maior quando comparado ao grupo B ($p < 0,001$).
- o grupo A apresentou escore COX2 maior quando comparado ao grupo C ($p = 0,011$).
- o grupo C apresentou escore COX2 maior quando comparado ao grupo B ($p < 0,001$).

2 – Comparação entre os animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO com aqueles que sofreram eutanásia no 40ºDPO.

A amostra estudada neste tópico foi composta de material histológico de 52 ratos, sendo 26 (50,0%) submetidos à eutanásia no 7ºDPO e 26 no 40ºDPO, estes últimos procedentes de blocos dos animais avaliados em estudo anterior do nosso grupo.^(34, 35) Em ambos os períodos, os animais foram submetidos a procedimentos cirúrgicos com a mesma padronização, já citada no capítulo Método.

Os animais submetidos à eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO foram comparados quanto à reação inflamatória tecidual, ao colágeno, ao VEGF e à COX2.

2.1 – Reação inflamatória tecidual

As somas dos itens relacionados ao processo inflamatório tecidual ($S = a+b+c+d+e+f$) nos grupos A, B e C foram comparadas nos períodos de eutanásia tardia e precoce conforme demonstrado na tabela 6 e na figura 27.

Tabela 6. Comparação da soma (S) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos animais que sofreram eutanásia nos 7ºDPO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

			S=a+b+c+d+e+f
grupo A	7o dia PO	N	8
		média	14,5
		desvio-padrão	2,1
	40o dia PO	N	9
		média	13,6
		desvio-padrão	1,1
		<i>p</i>	0,265*
grupo B	7o dia PO	N	9
		média	13,3
		desvio-padrão	1,9
	40o dia PO	N	9
		média	18,3
		desvio-padrão	2,6
		<i>p</i>	<0,001*
grupo C	7o dia PO	N	9
		média	13,3
		desvio-padrão	1,8
	40o dia PO	N	10
		média	15,2
		desvio-padrão	2,7
		<i>p</i>	0,095*

LEGENDA: *teste t-Student para amostras independentes; a = camada de células na periferia dos granulomas; b = reação inflamatória no tecido do hospedeiro; c = resposta inflamatória na superfície da tela; d = maturação tecidual; e = presença de células gigantes; f = invasão inflamatória na musculatura adjacente à tela.

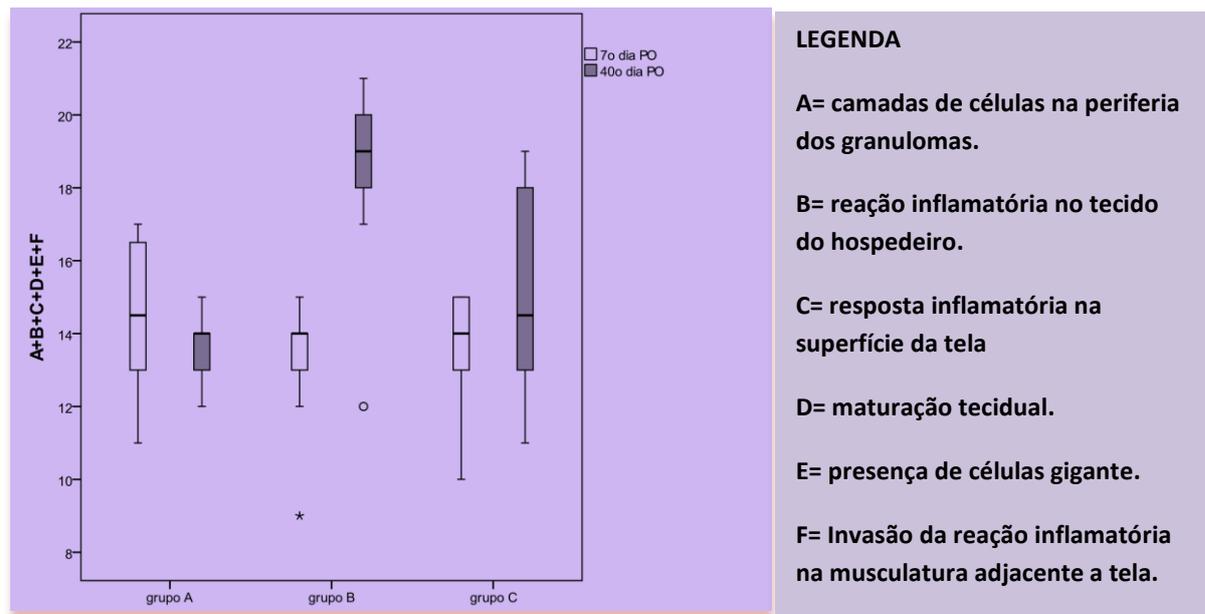


Figura 27. Gráfico do tipo boxplot comparativo da soma ($S=A+B+C+D+E+F$) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos períodos de eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

No grupo A, as análises inferenciais revelaram que ambos os períodos de eutanásia apresentaram escores estatisticamente semelhantes para avaliação da reação inflamatória tecidual ($p=0,265$).

No grupo B, o escore dos ratos que sofreram eutanásia precocemente foi menor quando comparado àqueles que sofreram eutanásia tardia ($p<0,001$).

No grupo C, ambos os períodos de eutanásia apresentaram escores estatisticamente semelhantes ($p=0,095$).

2.2 – Colágeno

A comparação da contagem de pixels correspondentes ao colágeno, entre os períodos de eutanásia precoce e tardia, está demonstrada na tabela 7 e na figura 28.

Tabela 7. Comparação dos resultados da contagem de pixels correspondentes ao colágeno, nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO, dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

		N	média	desvio-padrão	p
grupo A	7o dia PO	7	33,00	6,51	<0,001*
	40o dia PO	9	11,89	3,79	
grupo B	7o dia PO	8	20,25	9,84	0,004*
	40o dia PO	10	6,20	3,08	
grupo C	7o dia PO	9	25,78	8,58	<0,001*
	40o dia PO	10	7,40	2,88	

* teste t-Student para amostras independentes

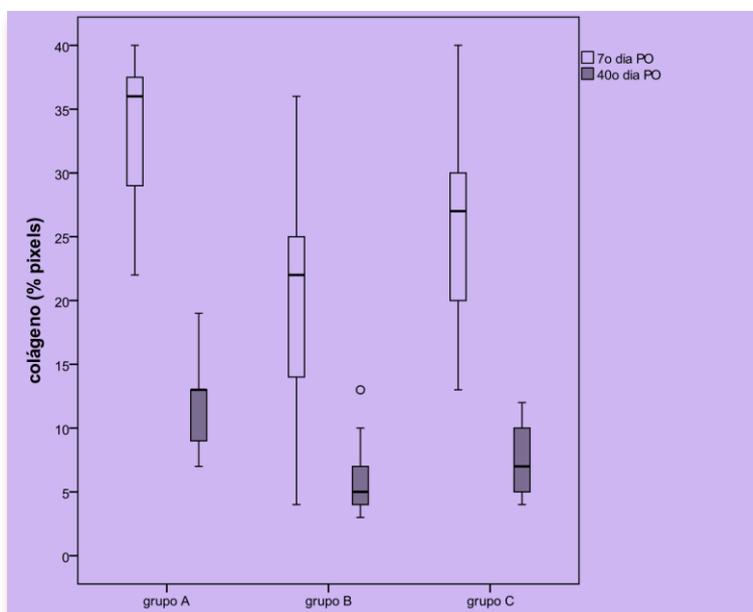


Figura 28. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da contagem dos pixels correspondentes ao colágeno nos animais submetidos à eutanásia nos 7ºDPO e 40ºDPO dos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

As análises inferenciais revelaram que a contagem de pixels correspondentes ao colágeno nos ratos que sofreram eutanásia precoce foi maior quando comparadas àqueles que sofreram eutanásia tardia para os grupos A ($p < 0,001$), B ($p = 0,004$) e C ($p < 0,001$).

2.3 – Imunohistoquímica

As tabelas 8 e 9 além das figuras 29 e 30 demonstram os escores do VEGF e da COX2 nos períodos de eutanásia precoce e tardia nos grupos A, B e C.

Tabela 8: Resultados da imunohistoquímica para o VEGF nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

			VEGF
grupo A	7o dia PO	N	8
		média	6,9
		desvio-padrão	0,4
	40o dia PO	N	9
		média	3,2
		desvio-padrão	0,8
p		<0,001*	
grupo B	7o dia PO	N	9
		média	4,3
		desvio-padrão	0,5
	40o dia PO	N	10
		média	2,5
		desvio-padrão	0,5
p		<0,001*	
grupo C	7o dia PO	N	9
		média	5,2
		desvio-padrão	0,8
	40o dia PO	N	10
		média	1,9
		desvio-padrão	1,4
p		<0,001*	

*teste de Mann-Whitney

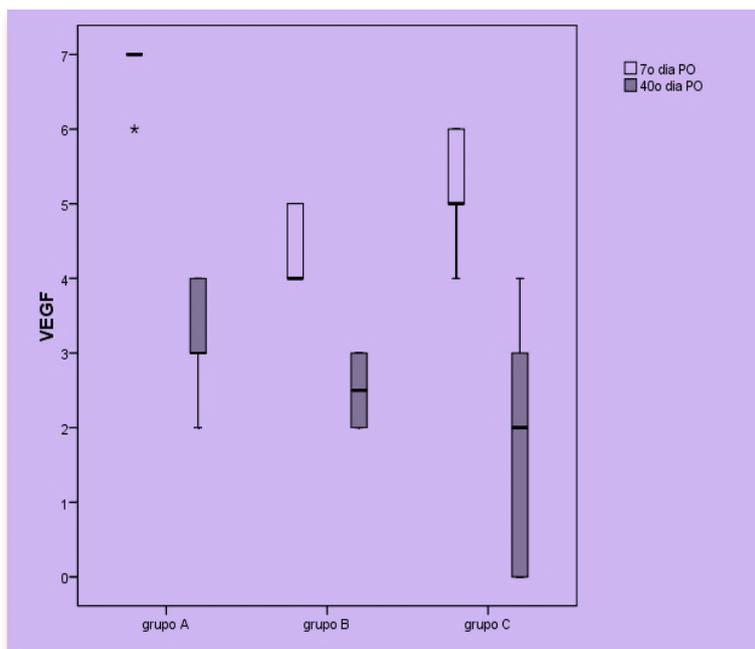


Figura 29. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da expressão imunohistoquímica do VEGF nos períodos de eutanásia no 7ºD PO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

Com relação ao VEGF, as análises inferenciais revelaram que:

- No grupo A, expressão imunohistoquímica do VEGF nos ratos que sofreram eutanásia precoce foi maior quando comparados aos ratos que sofreram eutanásia tardia ($p < 0,001$).
- No grupo B, a expressão do VEGF nos ratos que sofreram eutanásia precoce foi maior quando comparada àqueles que sofreram eutanásia tardia ($p < 0,001$).
- No grupo C, a expressão do VEGF dos ratos que sofreram eutanásia precoce também foi maior quando comparada àqueles que sofreram eutanásia tardia ($p < 0,001$).

Tabela 9: Resultados da imunohistoquímica para a COX2 nos animais que sofreram eutanásia no 7ºDPO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

			COX2
grupo A	7o dia PO	N	8
		média	5,4
		desvio-padrão	0,7
	40o dia PO	N	5
		média	3,4
		desvio-padrão	1,1
p		0,011*	
grupo B	7o dia PO	N	9
		média	1,6
		desvio-padrão	1,2
	40o dia PO	N	5
		média	3,2
		desvio-padrão	1,1
p		0,060*	
grupo C	7o dia PO	N	9
		média	4,2
		desvio-padrão	1,1
	40o dia PO	N	5
		média	4,8
		desvio-padrão	0,4
p		0,364*	

*teste de Mann-Whitney

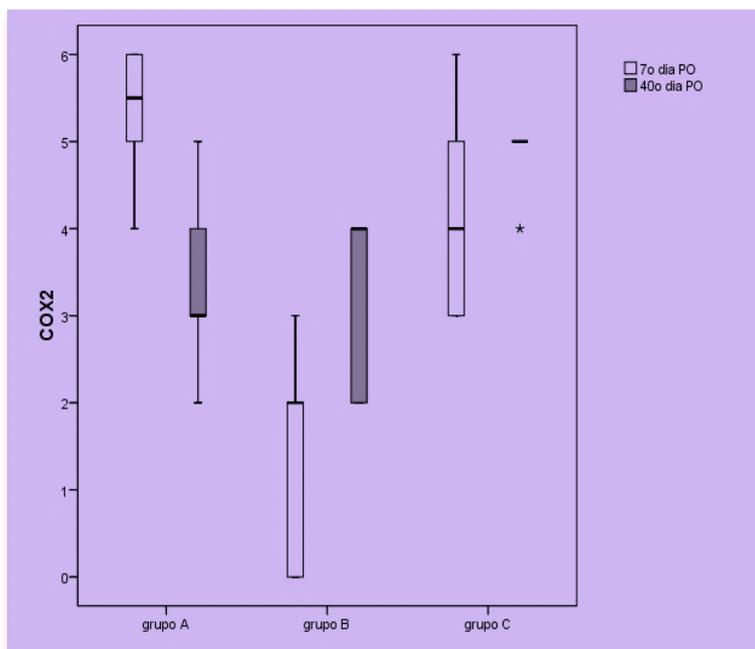


Figura 30. Gráfico do tipo boxplot demonstrativo da expressão imunohistoquímica da COX2 nos períodos de eutanásia no 7ºD PO e 40ºDPO nos grupos A (PP), B (PP + PG) e C (PP + TI).

Com relação à COX2, observou-se que:

- No grupo A, as análises inferenciais revelaram que a expressão imunohistoquímica da COX2 foi maior nos ratos que sofreram eutanásia precoce, quando comparados àqueles que sofreram eutanásia tardia ($p=0,011$)
- No grupo B, a expressão da COX2 foi semelhante entre os diferentes períodos de tempo ($p=0,060$).
- No grupo C, a expressão da COX2 também foi semelhante entre os diferentes períodos ($p=0,364$).

No anexo 6 podem ser encontradas tabelas contendo todos os resultados da análise estatística desta pesquisa.

4 DISCUSSÃO

4.1 – Relevância da Pesquisa

Embora a correção das hérnias da parede abdominal com o implante de telas seja uma das intervenções mais frequentes no cotidiano do cirurgião geral, existem inúmeras dúvidas sobre a resposta do hospedeiro provocada pelos diversos tipos de telas empregados neste procedimento.⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾ Um aspecto importante que ainda necessita ser esclarecido é a correlação entre os vários tipos de materiais e estruturas utilizadas nas confecções das telas, as suas respectivas reações inflamatórias e suas influências nas complicações pós-operatórias e na cicatriz definitiva.⁽⁴¹⁻⁴⁷⁾

Apesar da alta frequência da sua utilização, não existe ainda consenso sobre a classificação e a nomenclatura das telas.^(48,49) Há uma tendência em substituir as primeiras classificações, baseadas no tipo de material utilizado e na sua densidade, por classificações relacionadas ao tamanho dos poros e à presença de revestimento ou filmes nas mesmas.⁽⁴⁸⁾

Dúvidas relacionadas à prática cotidiana do cirurgião geral permanecem sem resposta: - Qual a magnitude do processo inflamatório desencadeado em curto, médio e longo prazo pelo emprego das telas? - As novas telas representariam realmente um avanço? – Qual seria a tela ideal? - Como modular a reação inflamatória para reduzir complicações e melhorar a formação da cicatriz? - Menos complicações precoces implicariam em mais recidiva tardia? - Menor inflamação significaria maior recidiva? - Será que o tipo de inflamação seria mais importante do que a intensidade da mesma?

Teoricamente, o aumento do diâmetro dos poros bem como a redução na densidade das telas poderiam minimizar a inflamação e, conseqüentemente, as complicações do seu implante.⁽⁹⁾ Porém, vários estudos experimentais e em humanos mostram resultados conflitantes, não somente quanto à redução de complicações precoces como também a um possível aumento de recidivas^(27, 29, 50-66). Há relato, inclusive, de complicações inesperadas, como a redução de

mobilidade dos espermatozoides em telas de baixa densidade (PP + PG e PP + TI) implantadas em região inguinal⁽⁵⁴⁾ e falência mecânica com fratura de uma tela também de baixa densidade constituída de PP no reparo cirúrgico de uma hérnia ventral mediana recidivada.⁽⁶⁶⁾

Klinge et al. (2012), avaliaram a explantação de 1000 telas por diversas indicações, sendo a infecção o principal motivo da remoção das telas de poros pequenos de PP, predominantes no material avaliado, enquanto a recidiva seria a principal razão da explantação das telas de poros maiores⁽⁴⁸⁾. A preocupação com o aumento da taxa de infecção em reparos cirúrgicos de hérnias com o uso de telas tem gerado vários estudos,^(60,67) como o de Blatnik et al. (2012). Estes autores consideraram que as telas multifilamentares, compostas com coberturas ou filmes anti-adesivos, e aquelas laminares, impregnadas com antimicrobianos seriam ineficientes no clareamento de bactérias, no caso de uma contaminação por *S. aureus* meticilina-resistente.⁽⁶⁷⁾

Pacual et al. (2012), relacionaram a presença de material absorvível a uma intensa reação inflamatória, porém com menor expressão dos fatores de crescimento e, conseqüentemente, pior deposição de colágeno e pior integração da tela no tecido do hospedeiro.⁽³⁴⁾

Outros autores, como Schug-Pass et al. (2008), Orestein et al. (2010), Brandt et al. (2011), estudaram o revestimento das telas com películas ou o uso de substâncias diversas, inclusive de origem hormonal. Seu objetivo seria reduzir a formação de aderências ou modular algum aspecto do processo inflamatório, como a atuação dos mastócitos, reação tipo corpo estranho ou fibrose, por exemplo.^(64, 68, 69)

Em estudo anterior do nosso grupo, avaliamos a resposta inflamatória sérica e tecidual, além da deposição do colágeno em ratos no 40ºDPO do implante das telas de PP (convencional, de fabricação nacional), PP + PG de baixa densidade e PP + TI de baixa densidade. Observou-se reação inflamatória sérica semelhante entre os grupos. A tela de PP de alta densidade apresentou, tardiamente, menor inflamação e maior e melhor deposição do colágeno. A tela de PP + PG apresentou, no período estudado, resposta

inflamatória tecidual mais intensa e deposição do colágeno fraca, irregular e heterogênea. A tela de PP + TI apresentou resultados intermediários entre as duas anteriores.^(36, 37)

Diante dos resultados expostos, outros questionamentos surgiram, bem como a necessidade de avaliação dos parâmetros estudados num período mais precoce, com o objetivo de correlacionar a resposta inflamatória precoce e tardia do hospedeiro com a deposição do colágeno.

A principal razão do assunto e do desenho desta pesquisa foi a nossa necessidade de continuar investigando as dúvidas geradas em nosso estudo anterior, no qual, diversamente do esperado, a tela convencional de polipropileno apresentou tardiamente uma menor reação inflamatória tecidual associada a uma maior deposição de colágeno tardia (40^o DPO). E também, o porquê da tela de polipropileno associado a poliglactina ter apresentado maior reação inflamatória e menor deposição de colágeno tardios.

Considerando-se que a primeira fase do processo de cicatrização da parede abdominal (hemostasia + inflamação) é indispensável para a deposição do colágeno e para a formação da cicatriz definitiva,⁽⁸⁾ como explicar os resultados descritos acima? Poderia ter havido uma reação intensa com liberação de citocinas pró-inflamatórias (especialmente fatores de crescimento) em algum momento mais precoce e após o implante das telas, que pudesse justificar uma deposição de colágeno tão importante num período mais tardio nas telas de PP.

Outro questionamento também pertinente seria a participação do material absorvível da tela de PP + PG na manutenção de uma inflamação do tipo corpo estranho, com formação de granulomas e menor expressão de fatores do crescimento, prejudicando assim a deposição de colágeno mais abundante e homogêneo. Ou seja, não somente o tamanho dos poros e a densidade das telas como também o tipo de material poderia induzir a uma resposta inflamatória de intensidade e, o mais importante, com características diferentes.

O tema desta pesquisa mostra-se assim muito atual e de interesse prático, uma vez que, embora já existam cerca de 600 marcas comerciais de telas,⁽⁴⁸⁾ a maioria ainda necessitaria de estudos, inclusive experimentais, antes do seu lançamento para o uso em humanos. Nem todas as questões enunciadas previamente nesta discussão foram respondidas até o momento.

4.2 – Discussão do Método

A – Modelo do estudo

Neste estudo, optamos pelo mesmo modelo experimental em ratos utilizado no estudo do nosso grupo descrito anteriormente,^(36, 37) de modo a propiciar comparações dos resultados precoces (7ºDPO) com os tardios (40ºDPO). Estudaram-se em ambas as pesquisas os mesmos parâmetros: citocinas inflamatórias séricas, reação inflamatória tecidual (utilizando-se a mesma escala objetiva de pontos para avaliação), análise morfométrica do colágeno (contagem de pixels como a mesma metodologia e pelo mesmo programa de computador, de acordo com a metodologia já descrita por Mazzurana.⁽⁵⁰⁾ Utilizaram-se também as mesmas telas do estudo já citado.

Neste modelo, usaram-se ratos do tipo Wistar, já largamente utilizados em outros estudos sobre o implante de telas na parede abdominal.^(4, 6) A padronização do procedimento anestésico também já é clássica na literatura⁽⁴⁾ e de uso corrente no CEDEME. As recomendações dos “Três Rs” para a racionalização do uso de animais em experimentos foram seguidas.⁽⁷¹⁾ Animais machos foram escolhidos para evitar influências hormonais do ciclo reprodutivo na resposta tecidual dos mesmos.

Acrescentaram-se ainda a avaliação de dois mediadores inflamatórios teciduais, a COX2 e o VEGF, através de Imunohistoquímica, nos animais que sofreram eutanásia precoce. Esta reação foi realizada também nos blocos dos animais que sofreram eutanásia no 40ºDPO. Para avaliação objetiva da expressão do VEGF e da COX2 utilizaram-se escalas com pontuação já publicadas anteriormente^(39, 40).

As falhas e limitações das dosagens séricas de citocinas, especialmente em animais de pequeno porte onde a coleta pode ser mais difícil, a labilidade destas substâncias em soros armazenados a uma temperatura recomendada de -20°, além dos resultados erráticos no estudo prévio justificaram a inclusão das reações imunohistoquímicas nesta pesquisa. Realizou-se, inclusive, a comparação da expressão imunohistoquímica do VEGF e da COX2 nos animais que foram submetidos à eutanásia precoce e tardia.

Tendo em vista a ausência de significância estatística nas dosagens séricas de citocinas no estudo anterior^(36, 37), modificou-se a técnica de coleta de sangue do animal, na tentativa de evitar um possível fator de interferência nos resultados. Optou-se pela coleta no plexo retro ocular do rato, técnica já sedimentada na literatura.^(72, 73) Por esta razão, realizou-se estudo piloto para melhor padronização da mesma, a qual foi sempre realizada por um técnico em laboratório com larga experiência no manuseio e coleta de sangue em roedores.

Seguindo-se a linha de investigação do estudo anterior, foi considerado grupo controle aquele que recebeu o implante da tela de PP de alta densidade, a mais utilizada em nosso meio, ainda considerada como convencional.

Na dosagem sérica de citocinas, as amostras de sangue colhidas no pré-operatório imediato, já com o animal anestesiado e antes da tricotomia da parede abdominal, também serviram de parâmetro para análise da evolução das medidas destes marcadores séricos de inflamação no 1ºDPO e 7ºDPO. Embora possa ter ocorrido interferência do processo anestésico dos animais na elevação das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas, todos os ratos foram submetidos aos mesmos procedimentos pré-operatórios, diminuindo assim o risco de vieses e erros sistemáticos. É importante ressaltar a impossibilidade da coleta de sangue no rato sem anestesia, não somente do ponto de vista ético, como também do ponto de vista prático.

Com o objetivo de avaliar a reação inflamatória do ponto de vista morfológico através do estudo histológico, e por meio de mediadores inflamatórios, optou-se pela pesquisa sérica de três citocinas pró-inflamatórias

(IL6, VEGF e TNF α) e uma anti-inflamatória (IL10). Todas as citocinas citadas apresentam a possibilidade de dosagem em nosso meio com kits específicos para ratos.

Devido à extrema sensibilidade destes marcadores pró e anti-inflamatórios séricos aos fatores como stress do animal, técnica anestésica e coletas repetidas de sangue em curto intervalo de tempo, bem como a enorme labilidade destas citocinas às condições de manuseio das amostras de sangue (velocidade e tempo de centrifugação, hemólise, tempo e condições de armazenamento e transporte), realizou-se também o estudo do VEGF e da COX2 no tecido do animal. Estas moléculas mais estáveis no tecido, e resistentes ao armazenamento são classicamente consideradas como marcadores resposta inflamatória.^(34, 39, 40)

O VEGF é um fator de crescimento indispensável à angiogênese e à deposição de colágeno no processo de cicatrização, podendo estar expresso fortemente tanto nas inflamações como também nas neoplasias.^(12, 14, 34, 39) Já a COX2 é uma substância pró-inflamatória precursora da via do ácido araquidônico, também envolvida com a angiogênese nos processos inflamatórios e neoplásicos.^(38,67)

Devido à alta especificidade dos kits mais modernos para o estudo imunohistoquímico em animais, a busca de anticorpos primários e secundários que pudessem ser utilizados no tecido de ratos, assim como o encontro de pessoal experiente para a realização destas reações se constituíram nos maiores desafios e nas etapas mais demoradas, porém as mais recompensadoras desta pesquisa.

B – Estatística

Na metodologia da estatística desta pesquisa, iniciou-se com uma análise descritiva dos dados para o estabelecimento de medidas padrão para as variáveis numéricas e medida de frequência para as variáveis categóricas.

Na comparação entre as três ou mais variáveis numéricas aferidas em tempos diferentes, utilizou-se ANOVA de medidas repetidas (dosagem de

citocinas). Para as demais variáveis numéricas, empregou-se ANOVA com um fator fixo para as medidas do colágeno e das somas das médias dos escores histológicos.

Para as variáveis categóricas (escores histológicos e imunohistoquímicos) utilizou-se um teste não paramétrico, o Kruskal-Wallis (KW), usado quando existem três ou mais grupos a serem comparados. A realização do KW exige a complementação com um pós-teste. Neste estudo, optou-se pelo pós-teste de Tukey, comumente utilizado nestes casos.

Na comparação entre as amostras do 7ºDPO e 40ºDPO utilizou-se o teste t de Student para comparação entre dois grupos contendo variáveis numéricas independentes e o teste não paramétrico de Mann-Whitney na comparação de dois grupos contendo variáveis categóricas, ordinais.

A utilização de um programa informatizado para a realização dos cálculos na análise estatística desta pesquisa contribuiu para sua maior precisão.

4.3 – Discussão dos Resultados

Alguns estudos mostraram que o polipropileno induziria uma rápida e importante reação inflamatória, especialmente na fase precoce do pós-operatório,^(2, 12) a qual só seria inferior em intensidade ao poliéster.^(37, 40) Outros, no entanto, não apontaram diferenças entre os diversos materiais, considerando-se até que a massa da tela seria o fator mais importante da resposta inflamatória.^(41-45, 51) Alguns autores observaram que em curto prazo o PP apresentava maior reação inflamatória, inclusive resultando em maiores desconfortos para os pacientes, porém em longo prazo, os vários tipos de telas apresentariam comportamento semelhante, ou até um maior índice de recidiva das hérnias nas telas de baixa densidade.^(27, 29, 30, 43, 46, 48)

Vale ressaltar que a heterogeneidade nos desenhos dos estudos, materiais e estruturas das telas, períodos avaliados, parâmetros estudados, local do posicionamento das telas, via de acesso, meios de fixação, regiões

anatômicos e até de nomenclatura, classificação e conceituação nos trabalhos podem explicar a diversidade de resultados obtidos.

Nesta pesquisa, a soma dos itens da análise histológica do processo inflamatório decorrente do implante das telas foi semelhante entre os grupos no 7ºDPO. Todavia, houve diferenças no item *f* (invasão da musculatura adjacente à tela pelo processo inflamatório), onde os valores do grupo A (PP) foram maiores que os demais (**$p=0,006$**). Estudos posteriores poderiam avaliar se esta invasão, associada a uma maior deposição de colágeno poderia ser responsável pela sensação de fibrose e falta de elasticidade da parede abdominal referida por alguns pacientes no pós-operatório.

Na comparação entre os períodos precoce e tardio, observamos que, enquanto nos grupos A (PP) e C (PP + TI) não houve acentuação da inflamação no decorrer do tempo, houve importante aumento deste parâmetro no grupo B (PP + PG) do 40ºDPO em relação ao 7º DPO (**$p<0,001$**), conforme demonstrado na figura 26. Outra vez, parece que o material absorvível seria a chave para o aumento da intensidade do processo inflamatório nas telas contendo poliglactina, como fora também observado por Pascual et al. (2012).⁽³⁴⁾

Também não parece haver consenso sobre o resultado da deposição de colágeno no implante das telas, talvez em decorrência da variedade das metodologias utilizadas nos diferentes estudos. As conclusões são conflitantes, enquanto alguns autores afirmam que existiria maior deposição de colágeno nas telas de alta densidade, outros afirmam exatamente o oposto^(37, 47). Um estudo publicado recentemente afirma que as telas constituídas de PP seriam aquelas cujo implante poderia resultar em maior densidade de colágeno no tecido cicatricial do hospedeiro.⁽⁷⁴⁾

Em nosso estudo, a análise da morfometria do colágeno utilizando-se a coloração clássica do picrossirus e contagem de pixels por programa de computador (*Image Tool*) mostrou que o grupo A (PP) apresentou maior deposição de colágeno (**$p=0,021$**) em relação ao grupo B (PP + PG), e semelhante, estatisticamente, ao grupo C (PP + TI). Assim como naqueles

animais submetidos a eutanásia no 40ºDPO, nos animais sacrificados precocemente (7ºDPO), observou-se uma deposição mais uniforme e organizada no grupo A, ao contrário do grupo B, onde há deposição fraca, errática e irregular, conforme mostra a figura 18. O grupo C apresentou resultados intermediários em relação aos demais e foi estatisticamente igual ao grupo B.

Comparando-se a evolução da morfometria do colágeno entre 7ºDPO e 40ºDPO, observa-se queda da deposição no período mais tardio nos grupos A ($p < 0,001$), B ($p = 0,004$) e C ($p < 0,001$). Esta alteração é compatível com as descrições de White e Babul (1997) e Vaz et al. (2009), que atribuem estes resultados à substituição do colágeno tipo III (imaturo) pelo tipo I (maduro) e ao processo de remodelação da cicatriz definitiva.^(2,12) Note-se, entretanto, que no 40ºDPO, a deposição de colágeno permaneceu mais intensa e mais organizada no grupo da tela de PP.

De uma maneira geral a dosagem sérica de citocinas em animais de experimentação para comparação da resposta inflamatória sistêmica ao implante de diversos tipos de telas não apresenta resultados significativos na literatura e não existem parâmetros definidos sobre as mesmas.^(37, 61) No entanto, em humanos, destacam-se os trabalhos de Di Vita et al. (2005 e 2010), os quais demonstraram um aumento das citocinas pró-inflamatórias em pacientes submetidos à correção cirúrgica de hérnias, sendo esta resposta proporcional ao tamanho das telas implantadas^(12, 14). Estes mesmos autores não observaram diferenças significantes das citocinas séricas entre as telas de PP e PP + PG⁽⁵¹⁾.

Neste estudo, em amostras de sangue colhidas no pré-operatório, 1ºDPO e 7ºDPO não houve diferenças significantes entre os grupos e nos diferentes períodos de tempo em cada grupo quanto às citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias empregadas. Também, nos animais que sofreram eutanásia no 40ºDPO, não se conseguiu demonstrar diferenças nas dosagens das citocinas.

No grupo A (PP), quando comparado ao grupo C (PP + TI), houve uma maior média dos valores das dosagens da IL10 ($p=0,026$), a única citocina anti-inflamatória estudada. Entretanto, o fato do maior nível dosado da IL10 no grupo A ter acontecido no pré-operatório, período no qual esta interleucina foi indetectável no grupo C, além de desvios padrões maiores que os valores das médias nos grupos podem reduzir relevância deste resultado, mostrando valores erráticos e pouco confiáveis deste parâmetro.

A expressão imunohistoquímica do VEGF no tecido já foi utilizada na avaliação de processos de cicatrização na cirurgia da hérnia da parede abdominal, sendo observada maior expressão desta citocina no tecido do hospedeiro que recebeu a tela de PP e menor naquela que continha material biodegradável, a poliglactina.⁽³⁴⁾

Nossos resultados corroboram os achados descritos acima. No grupo A (PP), no 7º DPO, não somente houve um maior escore de VEGF em relação aos outros grupos ($p<0,001$), como todos os animais do grupo, exceto um, apresentaram pontuação máxima na escala de avaliação, conforme mostra o gráfico de dispersão da figura 21. O grupo C (PP + TI) apresentou escore intermediário, enquanto o grupo B (PP + PG) apresentou o menor escore.

Comparando-se o comportamento dos grupos precoce e tardio, observam-se em todos os grupos que o escore de VEGF no 7ºDPO é significativamente maior em comparação com o 40ºDPO. O padrão destes resultados tem relação com aqueles obtidos por Di Vita et al.^(11, 14) em dosagens séricas do VEGF em humanos. Estes autores observaram que as citocinas pró-inflamatórias apresentam maiores valores no período mais precoce do pós-operatório, em pacientes submetidos à correção cirúrgica de hérnias da parede abdominal⁽¹²⁾.

O fato do grupo B, caracterizado nos estudos histológicos por um processo inflamatório intenso, ter apresentado neste estudo uma expressão imunohistoquímica pobre para o VEGF, que é sabidamente um marcador pró-inflamatório importante, pode reforçar a ideia de que cada tipo de tela induz a um tipo de reação diferente.

A constatação de que a tela com baixa expressão de VEGF também induz a uma menor deposição de colágeno poderia, mais uma vez, comprovar a relação entre este fator de crescimento e o colágeno, fortalecendo a teoria de Pascual et al. (2012), segundo a qual o material absorvível provocaria uma reação tipo corpo estranho, com liberação menor de VEGF e, conseqüentemente, produziria uma cicatriz frágil e deficiente na deposição de colágeno.⁽⁴²⁾ Novas pesquisas com outros materiais absorvíveis, sintéticos e biológicos, poderiam trazer mais esclarecimentos se a reação descrita anteriormente seria decorrente da absorção dos mesmos ou somente da poliglactina.

Do mesmo modo, o fato do grupo A apresentar uma reação inflamatória intensa, porém com maior liberação de VEGF e maior deposição do colágeno precoce e tardia, também corroboram as ideias do parágrafo anterior.

Tal como no VEGF, na avaliação da expressão da imunohistoquímica da COX2 também observamos um maior escore no grupo A (PP), seguido dos grupos C (PP + TI) e B (PP + PG) ($p < 0,001$). Entretanto, a comparação dos resultados precoces e tardios mostrou resultado diverso: só houve diferença estatisticamente significativa no grupo A ($p = 0,011$), o qual apresentou valores menores no 40ºDPO em relação ao 7ºDPO.

A carência de pesquisas sobre a COX2 no tema hérnia com tela e, talvez, o número reduzido de lâminas adequadas que nos permitiram realizar os exames imunohistoquímicos da COX2 nos blocos dos animais do 40º DPO provavelmente podem nos impedir de emitir julgamentos definitivos. Mas poderíamos inferir que a manutenção desta enzima no tecido cicatricial em fases mais tardias do pós-operatório poderia colaborar para a manutenção do estado inflamatório. Poderia também representar outro ponto de diversidade na resposta induzida por cada tipo de tela no hospedeiro. Acreditamos que necessitaremos de novos estudos para esclarecer este e outros pontos deste tema.

Em relação à resposta inflamatória do hospedeiro caracterizada pelos estudos histopatológicos e imunohistoquímicos pudemos observar que:

- A tela convencional, constituída de PP, de alta densidade e poros pequenos, ainda a mais empregada em nosso meio, especialmente na correção de hérnia incisionais, apresentou uma reação inflamatória tecidual aguda, caracterizada por infiltrado inflamatório na musculatura adjacente à mesma, por forte expressão de VEGF e COX2 no tecido e por deposição mais acentuada de colágeno. Tardamente, há queda dos níveis de VEGF e COX2 e da deposição de colágeno. No 40º DPO, as fibras do colágeno agrupam-se em feixes organizados e esta tela ainda mantém quantitativamente a maior deposição em relação às outras estudadas.

A tela de poros grandes e de baixa densidade constituída de PP + PG apresentou uma reação inflamatória intensa, tipo corpo estranho, caracterizada pela presença de abundantes granulomas e células gigantes. Concomitantemente, existe uma expressão fraca do VEGF e da COX2 e uma deposição errática e irregular do colágeno. Esta reação pode ser perpetuada e até acentuar-se com o tempo e, provavelmente, está relacionada com a presença de material absorvível na composição do implante.

A tela de poros grandes e baixa densidade, constituída de PP recoberto com TI, apresentou alterações histológicas inflamatórias, expressão da COX2 e do VEGF e deposição de colágeno intermediária, em relação às anteriores. Embora seja uma tela que contém um material considerado inerte, usado inclusive em próteses articulares e endovasculares, apresentou precocemente reação inflamatória semelhante às outras telas já citadas e, em longo prazo, inflamação superior à tela de PP de alta densidade.

4.4 – Considerações Finais

Pelo exposto, pode-se observar que o tema deste estudo ainda necessitará de mais investigações para que seja obtido conhecimento mais consistente. Nosso trabalho insere-se em uma linha de pesquisa mais ampla na qual outros pesquisadores avaliam a reação inflamatória provocada pelas mais diversas telas em posicionamentos intra e extraperitoneal, além de outros

aspectos como, por exemplo, formação de aderências e recidivas. Estes estudos iniciaram-se em animais, porém já existe um projeto para avaliação em humanos.

Considerando-se que, de maneira geral, novas telas são desenvolvidas sem estudos prévios adequados, não seria surpreendente que o conhecimento sobre as mesmas fosse tão limitado e tão conflitante. Apesar disto, os implantes continuam sendo realizados diariamente, e o cirurgião muitas vezes sequer tem noção da extensão do efeito local e sistêmico que a aposição de telas representa para o organismo do paciente.

A reação inflamatória decorrente do implante de telas pode sofrer variações decorrentes de uma série de fatores, muitos dos quais ainda não estão totalmente esclarecidos. As pesquisas sobre este tema, tal como a nossa, podem, talvez no futuro, contribuir para que esta reação seja adequadamente modulada com o objetivo de produzir um menor índice de complicações pós-operatórias associado a uma cicatrização mais adequada, resultando em menos recidiva e melhor qualidade de vida para o paciente.

A avaliação da reação inflamatória e a da fibrose, decorrentes do implante de telas intracavitárias, nas grandes hérnias hiatais, também representaria uma perspectiva promissora para novos estudos, uma vez que tais implantes já são empregados em humanos e, potencialmente, podem resultar em complicações graves ou mesmo fatais.

De maneira semelhante, estudos sobre o emprego de telas em grandes defeitos da parede abdominal decorrentes de traumas graves ou de cirurgias de grande porte, como ressecções extensas de neoplasias e transplantes de órgãos, poderiam ser muito interessantes e extremamente úteis do ponto de vista clínico.

As perspectivas e as possibilidades da realização de novas pesquisas são inúmeras e podem contribuir para o desenvolvimento e para a prática da Cirurgia, na realização de um dos procedimentos mais comuns na maioria das unidades hospitalares e até ambulatoriais.

5 CONCLUSÕES

1 – Na comparação entre as telas de polipropileno de alta densidade, polipropileno + poliglactina de baixa densidade e polipropileno + titânio, também de baixa densidade no período precoce (7ºDPO), concluiu-se que:

- Não houve diferenças na dosagem séricas citocinas inflamatórias;
- Não houve diferenças no escore quantitativo da análise histológica da reação inflamatória nas telas citadas, porém, ocorreu maior invasão tecidual pelo processo inflamatório na tela de PP;
- Houve maior e melhor deposição de colágeno na tela de PP e menor na tela de PP + PG;
- Houve maior expressão imunohistoquímica do VEGF e da COX2 na tela de PP e menor expressão destes marcadores na tela de PP + PG.

2 – Na comparação entre os resultados precoces (7ºDPO) e tardios (40ºDPO), concluiu-se que:

- Houve aumento da reação inflamatória tecidual na tela de PP + PG tardiamente, enquanto as telas de PP e PP + TI apresentaram inflamação semelhante em ambos os períodos;
- Houve redução da deposição do colágeno tardiamente em todas as telas, mantendo-se, no entanto, a maior e a melhor deposição na tela de e de PP em relação às demais mesmo no 40ºDPO;
- Houve redução da expressão imunohistoquímica do VEGF tardiamente em todas as telas estudadas;
- Houve redução da expressão imunohistoquímica da COX2 tardiamente na tela de PP e manutenção da mesma nas telas de PP + PG e PP + TI.

5 ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP (1).



UNIFESP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 29 de janeiro de 2010.
CEP 0042/10

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) CRISTINA GAMA PEREIRA LUCENA
Co-Investigadores: Marcelo Moura Linhares (Orientador)
Disciplina/Departamento: Gastroenterologia Cirúrgica/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: “**Análise comparativa entre telas: reação inflamatória sérica e tecidual e deposição de colágeno precoce e tardia**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: EXPERIMENTAL - CATEGORIA B - ESTUDO CRONICO.
RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.
OBJETIVOS: Comparação de 3 tipos diferentes de tela, todas possuindo polipropileno em sua constituição, em fases precoce e tardia..
RESUMO: Trata-se de estudo experimental utilizando-se ratos da linhagem Wistar provenientes do CEDEME. Serão utilizados 35 animais que serão anestesiados através de ketamina e xilazina e eutanaziados por overdose de anestesia..
FUNDAMENTOS E RACIONAL: Fundamentação apresentada.
MATERIAL E MÉTODO: Materiais e métodos adequadamente descritos.
DETALHAMENTO FINANCEIRO: SEM FINANCIAMENTO EXTERNO.
CRONOGRAMA: 24 MESES.
OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.
ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **24/1/2011 e 24/1/2012.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – Conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil
Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

1
42

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP (2).

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0042/10

Anexo 2 – Auxílio à Pesquisa da FAPESP.

 Processos de que o Pesquisador Participa Domingo, 09 de Setembro de 2012.					
Interessado		MARCELO MOURA LINHARES			
Processos					
Número	Tipo de Financiamento	Título	Participação	Vigência	Situação
2010/50830-1	Auxilio Pesquisa - Regular	ANALISE COMPARATIVA DA INFLAMACAO E DA MORFOMETRIA DO COLAGENO PRECOCE E TARDIA ENTRE AS TELAS DE POLIPROPILENO, PLIPROPILENO + POLIGLACTINA E POLIPROPILENO + TITANIO.	Beneficiário	01/10/10 a 30/09/12	Concedido 

Anexo 3 – Modelo da ficha clínica dos animais do experimento.**ANÁLISE COMPARATIVA DA INFLAMAÇÃO E DA MORFOMETRIA
DO COLÁGENO PRECOCE E TARDIA ENTRE AS TELAS DE
POLIPROPILENO, POLIPROPILENO + POLIGLACTINA E POLIPROPILENO
+ TITÂNIO****FORMULÁRIO - IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS**

ANIMAL _____ PESO _____ IDADE _____

DATA CIRURGIA _____ DATA REINTERVENÇÃO _____

PRE-OPERATORIO IMEDIATO

VEGF _____ TNFa _____ IL10 _____ IL6 _____

1o DPO

VEGF _____ TNFa _____ IL10 _____ IL6 _____

7o DPO

VEGF _____ TNFa _____ IL10 _____ IL6 _____

COMPLICAÇÕES

POI _____

1º/7ºDPO _____

Obs: _____

Anexo 4 – Protocolo para a imunohistoquímica do VEGF

Anticorpo	POLICLONAL DE COELHO ANTI VEGF
1- Recuperação Antigênica	
Recuperação antigênica com o Trilogy, na panela de pressão elétrica	1 cuba -15 min 2 cuba -5 min (panela desligada)
Lavar com água destilada	2 banho de 2 min cada
Lavar com tampão PBS	3 banhos de 2 min cada
2- Bloqueio: peroxidase endógena	
Água oxigenada 10v	
Lavar com água corrente	10 min em temperatura ambiente
Lavar com água destilada	2 min
Lavar com PBS	2 banhos de 2 min cada 3 banhos de 2 min cada
3- Incubação com o Anticorpo Primário	
Incubar com o anticorpo primário (pré-diluído)	Overnight (na geladeira)
Lavar com PBS	No dia seguinte
4- Incubar com o polímero de 1 etapa	OBS: Polímero específico para o VEGF
Incubar com o polímero HISTOFINE	30min em temperatura ambiente
Lavar com PBS	
5- Revelação e contra coloração	Nesta etapa utiliza LUVA
Incubar com Dab (1 gota de cromógeno em 1m de tampão	3-5 mim em temperatura ambiente Obs: olhar lâmina por lâmina se funcionou.
Lavar com água corrente	3 min
Lavar em água destilada	2 banho de 2 min cada
Conntracorar co Hematoxilina	20 seg -1min
Lavar em água corrente	3 min
6- Desidratar	
Álcool 70%	1 banho -2 min
Álcool 92%	2 banhos – 2min cada
Álcool 100%	3 banhos- 2 min cada
Xilol	3 banhos – 2 min cada
Montar com Meio de Montagem	

Anexo 5 – Protocolo para a imunohistoquímica da COX2

1- Identificação	
Identificar as lâminas	POLICLONAL DE COELHO COX2 R
2- Recuperação Antigênica	
Recuperação antigênica com o Trilogy, na panela de pressão elétrica	1 cuba -15 min 2 cuba -5 min (panela desligada)
Lavar com água destilada	2 banho de 2 min cada
Lavar com tampão PBS	3 banhos de 2 min cada
3- Bloqueio: peroxidase endógena	
Água oxigenada 10v	
Lavar com água corrente	10 min em temperatura ambiente
Lavar com água destilada	2 min
Lavar com PBS	2 banhos de 2 min cada 3 banhos de 2 min cada
4- Incubação como Anticorpo Primário	
Incubar com o anticorpo primário (pré-diluído)	Overnight (na geladeira)
Lavar com PBS	No dia seguinte
5- Incubar com o polímero	Kit LSAB (DAKO/ K 0640),
Incubar as lâminas no primeiro reagente do Kit LSAB anticorpo secundário Biotinilado	30min em temperatura ambiente
Lavar com PBS	
Incubar as lâminas no segundo reagente do Kit LSAB, Streptoavidina peroxidase	30min em temperatura ambiente
Lavar com PBS	
6- Revelação e contra coloração	Nesta etapa utiliza LUVA
Revelar as lâminas em Diamonobenzidine (Kit DAB liquido/ DAKO)	3-5 mim em temperatura ambiente Obs: olhar lâmina por lâmina se funcionou.
Lavar com água corrente	3 min
Lavar em água destilada	2 banho de 2 min cada
Contra colorar co Hematoxilina	20 seg -1min
Lavar em água corrente	3 min
7 - Desidratar	
Álcool 70%	1 banho -2 min
Álcool 92%	2 banhos – 2min cada
Álcool 100%	3 banhos- 2 min cada
Xilol	3 banhos – 2 min cada
Montar com Meio de Montagem	

Anexo 6 – Resultados (1): Medidas resumo para a dosagem de citocinas no 7ºDPO

Tabela 1: Medidas-resumo das citocinas IL6, IL10 e TNF, nos momentos pré, 1º dia PO e 7º dia PO, dos grupos A, B e C.

	IL6			IL10			TNF		
	pré	1º dia po	7º dia po	pré	1º dia po	7º dia po	pré	1º dia po	7º dia po
grupo A									
N	6	8	8	5	7	7	6	8	8
média	169,51	178,19	136,97	124,19	44,25	109,97	2,75	1,33	3,14
mediana	62,81	90,54	75,81	60,07	40,72	0,00	0,00	0,00	0,00
mínimo	35,08	35,08	14,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
máximo	665,26	452,60	414,23	337,97	161,22	290,32	16,50	10,65	16,50
desvio-padrão	247,55	164,07	146,44	150,34	57,89	139,10	6,74	3,77	5,74
grupo B									
N	5	9	9	5	9	9	5	9	9
média	213,39	225,15	292,97	51,05	122,18	70,34	4,16	3,62	1,66
mediana	226,79	156,04	122,42	40,72	24,41	19,72	0,00	0,00	0,00
mínimo	14,35	35,08	14,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
máximo	452,60	645,89	1012,36	161,22	730,10	290,32	16,50	21,97	10,65
desvio-padrão	189,98	224,73	342,52	66,07	234,78	98,24	7,15	7,73	3,66
grupo C									
N	5	9	9	5	9	9	5	9	9
média	153,10	442,83	171,08	0,00	33,05	37,96	4,16	3,02	2,31
mediana	47,56	226,79	61,07	0,00	19,72	15,45	0,00	0,00	0,00
mínimo	23,90	14,35	35,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
máximo	568,41	1390,86	877,92	0,00	74,45	191,29	16,50	16,50	16,50
desvio-padrão	233,54	494,38	271,43	0,00	32,27	64,28	7,15	6,16	5,51
Total									
N	16	26	26	15	25	25	16	26	26
média	178,10	286,05	202,78	58,41	68,27	69,78	3,63	2,71	2,34
mediana	69,05	123,29	90,54	0,00	24,41	15,45	0,00	0,00	0,00
mínimo	14,35	14,35	14,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
máximo	665,26	1390,86	1012,36	337,97	730,10	290,32	16,50	21,97	16,50
desvio-padrão	212,72	340,32	267,95	102,41	145,88	101,41	6,55	6,01	4,86

Anexo 6 – Resultados (2): Reação inflamatória tecidual no 7ºDPO.

Tabela 2: Distribuição dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual dos grupos A, B e C.

	grupo A		grupo B		grupo C		Total	
Item A ^a								
1	5	62,5%	4	44,4%	6	66,7%	15	57,7%
2	3	37,5%	5	55,6%	3	33,3%	11	42,3%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
Item B ^b								
2	4	50,0%	3	33,3%	5	55,6%	12	46,2%
3	4	50,0%	6	66,7%	3	33,3%	13	50,0%
4	-	-	-	-	1	11,1%	1	3,8%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
Item C ^c								
1	1	12,5%	1	11,1%	1	11,1%	3	11,5%
2	2	25,0%	5	55,6%	7	77,8%	14	53,8%
3	1	12,5%	2	22,2%	1	11,1%	4	15,4%
4	4	50,0%	1	11,1%	-	-	5	19,2%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
Item D ^d								
2	3	37,5%	1	11,1%	-	-	4	15,4%
3	5	62,5%	8	88,9%	9	100,0%	22	84,6%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
Item E ^e								
1	-	-	2	22,2%	-	-	2	7,7%
2	8	100,0%	1	11,1%	4	44,4%	13	50,0%
3	-	-	5	55,6%	5	55,6%	10	38,5%
4	-	-	1	11,1%	-	-	1	3,8%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
Item F ^f								
1	1	12,5%	6	66,7%	3	33,3%	10	38,5%
2	1	12,5%	3	33,3%	4	44,4%	8	30,8%
3	3	37,5%	-	-	2	22,2%	5	19,2%
4	3	37,5%	-	-	-	-	3	11,5%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%

^aCamadas de células na periferia dos granulomas: 1: 01 a 04 camadas, 2: 05 a 09 camadas, 3: 10 a 30 camadas, 4: > 30 camadas. ^bReação inflamatória no tecido do hospedeiro: 1: Tecido fibroso, maduro, não denso, 2: Tecido fibroso imaturo, com fibroblastos e pouco colágeno, 3: Tecido granuloso e denso, com fibroblastos e muitas células inflamatórias, 4: Massa de células inflamatórias, com tecido conjuntivo desorganizado. ^cResposta inflamatória na superfície da tela: 1: Fibroblastos, sem macrófagos ou células corpo estranho, 2: Focos isolados de macrófagos ou células corpo estranho, 3: Uma camada de macrófagos e células corpo estranho, 4: Múltiplas camadas de macrófagos e células corpo estranho. ^dMaturação tecidual: 1: Tecido intersticial, maduro, denso, semelhante ao conjuntivo ou adiposo normal, 2: Vasos sanguíneos, fibroblastos e poucos macrófagos no interstício, 3: Células gigantes e inflamatórias, mas com tecido conjuntivo de permeio, 4: Interstício com células inflamatórias, sem tecido conjuntivo de permeio. ^ePresença de células gigantes: 1: Ausente, 2: Isoladas, 3: Em grupos de até 3, 4: Em grupos superiores a 3. ^fInvasão inflamatória na musculatura adjacente a tela: 1: Ausente, 2: Presença de infiltrado inflamatório em focos isolados, 3: Presença de infiltrado inflamatório entre fibras musculares, 4: Presença de infiltrado inflamatório entre feixes de fibras

Anexo 6 – Resultados (3): Reação inflamatória tecidual no 7ºDPO.

Tabela 3: Medidas-resumo dos escores dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual dos grupos A, B e C.

	item A	item B	item C	item D	item E	item F
grupo A						
N	8	8	8	8	8	8
média	1,38	2,50	3,00	2,63	2,00	3,00
mediana	1,00	2,50	3,50	3,00	2,00	3,00
mínimo	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00
máximo	2,00	3,00	4,00	3,00	2,00	4,00
desvio-padrão	0,52	0,53	1,20	0,52	0,00	1,07
grupo B						
N	9	9	9	9	9	9
média	1,56	2,67	2,33	2,89	2,56	1,33
mediana	2,00	3,00	2,00	3,00	3,00	1,00
mínimo	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
máximo	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00	2,00
desvio-padrão	0,53	0,50	0,87	0,33	1,01	0,50
grupo C						
N	9	9	9	9	9	9
média	1,33	2,56	2,00	3,00	2,56	1,89
mediana	1,00	2,00	2,00	3,00	3,00	2,00
mínimo	1,00	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00
máximo	2,00	4,00	3,00	3,00	3,00	3,00
desvio-padrão	0,50	0,73	0,50	0,00	0,53	0,78
Total						
N	26	26	26	26	26	26
média	1,42	2,58	2,42	2,85	2,38	2,04
mediana	1,00	3,00	2,00	3,00	2,00	2,00
mínimo	1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
máximo	2,00	4,00	4,00	3,00	4,00	4,00
desvio-padrão	0,50	0,58	0,95	0,37	0,70	1,04
p	0,612 ^a	0,764 ^a	0,134 ^a	0,101 ^a	0,087 ^a	0,006 ^a

^ateste de Kruskal-Wallis

Anexo 6 – Resultados (4): Reação inflamatória tecidual no 7ºDPO.

Tabela 4: Medidas-resumo da soma1 (A+B+C+D) e soma2 (A+B+C+D+E+F) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual dos grupos A, B e C.

		A+B+C+D	A+B+C+D+E+F
grupo A	N	8	8
	média	9,5	14,5
	mediana	9,5	14,5
	mínimo	8,0	11,0
	máximo	11,0	17,0
	desvio-padrão	1,4	2,1
grupo B	N	9	9
	média	9,4	13,3
	mediana	10,0	14,0
	mínimo	7,0	9,0
	máximo	11,0	15,0
	desvio-padrão	1,1	1,9
grupo C	N	9	9
	média	8,9	13,3
	mediana	9,0	14,0
	mínimo	7,0	10,0
	máximo	10,0	15,0
	desvio-padrão	1,1	1,8
Total	N	26	26
	média	9,3	13,7
	mediana	9,0	14,0
	mínimo	7,0	9,0
	máximo	11,0	17,0
	desvio-padrão	1,2	1,9
p		0,509 ^b	0,380 ^b

^bAnálise de Variância (ANOVA) com 1 Fator Fixo

Anexo 6 – Resultados (5): Morfometria do colágeno no 7ºDPO.

Tabela 5: Medidas-resumo do colágeno dos grupos A, B e C.

grupo	N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão
A	7	33,62	36,21	22,62	40,50	6,43
B	8	20,89	22,42	4,38	36,99	9,94
C	9	26,27	27,78	13,71	40,84	8,55
Total	24	26,62	26,87	4,38	40,84	9,63

Anexo 6 – Resultados (6): Imunohistoquímica para VEGF e COX2 no 7ºDPO.

Tabela 6: Distribuição dos escores de VEGF e COX2 dos grupos A, B e C.

	grupo A		grupo B		grupo C		Total	
VEGF								
4	-	-	6	66,7%	2	22,2%	8	30,8%
5	-	-	3	33,3%	3	33,3%	6	23,1%
6	1	12,5%	-	-	4	44,4%	5	19,2%
7	7	87,5%	-	-	-	-	7	26,9%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%
COX2								
0	-	-	3	33,3%	-	-	3	11,5%
2	-	-	4	44,4%	-	-	4	15,4%
3	-	-	2	22,2%	3	33,3%	5	19,2%
4	1	12,5%	-	-	2	22,2%	3	11,5%
5	3	37,5%	-	-	3	33,3%	6	23,1%
6	4	50,0%	-	-	1	11,1%	5	19,2%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	26	100,0%

Tabela 7: Medidas-resumo dos escores de VEGF e COX2 dos grupos A, B e C.

		VEGF	COX2
grupo A	N	8	8
	média	6,9	5,4
	mediana	7,0	5,5
	mínimo-máximo	6,0-7,0	4,0-6,0
	desvio-padrão	0,4	0,7
grupo B	N	9	9
	média	4,3	1,6
	mediana	4,0	2,0
	mínimo-máximo	4,0-5,0	0,0-3,0
	desvio-padrão	0,5	1,2
grupo C	N	9	9
	média	5,2	4,2
	mediana	5,0	4,0
	mínimo-máximo	4,0-6,0	3,0-6,0
	desvio-padrão	0,8	1,1
Total	N	26	26
	média	5,4	3,7
	mediana	5,0	4,0
	mínimo-máximo	4,0-7,0	0,0-6,0
	desvio-padrão	1,2	1,9
p		<0,001 ^a	<0,001 ^a

^ateste de Kruskal-Wallis

Anexo 6 – Resultados (7): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: reação tecidual.

Tabela 8: Distribuição dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

	grupo A				grupo B				grupo C				
	7o dia PO		40o dia PO		7o dia PO		40o dia PO		7o dia PO		40o dia PO		
Item A ^a	1	5	62,5%	5	55,6%	4	44,4%	1	11,1%	6	66,7%	2	20,0%
	2	3	37,5%	4	44,4%	5	55,6%	6	66,7%	3	33,3%	8	80,0%
	3	-	-	-	-	-	-	2	22,2%	-	-	-	-
	Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%
Item B ^b	2	4	50,0%	4	44,4%	3	33,3%	-	-	5	55,6%	7	70,0%
	3	4	50,0%	5	55,6%	6	66,7%	5	55,6%	3	33,3%	2	20,0%
	4	-	-	-	-	-	-	4	44,4%	1	11,1%	1	10,0%
	Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%
Item C ^c	1	1	12,5%	-	-	1	11,1%	-	-	1	11,1%	-	-
	2	2	25,0%	7	77,8%	5	55,6%	1	11,1%	7	77,8%	3	30,0%
	3	1	12,5%	2	22,2%	2	22,2%	2	22,2%	1	11,1%	6	60,0%
	4	4	50,0%	-	-	1	11,1%	6	66,7%	-	-	1	10,0%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%	
Item D ^d	1	-	-	1	11,1%	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	3	37,5%	7	77,8%	1	11,1%	2	22,2%	-	-	6	60,0%
	3	5	62,5%	1	11,1%	8	88,9%	5	55,6%	9	100,0%	3	30,0%
	4	-	-	-	-	-	-	2	22,2%	-	-	1	10,0%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%	
Item E ^e	1	-	-	-	-	2	22,2%	-	-	-	-	-	-
	2	8	100,0%	9	100,0%	1	11,1%	-	-	4	44,4%	-	-
	3	-	-	-	-	5	55,6%	2	22,2%	5	55,6%	6	60,0%
	4	-	-	-	-	1	11,1%	7	77,8%	-	-	4	40,0%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%	
Item F ^f	1	1	12,5%	-	-	6	66,7%	-	-	3	33,3%	3	30,0%
	2	1	12,5%	2	22,2%	3	33,3%	1	14,3%	4	44,4%	3	30,0%
	3	3	37,5%	2	22,2%	-	-	4	57,1%	2	22,2%	2	20,0%
	4	3	37,5%	5	55,6%	-	-	2	28,6%	-	-	2	20,0%
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	7	100,0%	9	100,0%	10	100,0%	

^aCamadas de células na periferia dos granulomas: 1: 01 a 04 camadas, 2: 05 a 09 camadas, 3: 10 a 30 camadas, 4: > 30 camadas. ^bReação inflamatória no tecido do hospedeiro: 1: Tecido fibroso, maduro, não denso, 2: Tecido fibroso imaturo, com fibroblastos e pouco colágeno, 3: Tecido granuloso e denso, com fibroblastos e muitas células inflamatórias, 4: Massa de células inflamatórias, com tecido conjuntivo desorganizado. ^cResposta inflamatória na superfície da tela: 1: Fibroblastos, sem macrófagos ou células corpo estranho, 2: Focos isolados de macrófagos ou células corpo estranho, 3: Uma camada de macrófagos e células corpo estranho, 4: Múltiplas camadas de macrófagos e células corpo estranho. ^dMaturação tecidual: 1: Tecido intersticial, maduro, denso, semelhante ao conjuntivo ou adiposo normal, 2: Vasos sanguíneos, fibroblastos e poucos macrófagos no interstício, 3: Células gigantes e inflamatórias, mas com tecido conjuntivo de permeio, 4: Interstício com células inflamatórias, sem tecido conjuntivo de permeio. ^ePresença de células gigantes: 1: Ausente, 2: Isoladas, 3: Em grupos de até 3, 4: Em grupos superiores a 3. ^fInvasão inflamatória na musculatura adjacente a tela: 1: Ausente, 2: Presença de infiltrado inflamatório em focos isolados, 3: Presença de infiltrado inflamatório entre fibras musculares, 4: Presença de infiltrado inflamatório entre feixes de fibras

Anexo 6 – Resultados (8): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: reação tecidual.

Tabela 9: Medidas-resumo dos escores dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

			item A	item B	item C	item D	item E	item F
grupo A	7o dia PO	N	8	8	8	8	8	8
		média	1,38	2,50	3,00	2,63	2,00	3,00
		mediana	1,00	2,50	3,50	3,00	2,00	3,00
		mínimo	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00
		máximo	2,00	3,00	4,00	3,00	2,00	4,00
		desvio-padrão	0,52	0,53	1,20	0,52	0,00	1,07
	40o dia PO	N	9	9	9	9	9	9
		média	1,44	2,56	2,22	2,00	2,00	3,33
		mediana	1,00	3,00	2,00	2,00	2,00	4,00
		mínimo	1,00	2,00	2,00	1,00	2,00	2,00
		máximo	2,00	3,00	3,00	3,00	2,00	4,00
		desvio-padrão	0,53	0,53	0,44	0,50	0,00	0,87
		p	0,815c	0,888c	0,167c	0,059c	>0,999c	0,541c
	grupo B	7o dia PO	N	9	9	9	9	9
média			1,56	2,67	2,33	2,89	2,56	1,33
mediana			2,00	3,00	2,00	3,00	3,00	1,00
mínimo			1,00	2,00	1,00	2,00	1,00	1,00
máximo			2,00	3,00	4,00	3,00	4,00	2,00
desvio-padrão			0,53	0,50	0,87	0,33	1,01	0,50
40o dia PO		N	9	9	9	9	9	7
		média	2,11	3,44	3,56	3,00	3,78	3,14
		mediana	2,00	3,00	4,00	3,00	4,00	3,00
		mínimo	1,00	3,00	2,00	2,00	3,00	2,00
		máximo	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
		desvio-padrão	0,60	0,53	0,73	0,71	0,44	0,69
		p	0,113c	0,024c	0,011c	0,796c	0,006c	<0,001c
grupo C		7o dia PO	N	9	9	9	9	9
	média		1,33	2,56	2,00	3,00	2,56	1,89
	mediana		1,00	2,00	2,00	3,00	3,00	2,00
	mínimo		1,00	2,00	1,00	3,00	2,00	1,00
	máximo		2,00	4,00	3,00	3,00	3,00	3,00
	desvio-padrão		0,50	0,73	0,50	0,00	0,53	0,78
	40o dia PO	N	10	10	10	10	10	10
		média	1,80	2,40	2,80	2,50	3,40	2,30
		mediana	2,00	2,00	3,00	2,00	3,00	2,00
		mínimo	1,00	2,00	2,00	2,00	3,00	1,00
		máximo	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
		desvio-padrão	0,42	0,70	0,63	0,71	0,52	1,16
		p	0,095c	0,661c	0,017c	0,065c	0,013c	0,797c

^cteste de Mann-Whitney

Anexo 6 – Resultados (9): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: reação tecidual.

Tabela 10: Medidas-resumo da soma1 (A+B+C+D) e soma2 (A+B+C+D+E+F) dos itens relacionados à reação inflamatória tecidual nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

			A+B+C+D	A+B+C+D+E+F
grupo A	7o dia PO	N	8	8
		média	9,5	14,5
		mediana	9,5	14,5
		mínimo	8,0	11,0
		máximo	11,0	17,0
		desvio-padrão	1,4	2,1
	40o dia PO	N	9	9
		média	8,2	13,6
		mediana	8,0	14,0
		mínimo	7,0	12,0
		máximo	9,0	15,0
		desvio-padrão	0,8	1,1
		p	0,047 ^d	0,265 ^d
grupo B	7o dia PO	N	9	9
		média	9,4	13,3
		mediana	10,0	14,0
		mínimo	7,0	9,0
		máximo	11,0	15,0
		desvio-padrão	1,1	1,9
	40o dia PO	N	9	9
		média	12,1	18,3
		mediana	13,0	19,0
		mínimo	8,0	12,0
		máximo	15,0	21,0
		desvio-padrão	2,0	2,6
		p	0,003 ^d	<0,001 ^d
grupo C	7o dia PO	N	9	9
		média	8,9	13,3
		mediana	9,0	14,0
		mínimo	7,0	10,0
		máximo	10,0	15,0
		desvio-padrão	1,1	1,8
	40o dia PO	N	10	10
		média	9,5	15,2
		mediana	9,5	14,5
		mínimo	7,0	11,0
		máximo	13,0	19,0
		desvio-padrão	1,6	2,7
		p	0,341 ^d	0,095 ^d

^dteste t-Student para amostras independentes

Anexo 6 – Resultados (10): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: colágeno.

Tabela 11: Medidas-resumo do colágeno nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

		N	média	mediana	mínimo	máximo	desvio-padrão	p
grupo A	7o dia PO	7	33,00	36,00	22,00	40,00	6,51	<0,001 ^d
	40o dia PO	9	11,89	13,00	7,00	19,00	3,79	
grupo B	7o dia PO	8	20,25	22,00	4,00	36,00	9,84	0,004 ^d
	40o dia PO	10	6,20	5,00	3,00	13,00	3,08	
grupo C	7o dia PO	9	25,78	27,00	13,00	40,00	8,58	<0,001 ^d
	40o dia PO	10	7,40	7,00	4,00	12,00	2,88	

^dteste t-Student para amostras independentes

Anexo 6 – Resultados (11): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: imunohistoquímica para VEGF e COX2.

Tabela 12: Distribuição dos escores de VEGF e COX2 nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

	grupo A				grupo B				grupo C			
	7o dia PO		40o dia PO		7o dia PO		40o dia PO		7o dia PO		40o dia PO	
VEGF												
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	30,0%
2	-	-	2	22,2%	-	-	5	50,0%	-	-	3	30,0%
3	-	-	3	33,3%	-	-	5	50,0%	-	-	3	30,0%
4	-	-	4	44,4%	6	66,7%	-	-	2	22,2%	1	10,0%
5	-	-	-	-	3	33,3%	-	-	3	33,3%	-	-
6	1	12,5%	-	-	-	-	-	-	4	44,4%	-	-
7	7	87,5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	8	100,0%	9	100,0%	9	100,0%	10	100,0%	9	100,0%	10	100,0%
COX2												
0	-	-	-	-	3	33,3%	-	-	-	-	-	-
2	-	-	1	20,0%	4	44,4%	2	40,0%	-	-	-	-
3	-	-	2	40,0%	2	22,2%	-	-	3	33,3%	-	-
4	1	12,5%	1	20,0%	-	-	3	60,0%	2	22,2%	1	20,0%
5	3	37,5%	1	20,0%	-	-	-	-	3	33,3%	4	80,0%
6	4	50,0%	-	-	-	-	-	-	1	11,1%	-	-
Total	8	100,0%	5	100,0%	9	100,0%	5	100,0%	9	100,0%	5	100,0%

Anexo 6 – Resultados (12): Comparação entre o 7ºDPO e 40ºDPO: imunohistoquímica para VEGF e COX2.

Tabela 13: Medidas-resumo dos escores de VEGF e COX2 nos períodos de sacrifício 7º dia PO e 40º dia PO dos grupos A, B e C.

			VEGF	COX2
grupo A	7o dia PO	N	8	8
		média	6,9	5,4
		mediana	7,0	5,5
		mínimo	6,0	4,0
		máximo	7,0	6,0
		desvio-padrão	0,4	0,7
	40o dia PO	N	9	5
		média	3,2	3,4
		mediana	3,0	3,0
		mínimo	2,0	2,0
		máximo	4,0	5,0
		desvio-padrão	0,8	1,1
			<0,001 ^c	0,011 ^c
grupo B	7o dia PO	N	9	9
		média	4,3	1,6
		mediana	4,0	2,0
		mínimo	4,0	0,0
		máximo	5,0	3,0
		desvio-padrão	0,5	1,2
	40o dia PO	N	10	5
		média	2,5	3,2
		mediana	2,5	4,0
		mínimo	2,0	2,0
		máximo	3,0	4,0
		desvio-padrão	0,5	1,1
			<0,001 ^c	0,060 ^c
grupo C	7o dia PO	N	9	9
		média	5,2	4,2
		mediana	5,0	4,0
		mínimo	4,0	3,0
		máximo	6,0	6,0
		desvio-padrão	0,8	1,1
	40o dia PO	N	10	5
		média	1,9	4,8
		mediana	2,0	5,0
		mínimo	0,0	4,0
		máximo	4,0	5,0
		desvio-padrão	1,4	0,4
			<0,001 ^c	0,364 ^c

^cteste de Mann-Whitney

REFERÊNCIAS

1. Vaz M. Avaliação do tempo de fibroplasia em tela de polipropileno na correção de hérnia incisional da parede abdominal : estudo experimental em ratos [tese]. Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul;2007.
2. Ricciardi BF, Chequim LH, Gama RR, Hasegawa L. Abdominal hernia repair with mesh surrounded by fibrous tissue: experimental study in Wistar rats. *Rev Col Bra Cir.*2012;39(3):195-200.
3. Schouten N, Van Dalen T, Smakman N, Elias SG, Van de Water C, Spermon RJ, Mulder LS, BurgmansIPJ. Male infertility after endoscopic Totally Extraperitoneal (Tep) hernia repair (Main): rationale and design of a prospective observational cohort study. *BMC Surg.* 2012; 12: 7.
4. Derek AD, Wang X, Adamson B, Kuzon Jr WM, Dennis RG, Franz MG. Mesh incisional herniorrhaphy increases abdominal wall elastic properties: A mechanism for decreased hernia recurrences in comparison with suture repair. *Surg.*2006;140(1):14-24.
5. Lawson-Smith MJ, Galland RB. Combined fascia and mesh repair of Incisional hernias. *Hernia.* 2006;10:262-5.
6. Junge K, Junge U, Klosterhalfen B, Mertens PR, Rosch R, Schchtrupp A, Ulmer F, Schumpelik V . Influence of mesh materials on collagen deposition in a rat model. *J Inv Surg.*2002;15:319-28.
7. Derek AD, Wang X, Kuhn A, Robson MC, Franz MG. The prevention of Incisional hernia formation using a delayed-release polymer of basic fibroblast growth factor. *Ann Surg.* 2004;240:179-86.
8. Whitte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin N Am.*1997;77(3):509-28.
9. Weyhe D, Belyaev O, Muller C, Meurer K, Bauer K, Papapstolou G, Uhl W. Improving outcomes in hernia repair by the use of the light meshes – a comparison of different implant constructions based on a critical appraisal of the literature. *World J Surg.* 2007;31:234-44.
10. Culbertson EJ, Xing L, Wen Y, Franz MG. Reversibility or abdominal wall atrophy and fibrosis after primary or mesh herniorrhaphy. *Ann Surg.* 2012:13. [Epub ahead of print].

11. Gonzalez R, Fugate, McClusky D, Ritter EM, Lederman A, Dillehay D, Smith CD, Ramshaw BJ. Relationship between tissue ingrowth and mesh contraction. *World J. Surg.* 2005;29:1038-43.
12. Di Vita G, D'Agostinho P, Patti R, Arcara, Caruso G, Davi, Cillari E. Acute inflammatory response after inguinal and incisional hernia repair with implantation of polypropylene mesh of different size. *Langenbecks Arch Surg.* 2005;390:306-11.
13. Langer C, Liersh T, Kley C, Flosman M, Suss M, Siemer A, Becker H. Incisional hernia surgery in Germany. *Chirurg.* 2003;74(7):638-45.13.
14. Di Vita G, Patti R, D'Agostinho P, Arcoleo F, Caruso G, Arcara M, Davi V, Cillari E. Serum VEGF and b-FGF profiles after tension-free or conventional hernioplasty. *Langenbecks Arch Surg.* 2005;390:528-533.
15. Sedov VM, Tarbaev SD, Gostevskoi AA, Gorelov AS. Effectiveness of Hernioplasty with using a polypropylene mesh implant in treatment of postoperative ventral hernias. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2005;164(3):85-7.
16. Vyslouzil K, Klementa I, Stary L, Duda M, Zboril P, Skalicky P, Dlouhy M. The intraabdominally located mesh in the laparotomy management of major hernias. *Rozhl Chir.* 2005;84(6):310-3.
17. Berrevoet F, Maes L, De Baerdemaeker L, Rogiers X, Troisi R, de Hemptinne B. Comparable results with 3-year follow-up for large-pore versus small-pore meshes in open incisional hernia repair. *Surgery.* 2010; 148(5):969-75.
18. Vaz M, Krebs RK, Trindade EN, Trindade MR. Fibroplasia after polypropylene mesh implantation for abdominal wall hernia repair in rats. *Acta Cir Bras.* 2009 Jan-Feb;24(1):19-25.
19. Klosterhalfen B, Junge K, Klinge U. The lightweight and large porous mesh Concept for hernia repair. *Expert Rev Med Devices.* 2005;2(1):103-17.
20. Burger JW, Halm JA, Wijsmuller AR, Raa S, Jeekel J. Evaluation of a new prosthetic meshes for ventral hernia repair. *Surg Endosc.* 2006;20(8):1320-5.
21. Junge K., Rosch R, Klinge U, Saklak M, Klosterhalfen B, Peiper C, Schumpelick V. Titanium coating of a polypropylene mesh for hernia repair: effect on biocompatibility. *Hernia.* 2005;9(2):115-9.

22. Tamme C, Garde N, Klinger A, Wunder R, Kockerking F. Totally extraperitoneal inguinal hernioplasty with titanium-coated polypropylene mesh : early results. *Surg Endosc.* 2005;19(8):1125-9.
23. Horstmann R, Hellwig M, Classen C, Rottgermann S, Palmes D. Impact of polypropylene amount on functional outcome and quality of life after inguinal hernia repair by TAPP procedure using pure, mixed, and titanium-coated meshes. *World J Surg.* 2006;30:1-8.
24. Hazebroek EJ, Ng A, Yong DH, Berry H, Leibman S, Smith GS. Evaluation of lightweight titanium-coated mesh (Timesh) for laparoscopic repair of large hiatal hernias. *Surg Endosc.* 2008;22(11):2428-32.
25. Moreno-Egea A, Carrillo-Alcaraz A, Soria-Aledo V. Randomized clinical trial of laparoscopic hernia repair comparing titanium-coated lightweight mesh and medium-weight composite mesh. *Surg Endosc.* 2012. [Epub ahead to print].
26. Fenton-Lee D, Tsang C. A series of complications after paraesophageal hernia repair with the use of Timesh: a case report. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2010;20(3):e95-6.
27. Gao M, Han J, Tian J, Yang K. Vypro II mesh for inguinal hernia repair: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Surg.* 2010;251(5):838-42.
28. Smietański M, Smietańska IA, Modrzejewski A, Simons MP, Aufenacker TJ. Systematic review and meta-analysis on heavy and lightweight polypropylene mesh in Lichtenstein inguinal hernioplasty. *Hernia.* 2012; 16(5):519-28.
29. Ladurner R, Chlapponi C, Linhuber Q, Mussack T. Long term outcome and quality of life after open incisional hernia repair - light versus heavy weight meshes. *BMC Surg.* 2011;14:11-25.
30. Brittner R, Schmedt CG, Leibi BJ, Schwartz J. Early postoperative and one year results of a randomized controlled trial comparing the impact of extralight titanized polypropylene mesh and traditional heavyweight polypropylene mesh on pain and seroma production in laparoscopic hernia repair (TAPP). *World J Surg.* 2011;35(8):1791-7.

31. Huber A, McCabe GP, Boruch AV, Medberry C, Honerlaw M, Badylak SF. Polypropylene-containing synthetic mesh devices in soft tissue repair: a meta-analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(1):145-54.
32. Regis S, Jassal M, Mukherjee N, Bayon Y, Scarborough N, Bhowmick S. altering surface characteristics of polypropylene mesh via sodium hydroxide treatment. *J Biomed Mater Res A*. 2012;100(5):1160-7.
33. Altinel Y, Oztürk E, Ozkaya G, Akyıldız EU, Ulcay Y, Ozgüç H. The effect of a chitosan coating on the adhesive potential and tensile strength of polypropylene meshes. *Hernia*. 2012. [Epub ahead of print].
34. Pascual G, Rodrigues M, Soromayor S, Pérez-Köhler B, Bellón JM. Inflammatory reaction and neotissue maturation in the early host tissue incorporation of polypropylene prostheses. *Hernia*. 2012; [Epub ahead of print].
35. den Hartog D, Dur AH, Tuinebreijer WE, Kreis RW. Open surgical procedures for incisional hernias. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008;(3):CD006438.
36. Lucena CGP. Estudo experimental comparativo entre as telas de polipropileno, polipropileno + poliglactina e polipropileno + titânio: citocinas pró-inflamatórias, alterações Inflamatórias teciduais e morfometria do colágeno [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo;2009.
37. Pereira-Lucena CG, Artigiani Neto R, Frazão CVG, Goldenberg A, Lopes-Filho GJ, Matos D, Linhares MM. Experimental study comparing meshes made of polypropylene, polypropylene + polyglactin and polypropylene + titanium: inflammatory cytokines, histological changes and morphometric analysis of collagen. *Hernia*. 2010;14(3):299-304.
38. Harrell AG, Novitsky YW, Cristiano JA, Gersin KS, Norton HJ, Kercher KW, Heniford BT. Prospective histologic evaluation of intra-abdominal prosthetics four months after implantation in a rabbit model. *Surg Endosc*. 2007;21(7):1170-4.
39. Henriques ACG, de Matos FR, Galvão HC, Freitas RA. Immunohistochemical expression of MMP-9 and VEGF in squamous cell carcinoma of the tongue. *Journal of Oral Science* 2012;54(1):105-11.

40. Kim HS, Lee HS, Kim WH. Clinical Significance of Protein Expression of Cyclooxygenase-2 and Somatostatin Receptors in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancer Res Treat*. 2011 43(3):181–188.
41. Asarias JR, Nguyen PT, Mings Jr, Gerrich AP, Pierce LM. Influence of mesh materials on the expression of mediators involved in wound healing. *Invest Surg*. 2011;24(2):87-98.
42. Voskerician G, Jin J, White MF, Williams CP, Rosen MJ. Effect of biomaterial design criteria on the performance of surgical meshes for abdominal hernia repair: a pre-clinical evaluation in a chronic rat model. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(6):1989-95.
43. Pascual G, Hernández-Gascón B, Rodríguez M, Sotomayor S, Peña E, Calvo B, Bellón JM. The long-term behavior of lightweight and heavyweight meshes used to repair abdominal wall defects is determined by host tissue repair process provoked by the mesh. *Surgery*. 2012; [Epub ahead of print].
44. Orestein SB, Saberski ER, Kreutzer DL, Novitski YW. Comparative analysis of histopathologic effects of synthetic meshes based on material, weight and pore size in mice. *J Surg Res*. 2012;176(2):423-9.
45. Laschke MW, Häufel JM, Scheuer C, Menger MD. Angiogenic and inflammatory host response to surgical meshes of different mesh architecture and polymer composition. *J Biomed Res B Appl biomater*. 2009;91(20):497-507.
46. Bellón JM, Rodríguez M, García-Honduvilla N, Gómez-gil V, Pascual G, Buján J. Comparing the behavior of different polypropylene meshes (heavy and lightweight) in a experimental model of ventral hernia repair. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;89(2):448-55.
47. Pascual G, Rodríguez M, Góez-Gil V, García-Honduvilla N, Buján J, Bellón JM. Early tissue incorporation and collagen deposition in lightweight polypropylene meshes: bioassay in an experimental model of ventral hernia. *Surgery*. 2008;144(3):427-35.
48. Klinge U, Klosterhalfen B. Modified classification of surgical meshes for hernia repair based on the analyses Of 1,000 explanted meshes. *Hernia*. 2012;16(30);251-8.

49. Corcine F, Cuccurullo D. Teaching and learning in abdominal wall surgery: where are we going? *Hernia*. 2009;13(1):101-2.
50. Mazzurana M. Avaliação da expressão da HSP70, da deposição do colágeno e das células inflamatórias nas anastomoses intestinais de ratos hipovolêmicos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo;2007.
51. Di Vita G, Patti R, Barrera T, Arcoleo F, Cillare E. Impact of polypropylene mesh and composite light polypropylene and polyglactin 910 on the inflammatory response. *Surg Innov*. 2010;17(3):229-35.
52. Agarwall BB, Agarwall KA, Sahu T, Mahajan Kc. Traditional polypropylene and lightweight meshes in totally extraperitoneal inguinal herniorrhaphy. *Int J Surg*. 2010;8(1):44-7.
53. Junge K, Klinge U, Rosch R, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Functional and morphologic properties of a modified mesh for inguinal hernia repair. *World J Surg*.2002;26:1472-80.
54. Peeters E, Spissens C, Oyen R, De wever L, Vanderscheueren D, Pennickx F, Miserez M. Laparoscopic inguinal hernia repair in men with lightweight meshes may significantly impair sperm motility: a randomized control trial. *Ann Surg*. 2010; 252(2):240-6.
55. Weyhe D, Hoffmann P, Belyaev O, Mros K, Muller C, Uhl W, Schmitz F. The role of TGF-beta1 as a determinant of foreign body reaction to alloplastic materials in rat fibroblast cultures: comparison of different commercially available polypropylene meshes for hernia repair. *Regul Pept*. 2007;138(1):10-4.
56. O'Dwyer PJ, Kingsnorth AN, Molloy RG, Small PK, Lammers B, Hieryseck G. Randomized clinical trial assessing impact of a lightweight or heavyweight mesh on chronic pain after inguinal hernia repair. *Br J Surg*. 2005;92(2):166-70.
57. Goldenberg A, Matone J, Marcondes W, Herbella FAM, Farah JFM. Comparative study of inflammatory response and adhesions formation after fixation of different meshes for inguinal hernia repair in rabbits. *Acta Cir Bras*. 2005;20(5):347-52.
58. Weyhe D, Schmitz I, Belyaev O, Muller KM, Uhl W, Zumtobel V. Experimental comparison of monofilament light and heavy polypropylene

- meshes: less weight does not mean less biological response. *World J Surg.* 2006;30:1566-91.
59. Di Vita G, Patti R, Sparacello M, Balistreri CR, Candore G, Caruso C. Impact of different texture of polypropylene mesh on the inflammatory response. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008 Jan-Mar;21(1):207-14.
 60. Harrell AG, Novitky YW, Kercher KW, Foster M, Burns JM, Kuwada TS, Heniford BT. In vitro infectability of prosthetic mesh by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Hernia.* 2006;10(2):120-4.
 61. Chatzimavroudis G, Koutelidakis I, Papaziogas B, Tsaganos T, Koutoukas P, Giamarellos-Bourboulis E, Atmatzidis S, Atmatzidis K. The effect of the type of intraperitoneally implanted prosthetic mesh on the systemic inflammatory response. *Hernia.* 2008 Jun;12(3):277-83.
 62. Schreinemacher MH, Emans PJ, Gijbels MJ, Greve JW, Beets GL, Bouvy ND. Degradation of mesh coatings and intraperitoneal adhesion formation in an experimental model. *Br J Surg.* 2009 Mar;96(3):305-13.
 63. Schug-Pass C, Tamme C, Tannapfel A, Kockerling F. A lightweight polypropylene mesh (Timesh) for laparoscopic intraperitoneal repair of abdominal wall hernias: comparison of biocompatibility with the DualMesh in an experimental study using the porcine model. *Surg Endosc.* 2006;20(3):402-9.
 64. Schug-Pass C, Sommerer F, Tannapfel A, Lippert H, Köckerling F. Does the additional application of a polylactide film (SurgiWrap) to a lightweight mesh (TiMesh) reduce adhesions after laparoscopic intraperitoneal implantation procedures? Experimental results obtained with the laparoscopic porcine model. *Surg Endosc.* 2008;22(11):2433-9.
 65. Scheidbach H, Tamme C, Tannapfel A, Lippert H, Köckerling F. In vivo studies comparing the biocompatibility of various polypropylene meshes and their handling properties during endoscopic total extraperitoneal (TEP) patchplasty: an experimental study in pigs. *Surg Endosc.* 2004;18(2):211-20.
 66. Lintin La, Klingsnorth NA. Mechanical failure of a lightweight polypropylene mesh. *Hernia.* 2012 [Epub ahead of print].
 67. Wang D, DuBois RN. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene.* 2010;29(6):781-8.

68. Blatnik Ja, Krpata DM, Jacobs Mr, Gao Y, Novitsky YW, rosen MJ. In vivo analysis of the characteristics of synthetic mesh to resist MRSA adherence. *J. Gastrointest Surg.* 2012. [Epub ahead print].
69. Orenstein SB, Saberski ER, Klueh U, Kreutzer DL, Novitsky YW. Effects of mast cells modulation on early host response to implanted synthetic meshes. *Hernia.* 2010;14(5):511-6.
70. Brandt CJ, Kammer D, Fiebeler A, Klinge u. Beneficial effects of hydrocortisone or spironolactone coating on foreign body response to mesh biomaterial in a mouse model. *J Biomed Mater Res A.* 2011;99(3):335-43. Reducing the Use of Laboratory Animals in
71. Festing MFW, Baumans V, Combes RD, Halder M, Hendriksen CFM, Howard BR, Lovell DP, Moore GJ, Overend P, Wilson MS. Biomedical Research: Problems and Possible Solutions. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA.* 1998;26: 283-301.
72. Farias EA, Fontes PRO, Rhoden CR, Lucas ML, Leal MLM, Sabedotti M, Rhoden EL. Acompanhamento de um modelo de indução de cirrose em ratos mediante vídeolaparoscopia. *Acta Cir Bras [serial online].*
73. Migdalof BH. Methods for obtaining drug time course data from individual small laboratory animals: serial microblood sampling and assay. *Drug Met Rev.* 1976;5(2):295-310.
74. Baktir A, Dogru O, Girgin M, Aygen E, Kanat BH, Dabak DO, Kuloglu T. The effects of different prosthetic materials on the formation of collagen types in incisional hernia. *Hernia.* 2012. [Epub ahead of print].

ABSTRACT

Purpose: Hernia repair is a very frequent surgery. Although mesh implants reduced post-operative recurrence, it also has raised complications what are specially related with inflammatory host tissue response. Many authors have researched about this topic, but currently there is no an ideal mesh. This study aims to compare the serum and tissue inflammatory responses and collagen deposition caused by three different meshes, all made of polypropylene, on early and late postoperative. **Methods:** Thirty Wistar rats were divided into three groups. In group A, a heavyweight polypropylene mesh was implanted in a defect created on the muscular abdominal wall. In groups B and C, lightweight polypropylene mesh was used in associations with an absorbable (polyglactin) and a no absorbable material (titanium), respectively. Immediately before the operation and on the first postoperative, and 7th postoperative days (PO), pro-inflammatory cytokines were assayed. The animals were sacrificed on 7th postoperative day (PO) and the region of the implanted mesh was biopsied. Hematoxylin-eosin and trichromic of Masson colorations were employed to value the tissue inflammatory reaction with a numeric scale for objective scoring. Immunohistochemistry for VEGF and COX2 was made and numeric scales are also employed to score. For collagen deposition study, picosirius was employed with data reading using the Image Tool computer program. The results on 7th PO were compared with those noticed on 40th PO by our group another research which used the same methodology. Statistics software: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 19.0 for Windows, R-Program version 2.11.1. **Results:** Cytokines: there were no statistically significant differences between the groups. On 7th PO there were no histologic inflammatory reaction statistically significant differences between the groups. However, when these results were compared with those on 40th PO, there was an increased inflammation in the group B ($p<0,001$). Immunohistochemistry: on 7th PO, there was a VEGF ($p<0,001$) and COX2 ($p<0,001$) high expression in group A. On 40th PO, there was reduction of VEGF ($p<0,001$) expression in all groups and COX2 expression reduction in group A ($p=0,011$), but not in groups B and C. Collagen: there was a better and a more intense collagen deposition, on 7th PO, in group A ($p=0,023$) and a worst and less intense in group B. On 40th PO, there was a collagen deposition reduction for all groups, however group A continued with the better collagen deposition. **Conclusions:** 1 - There was a similar histologic inflammatory response, a higher expression of VEGF and COX2 in addition to collagen deposition more intense, in heavyweight polypropylene mesh on 7th PO. On 40th PO, this mesh presented the same inflammatory response, VEGF and COX2 falls and collagen reduction. 2 - The polypropylene + polyglactin mesh presented similar histologic inflammatory response, lower expression of VEGF and COX2 in tissue and less deposition of collagen on 7th PO. On 40th PO there was an increase of inflammatory response; collagen deposition and

VEGF were reduced, but not COX2. 3 – Lightweight polypropylene + titanium mesh presented intermediate results in relation to the others groups with similar inflammatory reaction on 7th and 40th PO and VEGF and collagen reduction on 40th PO.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Rother ET e Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª ed. rev. e ampl. São Paulo, 2005.

Dicionário Priberan da Língua Portuguesa [dicionário da Internet]. Lisboa: Priberan Informática; 1998 [acesso em setembro de 2012]. Disponível em <http://www.priberan.pt/dlpo>.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde [Biblioteca Virtual em Saúde]. Brasil; 2008 [acesso em setembro de 2012]. Disponível em <http://decs.bvs.br/>.

Lincoplex Kits [catálogo Lincoplex]. Millimore – Gênese. São Paulo: 2006. Pontes ACF, Corrente JE.

Comparações múltiplas não paramétricas para o delineamento com um fator de classificação simples. Rev. Mat. Estat. São Paulo. 2001;19:179-197.