



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA GOMES PARIZI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO USO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) NA INTEGRAÇÃO DE TELAS DE
POLIPROPILENO IMPLANTADAS EM MUCOSA VAGINAL
DE COELHAS**

Londrina
2015

NATÁLIA GOMES PARIZI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO USO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) NA INTEGRAÇÃO DE TELAS DE
POLIPROPILENO IMPLANTADAS EM MUCOSA VAGINAL
DE COELHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para o exame de qualificação do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida.

Londrina
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Bibliotecária responsável: Marlova Santurio David – CRB 9/1107

P234a Parizi, Natália Gomes.
Análise histológica do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na integração de telas de polipropileno implantadas em mucosa vaginal de coelhas / Natália Gomes Parizi . – Londrina, 2015.
41 f. : il.

Orientador : Silvio Henrique Maia de Almeida.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Assoalho pélvico – Histopatologia – Teses. 2. Plasma rico em plaquetas (PRP) – Teses. 3. Urina – Incontinência – Teses. 4. Urologia feminina – Teses. I. Almeida, Silvio Henrique Maia de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.6-089

NATÁLIA GOMES PARIZI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO USO DO PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) NA INTEGRAÇÃO DE TELAS DE
POLIPROPILENO IMPLANTADAS EM MUCOSA VAGINAL DE
COELHAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Estadual de Londrina, para o exame de qualificação do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cássio Zanetti Riccetto
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Prof. Dr. Waldiceu Verri Jr
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Émerson Gregório
Universidade Pontifícia Católica do Paraná –
PUCPR

Prof Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 08 de abril de 2015

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fonte de muita dedicação e colaboração de inúmeras pessoas, sem as quais não seria possível sua conclusão.

Primeiramente agradeço a Deus por me capacitar a exercer esta profissão que tanto amo e me dedico, por me desafiar a superar minhas próprias expectativas e por inspirar minhas perguntas me ensinando a chegar às respostas.

Aos meus pais. Mestres tão dedicados a vida acadêmica, meus maiores incentivadores, foram eles que não me deixaram desistir, que estiveram ao meu lado em cada dificuldade desta jornada. Hoje sou reflexo de todo amor e dedicação de vocês.

A minha tia Marilis, minha segunda mãe, que me deu suporte, aquela que me lembrou o tempo todo que só com a educação se pode mudar o mundo.

A todos amigos e familiares que compreenderam minha ausência e me motivaram nestes dois anos de trabalho.

A todos meus colegas de profissão, que me ajudaram nas trocas de plantões e coberturas para que eu pudesse cumprir a primeira fase deste mestrado.

Aos colaboradores deste projeto, em especial aos colegas do biotério da UEL, a secretaria de pós-graduação em ciências da saúde, aos acadêmicos do curso de medicina da UEL e ao colega Oscar Rubini Ávila, inseridos no projeto de pesquisa. Todos vocês tiveram uma participação muito importante, muitas vezes fundamental neste projeto.

Por fim agradeço em especial ao Professor Doutor Silvio H. M. Almeida, por acreditar em mim mesmo quando eu não acreditava, por sua paciência em todas as vezes que eu disse que não conseguiria, por me fazer chegar até aqui. Muito obrigada.

PARIZI, Natália G. **Análise histológica do uso do plasma rico em plaquetas (PRP) na integração de telas de polipropileno implantadas em mucosa vaginal de coelhas.** Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

RESUMO

Introdução: As telas de polipropileno vêm sendo utilizadas dentro da ginecologia na correção de defeitos do assoalho pélvico e incontinência urinária de esforço (IUE), entretanto ainda apresentam taxas significativas de complicações, provavelmente decorrentes de uma resposta inflamatória inadequada. O plasma rico em plaquetas vem sendo empregado com sucesso em diversas áreas da Medicina, proporcionando um melhor processo de reparo de feridas, conseqüente à sua elevada quantidade de fatores de crescimento. **Objetivo:** Estudar o efeito do recobrimento do gel de plasma rico em plaquetas (PRP) na integração de telas de polipropileno monofilamentar implantadas em mucosa vaginal de coelha. **Métodos:** 30 coelhas adultas da raça White New Zealand, foram submetidas à cirurgia de implante da tela de polipropileno monofilamentar em suas vaginas, sendo que em 15 delas junto à tela se depositou plasma rico em plaquetas na forma de gel. Estas coelhas foram divididas em 3 grupos de 10 coelhas (5 com e 5 sem PRP) eutanasiadas 7, 30 e 90 dias após a cirurgia para a extração da vagina e tela. A avaliação do infiltrado inflamatório se deu através da contagem de células inflamatórias usando a coloração hematoxilina-eosina. O depósito de colágeno tipo I e III foi avaliado através da coloração de Picro-Sirius. Os resultados foram apresentados em mediana e intervalo interquartilício (P75-P25) e submetidos aos testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Devido à violação da normalidade os dados foram tratados com testes não paramétricos. Para as comparações entre os grupos com e sem PRP e entre os tempos de eutanásia foram empregados os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* seguido do teste de múltiplas comparações proposto por *Bonferroni*. $P < 0,05$. **Resultados:** Houve diferença significativa no número de células inflamatórias entre os grupos com e sem PRP após 30 dias. O grupo com PRP apresentou contagem inferior de células inflamatórias comparado ao sem PRP. Ocorreu aumento na produção de colágeno tipo III com o uso do PRP, após 90 dias. **Conclusão:** Não houve alteração na resposta inflamatória aguda (7 dias) com o uso do PRP. A contagem de células inflamatórias que aumentou significativamente no grupo sem o PRP após 30 dias, não se elevou no grupo com PRP, indicando redução da resposta inflamatória. Houve aumento significativo de colágeno tipo III após 90 dias do estudo.

Palavras chave: Plasma rico em plaquetas. Telas. Colágeno. Coelhos. PRP. Inflamação.

PARIZI, Natália G. **Histological analysis of the use of platelet-rich plasma (PRP) in the integration of implanted polypropylene meshes with rabbits' vaginal mucosa.** Master Thesis (Health Science Specialization) – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

ABSTRACT

Introduction: Polypropylene meshes have been applied in gynaecology for the correction of pelvic floor dysfunction and for stress urinary incontinence (SUI). However, there are still significant rates of complications, probably due to an inappropriate inflammatory response. The platelet-rich plasma has been successfully used in several areas of Medicine, providing improvements of wound healing as a result of its high amount of growth factors. **Objective:** To study the effect of the impregnation of platelet-rich plasma (PRP) in the integration of monofilament polypropylene mesh implanted in rabbits' vagina. **Method:** 30 adult female New Zealand rabbits were submitted to monofilament polypropylene mesh implant in their vaginas and in 15 of them a PRP gel was also deposited on the meshes. The rabbits were divided into 3 groups of 10 rabbits (5 with and 5 without PRP) and euthanized at 7, 30 and 90 days after surgery for the extraction of both their vagina and mesh. The evaluation of the infiltrated inflammatory was made through the counting of neutrophil in eosin-haematoxylin staining. The collagen types I and III deposition were evaluated by picosirius and trichrome of Masson staining. The results were presented using the median and interquartile range (P75-P25) and submitted to the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Due to normality violation, non-parametric tests were applied to the data. For comparison between groups with and without PRP and between euthanasia times, the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used, followed by multiple comparison test proposed by Bonferroni. $P < 0.05$. **Results:** After 30 days there were significant differences in the neutrophils count between the groups with and without PRP. The group with PRP showed a lower neutrophils count compared with the group without PRP. After 90 days, there was an increase in the production of collagen type III in PRP group. **Conclusion:** There was no change in the immediate inflammatory response (7 days) using the PRP. After 30 days, there was a significant increase in the count of neutrophils in the group without the PRP, a change that was not noted in the group with PRP. This observation indicates a reduction of the inflammatory response. There was a significant increase in collagen type III after 90 days of the study.

Keywords: Platelet-rich plasma. Meshes. Collagen. Rabbits. PRP. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Demonstração do gel de PRP.....	21
Figura 2 – Média da concentração plaquetária em plasma centrifugado comparado ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	21
Figura 3a – Demonstração dos resultados obtidos para a contagem do número de células inflamatórias por campo, nos grupos com e sem PRP nos diferentes tempos do estudo.....	25
Figura 3b – Aspecto histológico da reação inflamatória com 30 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração HE, objetiva 20x).....	25
Figura 3c – Aspecto histológico da reação inflamatória com 30 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração HE, objetiva 20x).....	26
Figura 4a – Apresentação da mediana em Micra ² para o colágeno tipo III nos diferentes tempos de eutanásia para os grupos com e sem PRP	26
Figura 4b – Aspecto histológico do colágeno tipo III com 90 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x)	27
Figura 4c – Aspecto histológico do colágeno tipo III com 90 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x)	27
Figura 5a – Apresentação da mediana em Micra ² para o colágeno tipo I nos diferentes tempos de sacrifício para os grupos com e sem PRP	28
Figura 5b – Aspecto histológico do colágeno tipo I com 90 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x)	28
Figura 5c – Aspecto histológico do colágeno tipo I com 90 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x)	29
Figura 6a – Apresentação da mediana em Micra ² da área de musculatura lisa. nos diferentes tempos de eutanásia para os grupos com e sem PRP	29
Figura 6b – Aspecto histológico da musculatura lisa com 07 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Tricômio de Masson, objetiva 20x)	30
Figura 6c – Aspecto histológico da musculatura lisa com 07 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Tricômio de Masson, objetiva 20x)	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediana e Intervalo interquartilico nos diferentes tempos de eutanásia, dos grupos com e sem PRP para todos os critérios avaliados.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
IUE	Incontinência Urinária de Esforço
TVT	<i>Tension-free Vaginal Tape</i>
IVS	<i>Sling Intravaginal</i>
IUGA	<i>International Urogynecological Association</i>
ICS	<i>International Continence Society</i>
C	<i>Category</i>
T	<i>Time</i>
S	<i>Site</i>
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
PHN	<i>Public Health Notification</i>
PVA	Poli Vinil Álcool
GSNO	<i>S-Nitrosoglutatione</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
TGF-beta	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
FP4	Fator Plaquetário 4
IL-1	Interleucina 1
PDAF	<i>Platelet Derived Angiogenic Factor</i>
VEGF	<i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
PDEGF	<i>Platelet Derived Endotelial Growth Factor</i>
ECGF	<i>Epitelial Cell Growth Factor</i>
IGF	<i>Insuline-like Growth Factor</i>
TSP	Trombospondina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UEM	Universidade Estadual de Maringá
RPM	Rotações Por Minuto
HURNPR	Hospital Universitário do Norte do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVO	19
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	DELINEAMENTO	20
4.2	AMOSTRA	20
4.3	MATERIAIS	20
4.4	ETAPAS EXPERIMENTAIS	21
4.5	COLETA DOS ESPÉCIMES E PREPARO PARA ESTUDO	22
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5	RESULTADOS	24
5.1	RESPOSTA INFLAMATÓRIA	24
5.2	COLÁGENO TIPO III	26
5.3	COLÁGENO TIPO I	27
5.4	MUSCULATURA LISA	29
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXOS	40
	Anexo 1 – Aprovação pelo Comitê de Ética no uso de Animais - CEUA/UEL	41

1 INTRODUÇÃO

A sustentação pélvica se dá através da musculatura do assoalho pélvico e seus ligamentos, esta musculatura é constituída por músculos superficiais e profundos, sendo os músculos elevadores do ânus os mais importantes no processo de continência e esvaziamento vesical e intestinal¹, atuando de forma sinérgica no mecanismo da micção por ação no aparelho esfinteriano intrínseco da uretra. O processo de fechamento da uretra ocorre devido a uma combinação de fatores intrínsecos representados pelo músculo estriado e liso da parede uretral, congestão vascular do plexo venoso da submucosa e de vasos sanguíneos associados, e também de fatores extrínsecos, compostos pelos músculos elevadores do ânus, fásia endopélvica e suas fixações. Qualquer ineficiência neste processo tem com consequência a perda da sustentação, desenvolvendo uma hiper mobilidade uretral e do colo vesical, deficiência intrínseca da uretra e consequente incontinência urinária^{1,2}.

O assoalho pélvico e sua sustentação também participam de forma ativa na resposta sexual feminina, sendo sua preservação fundamental para a qualidade de vida da mulher.

O enfraquecimento ou mesmo o rompimento deste assoalho, decorrentes de partos traumáticos, hipoestrogenismo, esforço abdominal repetitivo, entre outros fatores, leva aos prolapso das estruturas sustentadas e incontinência urinária de esforço (IUE)², definida como perda involuntária de urina durante aumento da pressão intra-abdominal, gerando grande impacto sócio-econômico e psicológico para estas mulheres^{3,4}.

O prolapso de órgãos pélvicos e a incontinência urinária têm sua prevalência e incidência elevadas com o decorrer da idade. Entre mulheres adultas, consideradas saudáveis, com sessenta anos ou mais, cerca de um terço possuem algum grau de prolapso urogenital³. Também, a incontinência urinária de esforço é a forma mais comum de incontinência no sexo feminino, afetando até 30% das mulheres. Cerca de 10% delas apresentam perdas urinárias semanais e uma em cada 1000 mulheres acabará necessitando de tratamento cirúrgico⁴. Estudos com a população norte americana revelam o acometimento de 13 milhões de norte americanas e aproximadamente 1 milhão de casos novos/ano, com custo anual de 11.2 bilhões de dólares aos cofres públicos¹.

A IUE e os prolapso vaginais representam afecções de grande impacto social, econômico e psicológico como depressão e ansiedade⁵, sendo muitas vezes incapacitante. Por outro lado, a instituição de um tratamento adequado e bem sucedido pode melhorar a qualidade de vida e a auto-estima dessas mulheres^{5,6}.

O tratamento destas distopias é dividido em não cirúrgicos e cirúrgicos. O tratamento não cirúrgico tem o objetivo de fortalecer a musculatura pélvica através da reabilitação do assoalho pélvico, com os exercícios de fortalecimento do assoalho pélvico, uso de cones

vaginais e eletroestimulação da musculatura. Esse tratamento tem taxas de cura e melhora dos sintomas pouca satisfatórias quando realizado isoladamente, porém quando associado ao tratamento cirúrgico se elevam consideravelmente, próximo a 70%⁷. Nos casos de IUE o tratamento medicamentoso só é indicado quando a presença de atrofia genital importante decorrente da hipoestrogenia com o intuito de melhorar o trofismo da mucosa genital ou em situações clínicas onde outros métodos estão contra-indicados⁸. A Duloxetina nessa situação atua aumentando a força de contração esfíncteriana⁹.

O tratamento cirúrgico evoluiu muito com o passar dos anos. A primeira técnica foi descrita em 1914 por Howard Kelly, a Colporrafia Vaginal Anterior, que se baseava na constrição do colo vesical através de suturas e plicaturas periuretrais, com baixa taxa de sucesso tardia (apenas 35-65%¹).

Em 1949 Marshall, Marchetti e Krantz descreveram a Uretropexia retropúbica que consiste em abordagem através de incisão abdominal baixa ou que posteriormente evoluiu para assistida por videolaparoscopia, com exposição do espaço de Retzius e fixação da fáscia endopélvica ou perivesical em estrutura de sustentação da pelve anterior.

Em outra técnica, a Colpossuspensão de Burch esta fixação ocorre no ligamento de Cooper, e já no procedimento da prateleira vagino-obturatória de Turner-Warwick a fáscia é fixada à fáscia do musculo obturador externo¹⁰. A taxa de sucesso destas técnicas varia entre 70-90% porém com complicações significativas como osteíte púbica e predisposição a desenvolver enterocele, prolapso uterino e eversão de cúpula vaginal^{5,6,11}. Especificamente em relação às cirurgias de correção de prolapso, a recidiva do prolapso anterior ocorre em de cerca de 60% após colporrafia anterior e de 20% após colposuspensão de Burch¹⁰. Essas correções, chamadas de sítio específicas, também apresentam complicações como obstrução ureteral bilateral, hematoma retropúbico, abscessos vaginais, entre outros¹². A sacroespinhosopexia também pode apresentar taxas de recorrência e complicações significativas. A colporrafia posterior também se associa a taxas de recorrência de 18% a 24% após um ano do procedimento¹¹.

A partir da experiência com uretras incompetentes em crianças com bexiga neurogênica e do melhor entendimento da fisiopatologia da IUE, foram introduzidos os *slings* aponeuróticos, que apresentam resultados superiores às técnicas anteriores e, dessa forma, se tornaram a cirurgia de escolha naquele momento. Entretanto os *slings* aponeuróticos apresentam um índice moderado de disfunção miccional¹². Fundamentados pela Teoria Integral, Petros e Ulmsten, em 1996, propuseram a colocação de um dispositivo suburetral, na topografia da uretra média, objetivando a estabilização da uretra durante o esforço. Esse procedimento ficou conhecido como *Tension-free vaginal Tape* (TVT) e tornou-se mundialmente reconhecido^{13,14}. Os bons resultados e reprodutibilidade da técnica, com

menores taxas de disfunção miccional a tornaram o “padrão-ouro” para o tratamento da IUE¹⁵.

Algumas complicações, relacionadas com a presença da tela, também estão presentes na técnica de TVT, sendo a infecção, retração cicatricial, formação de seroma, erosão, extrusão e fistulização as mais comuns. Entretanto, devido às qualidades anteriormente citadas, ela persiste como a mais utilizada¹⁶.

O emprego de próteses (telas) permite maior padronização dos procedimentos, diminuição do tempo cirúrgico e de recuperação pós-operatória, possibilitando retorno mais precoce da paciente às suas atividades habituais.

Uma grande variedade de biomateriais tem sido empregada na reconstrução do assoalho pélvico, já sendo consenso que para uma baixa morbidade deve apresentar baixo peso, ser inerte, com poros maiores que 75 µm, trama monofilamentar e com uma elasticidade entre 20% e 35%¹⁷. O advento do uso de malhas sintéticas expandiu as opções para tratamento dos prolapso dos órgãos pélvicos. Foram observadas diferenças clínicas significativas, nos resultados de cura e principalmente nas complicações, entre as telas de polipropileno monofilamentar e multifilamentar. Tais diferenças, favoráveis ao uso das telas monofilamentares, podem relacionar-se às características da mesma, incluindo o tipo de trançamento dos filamentos e tamanho dos poros¹⁶. Considera-se que tais diferenças podem determinar alterações da sua biocompatibilidade e, conseqüentemente, da tendência à infecção, erosão e extrusão vaginal¹⁸. As telas sintéticas mais utilizadas e indicadas no momento são o Tipo I¹⁹ - Telas macroporosas com poros maiores que 75µm – diâmetro necessário para a passagem de macrófagos e fibroblastos, bem como a angiogênese e deposição de fibras colágenas¹⁹. As telas do tipo II são as que possuem poros menor que 10µm, que oferecem uma barreira à entrada de macrófagos. As telas do tipo III possuem porosidade mista associada a um componente multifilamentar. Por fim existem as telas tipo IV com poros submicrônicos²⁰.

A existência de algumas complicações pode estar relacionadas com o tipo de tela, sendo as mais comuns listadas por Cervigni²¹: infecção, seroma, retração, erosão e extrusão. As taxas de infecção variam de 9,6% a 50% nas telas dos tipos II e III e são raras nas telas do tipo I. Seromas são gerados pela reação inflamatória local e pelo espaço morto deixado entre os tecidos e a tela. Telas dos tipos I e III permitem a rápida penetração da matriz extracelular em seus macroporos, minimizando esse risco. Telas do tipo II têm risco de formação de seromas que varia de 9,6% a 14,3%. Após a formação da cicatriz, pode ocorrer retração da tela em até 20%. Tal reação pode ser indesejada ou inconveniente, quando causa efeitos compressivos ou obstrutivos¹¹. Uma perigosa reação das telas é a erosão de órgãos adjacentes como uretra, bexiga, intestino e extrusão pela mucosa vaginal. Tais

complicações foram relatadas entre seis semanas e seis anos após a cirurgia, com taxas variando entre 2,8% e 20%¹¹.

Em estudos prospectivos randomizados, Baessler et al. (2003) e Glavind e Sander (2004) descreveram taxa de extrusão de 9% e 14%, respectivamente, nas pacientes que realizaram *sling* Intravaginal (IVS), com tela multifilamentar, em contraposição com a ausência dessa complicação no grupo submetido à *sling* com TVT^{22,23}. Siegel et al. (2005) descreveram extrusão vaginal em 17% das pacientes que realizaram *sling* pubovaginal com IVS²⁴.

Considera-se que, enquanto a erosão uretral relaciona-se, frequentemente, com tensão exagerada ou lesão inadvertida da uretra durante o procedimento, a extrusão vaginal decorre de infecção local, por vezes subclínica ou de integração defeituosa do *sling* ao hospedeiro²⁵.

Estudando-se a integração dessas telas no reparo de prolapso genitais, já é sabido que os fatores locais como trofismo tecidual, infecção e a técnica cirúrgica, estão diretamente relacionados às taxas de extrusão^{26,27}. Além disso, a integração tecidual está relacionada ao peso, estrutura e porosidade das telas^{28,29}.

Com o intuito de padronizar o relato das complicações devido ao uso de telas a *International Urogynecological Association* (IUGA) associada à *International Continence Society* (ICS) articularam uma classificação da terminologia das complicações baseadas na Categoria (C), tempo (T) e local (S). Assim cada complicação apresenta um código com 3 ou 4 letras e 3 números, facilitando o registro e o entendimento para possíveis esclarecimento posteriormente¹⁷. Essa classificação relaciona o local, tempo de surgimento da complicação, e a presença sintomas.

Devido ao grande número de complicações com o uso de próteses sintéticas o FDA (*Food and Drugs Administration*), órgão de controle e regulação de drogas/próteses dos Estados Unidos, reportou mais de 1000 efeitos adversos inesperados e graves com o uso de tela no tratamento de distopias genitais e IUE, em 2008 em uma Notificação de Saúde Pública (PHN). Em 2011 a classificação de risco do uso de telas foi elevada, sendo necessária a aprovação prévia de uso e vigilância subsequente²⁹.

Em uma tentativa de minimizar estas complicações, estudos prévios, avaliaram o recobrimento de telas com materiais previamente conhecidos pelo seu potencial de aceleração da cicatrização de feridas e modulação do depósito de colágeno. Prudente et al. (2012) em um estudo em ratas avaliaram o recobrimento das telas de polipropileno com PVA (Poli Vinil Álcool) e PVA + GSNO (S-nitrosoglutatione), um doador de óxido nítrico. Os resultados sugeriram que na concentração adequada o GSNO é capaz de reduzir a resposta fibroblástica, sem aumentar a reação inflamatória³⁰. Em outro estudo agora em 2013 Prudente et al. confirmaram seus resultados com o recobrimento das telas com PVA e PVA +

GSNO, com a análise histológica demonstrando redução do edema local e aumento da angiogênese³¹. Em um estudo in vitro comparando o recobrimento de telas de polipropileno com PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells), plaquetas e plasma, Gerullis et al. (2013) concluíram que o plasma promoveu um aumento da biocompatibilidade das telas, justificando estudos in vivo³².

O Plasma rico em plaquetas (PRP) é uma biotecnologia relativamente nova descrita primariamente por Marx et al. em 1998, com a proposta de explorar seu potencial de aumentar a formação óssea.³³ Consiste na porção do plasma com uma concentração plaquetária, leucocitária e de fatores associados à coagulação e reparo de feridas³⁴, superior em média 2 a 3 vezes ao plasma sanguíneo.

Entretanto ainda não se chegou a um consenso quanto a concentração adequada de plaquetas no PRP, e estes valores variam de 1,8 a até 4 vezes acima do número de plaquetas inicial^{33,36,37,38}. Oliveira et al. em um modelo animal experimental chegou a valores de plaquetas bem próximos aos descritos na literatura com o método de dupla centrifugação³⁵. Em 2012 Vanat et al. alcançou valores de PRP de 2 a 6 vezes maior que os valores basais³⁵.

Os estudos científicos sobre cicatrização de tecidos moles e ósseos sugerem a utilização de PRP com mínimo de 100.000 plaquetas/ μ l, sendo que concentrações plaquetárias inferiores não garantem aumento da taxa de cicatrização, e concentrações superiores não mostraram melhores resultados³⁸.

As plaquetas, devido à liberação de inúmeras proteínas, possuem papel fundamental na regeneração de tecidos, participando ativamente nos processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação e crescimento de células mesenquimatosas pluripotentes, além de induzir indiretamente, através de mediadores a produção da matriz extracelular. Portanto além da formação do coágulo, atua de forma ativa na reparação de feridas³⁶.

As plaquetas contêm fatores de crescimento que são liberados de seus grânulos logo após a formação do coágulo. As proteínas contidas nos grânulos alfa das plaquetas possuem uma forte influência nos fenômenos reparatórios das feridas. Entre essas proteínas encontram-se: fator de crescimento derivado das plaquetas ("platelet derived growth factor" ou PDGF); o fator transformante do crescimento beta ("transforming growth factor" ou TGF- β); o fator plaquetário 4 (FP4); interleucina 1 (IL-1); o fator angiogênico derivado das plaquetas ("platelet derived angiogenic factor" ou PDAF); o fator de crescimento endotelial vascular ("vascular endotelial growth factor" ou VEGF); o fator de crescimento epidérmico ("epidermal growth factor" ou EGF); o fator de crescimento endotelial derivado das plaquetas ("platelet derived endotelial growth factor" ou PDEGF); o fator de crescimento celular epitelial ("epithelial cell growth factor" ou ECGF); o fator de crescimento tipo insulina ("insulin-like growth factor" ou IGF); osteocalcina; osteonectina; fibrinogênio; fibronectina e

trombospondina (TSP)³⁸. As plaquetas começam a secretar ativamente essas substâncias 10 minutos após a formação do coágulo³⁸.

Devido à concentração elevada de plaquetas no PRP acredita-se em uma resposta melhor à lesão tecidual e conseqüente redução das complicações cirúrgicas. Diversas especialidades cirúrgicas iniciaram o uso do PRP e seus defensores afirmam uma menor incidência de fistulas, hemorragias e infecções^{39,40,41,42,43}. Taylor et al. em uma revisão sistemática da literatura observaram grande benefício no uso do PRP no tratamento de lesões ligamentares e tendinosas, com melhor recuperação e redução da recorrência das lesões³⁹. Spyridakis et al. (2009), em um estudo de caso controle, relataram forte evidencia que o PRP age diretamente no processo de cicatrização de feridas e recuperação cirúrgica⁴⁰. Rappl et al. estudando o uso do PRP no tratamento de feridas crônicas concluíram que o PRP torna o processo de cicatrização mais rápido⁴¹. Everts et al. em uma revisão da literatura definiram uma ampla gama de aplicações clínicas no uso do PRP após procedimentos cirúrgicos⁴². Batista et al, em estudo experimental com coelhas, observaram uma melhor consolidação óssea com o uso do PRP comparada ao concentrado de medula óssea⁴³. Recentemente nova forma de utilização surgiu com o uso laparoscópico ou endoscópico para promover diminuição da incidência de fistulas, hemorragia e infecção após anastomoses gastro-intestinais⁴⁴. Também uma redução de infecções pós-operatórias severas em cirurgia cardíaca foi observada após a aplicação de PRP⁴³.

O PRP também é uma opção para fixar telas em herniorrafias. Zieren et al. e Sclafani et al. observaram aceleração no processo de cicatrização após o uso de PRP em herniorrafias com telas sintéticas⁴⁴.

Dados preliminares em várias especialidades cirúrgicas indicam que o gel autólogo de PRP favorece rápida cicatrização e aumento na produção de colágeno. Assim, seria possível que o PRP também estimulasse a produção de colágeno na matriz extracelular, melhorando os índices de sucesso do uso de telas em Uroginecologia. Porém não existem estudos consistentes em cirurgia pélvica. Einarsson et al em um estudo clínico com pequeno número de pacientes submetidas à correção de prolapso anterior de vagina associado ao uso intraoperatório de gel de PRP, realizando seguimento através de biopsia local, não demonstraram melhora na produção de colágeno aos 3 meses e nos índices de re-operação com 10 meses de acompanhamento⁴⁵. Este é o único estudo clínico em uroginecologia com o uso de telas e PRP, onde se implantou PRP durante o procedimento cirúrgico e observou-se os resultados de complicações e cura, entretanto sem a presença de um grupo controle. Com base nestes estudos se questiona sua utilização junto às telas de polipropileno na Uroginecologia, que, além de reduzir os fatores inflamatórios, poderia estimular a produção de colágeno na matriz extracelular, elevando consideravelmente as taxas de sucesso da cirurgia.

2 JUSTIFICATIVA

Efeitos adversos relacionados a defeitos de integração tecidual dos materiais empregados para implantes no assoalho pélvico ainda são relativamente frequentes a despeito do relevante avanço dos biomateriais. Considerando-se as propriedades do PRP sobre os processos fisiológicos relacionados com o reparo tecidual, propõe-se o recobrimento de telas de polipropileno monofilamentar com o gel de PRP como forma de possibilitar melhor integração da tela aos tecidos. A análise histológica contribuirá com dados objetivos acerca dos aspectos inflamatórios e do metabolismo do colágeno relacionados ao uso deste novo avanço da bioengenharia de materiais.

3 OBJETIVOS

Estudar o efeito histológico do recobrimento do gel de PRP na integração de telas de polipropileno monofilamentar implantadas em vagina de coelhas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar as características da reação inflamatória aguda induzida por telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas em vagina de coelhas, através da contagem de células inflamatórias.

Estudar a indução da formação de colágeno em telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas em vagina de coelhas através da quantificação de colágeno tipo I e III.

Estudar a proliferação da musculatura lisa induzida por telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas em vagina de coelhas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Estudo experimental animal.

Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais, parecer número: CEUA 12071.2013.21 (anexo 1)

4.2 AMOSTRA

A amostra constou de 30 coelhas adultas da raça White New Zealand. A Universidade Estadual de Maringá – UEM forneceu as coelhas, que permaneceram no biotério da Universidade Estadual de Londrina, alojadas em gaiolas individuais, sob condições ideais de temperatura, umidade e luz, sendo alimentadas com ração e água. Observou-se os animais por 15 dias, a fim de excluir doenças próprias desta espécie.

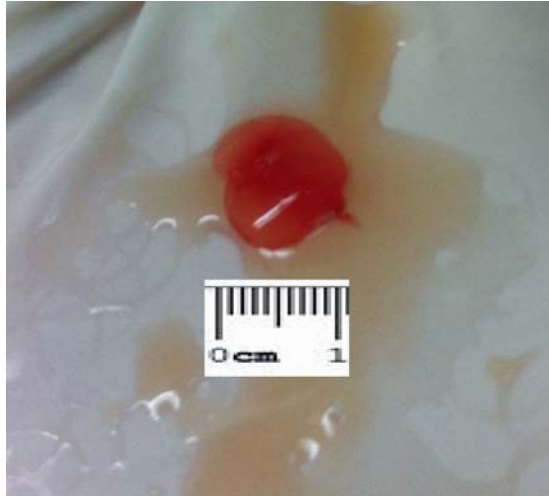
4.3 MATERIAIS

Preparação do gel de PRP

Para a obtenção do PRP, se desenvolveu a princípio, um piloto tendo como base o protocolo descrito por Anitua et al.⁴⁶, citado por Macedo et al.⁴⁷ A coleta ocorreu imediatamente antes do procedimento de implante da tela.

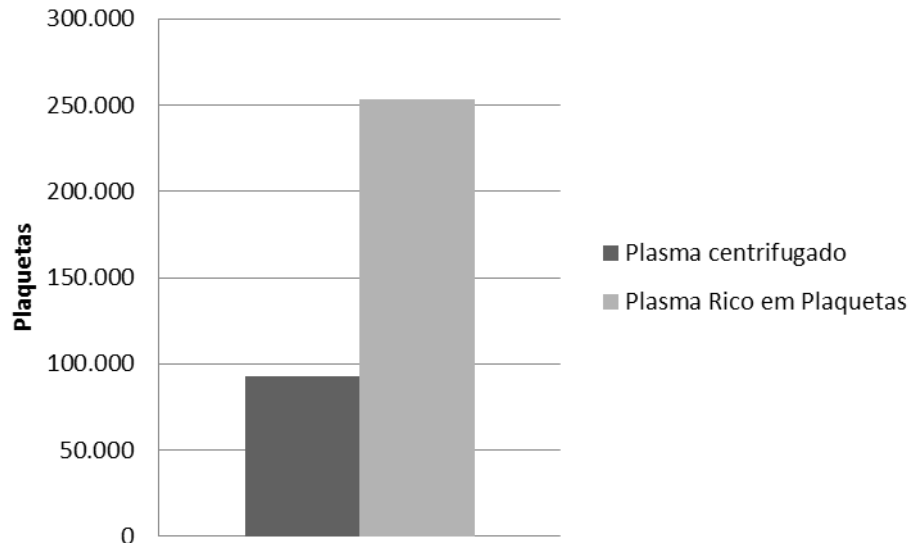
As coelhas foram anestesiadas com Quetamina e Xilasina, e coletou-se 5 mL de sangue, com seringa agulhada descartável transferindo o para tubo de polipropileno estéril de 1.8mL contendo 0.10 mL de citrato de sódio 3.2% como anticoagulante. O material foi homogeneizado e centrifugado a 24°C, com velocidade de 1200RPM, durante 10 minutos. Após a centrifugação foi possível distinguir duas camadas distintas no tubo, as hemácias ao fundo e o plasma sobrenadante. Removeu-se todo o plasma (aproximadamente 1.5mL) com pipeta graduada e o depositou em tudo tipo Ependorf de plástico estéril. Realizou-se nova centrifugação com velocidade de 1500 RPM a 24°C por 10 minutos. Subsequente à centrifugação todo o plasma da parte superior do tudo foi retirado, deixando apenas os 0.5mL finais onde se adicionou 0.5 µL (0.005mL) de Gluconato de Calcio 10%. A solução foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 30 minutos, adquirindo a consistência de gel (figura 1).

Figura 1 – Demonstração do gel de PRP.



Realizou-se a contagem de plaquetas no plasma de 25% das amostras, escolhidas de maneira aleatória antes e após o processo de confecção do gel de PRP para confirmação do aumento do número das plaquetas (Figura 2).

Figura 2 – Média da concentração plaquetária em plasma centrifugado comparado ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP).



4.4 ETAPAS EXPERIMENTAIS

Os procedimentos aconteceram no laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNPR). Tal laboratório é devidamente aparelhado tanto para a execução do procedimento cirúrgico, quanto em termos de manutenção das coelhas em suas devidas gaiolas. Os procedimentos pré-operatórios iniciaram-se com jejum pré-operatório, com restrição alimentar para sólidos por 6 horas

antes da cirurgia, seguido de anestesia com Quetamina 40mg/Kg e Xilasina 3mg/Kg intramuscular e sua manutenção de acordo com a necessidade. As coelhas foram imobilizadas e realizado antissepsia de vagina com solução alcoólica de iodopovidona 10%. Quando adequadamente anestesiadas, inicialmente realizou-se a coleta de sangue e processamento do plasma. O ato cirúrgico consistiu em incisão da mucosa vaginal de aproximadamente 1,5cm e divulsão para implante da tela recoberta de polipropileno monofilamentar do tipo I, medindo 10x10mm (grupo I) ou não (grupo II) pelo gel de PRP .

Após o implante das telas, a mucosa vaginal foi suturada com fio de Nylon 3.0, pontos simples, conforme descrito por Rubod et al.⁴⁸

Em 15 coelhas implantou-se na mucosa vagina uma tela de polipropileno recoberta com gel de PRP (grupo I) e nas outras 15 coelhas do grupo controle (grupo II) a mesma tela de polipropileno sem recobrimento pelo gel de PRP.

Após a recuperação anestésica e estabilização dos animais, estes foram levados ao biotério da instituição, em suas gaiolas, onde permaneceram sob condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação), até o momento da eutanásia. A analgesia pós-operatória, foi de solução de Tramadol 1mg/Kg via oral a cada 6 horas nas primeiras 24hrs. Também administrou-se antibiótico-profilaxia com Penicilina Benzatina 40.000UI/Kg.

4.5 COLETA DOS ESPÉCIMES E PREPARO PARA ESTUDO

Após o período de observação, realizou-se a eutanásia dos animais com dose letal de anestésico, e estes foram divididos em 3 subgrupos:

Subgrupo A: 5 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II eutanasiadas 7 dias após o implante

Subgrupo B: 5 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II eutanasiadas 30 dias após o implante

Subgrupo C: 5 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II eutanasiadas 90 dias após o implante

Na retirada asséptica, em bloco, da vagina, preservou-se as relações anatômicas. As amostras foram depositadas em recipiente contendo formaldeído 10%, no qual permaneceram por 48 horas. Após esse período, foram transferidas para solução de álcool a 70%.

A seguir, as peças foram cortadas em retângulos de 10 mm por 2 mm, inclusas em parafina para posterior confecção das lâminas. Todo material foi previamente identificado quanto ao tempo de eutanásia e a presença ou ausência do PRP. No Laboratório de Patologia Clínica do HURNPR foram confeccionados os blocos de parafina e as lâminas,

sendo três lâminas para cada animal, cada uma contendo 3 cortes de peça cirúrgica, para as colorações Hematoxilina-Eosina (HE), Picro-sirius e Tricômio de Masson.

Para a captura, leitura e análise das lâminas utilizou-se um microscópio da marca OLYMPUS BX50, acoplado a uma câmera digital 3CCD PRO-SERIES. O programa para captura e análise de imagens foi o IMAGE PRO-PLUS V. 4.5.1 - CYBERNETICS. Todo equipamento foi calibrado previamente utilizando uma lâmina micrométrica Olympus em aumento de 400 vezes. Para a técnica de Picro-sirius se utilizou uma lente de luz polarizada.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do software SPSS 20.0. Os resultados foram apresentados em mediana e intervalo interquartil (P75-P25). O processo inicial consistiu em analisar a hipótese de distribuição normal e homogeneidade dos dados empregando o teste de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respectivamente. Devido à violação da normalidade, os dados foram tratados com testes não paramétricos. Os testes *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* seguido do teste de múltiplas comparações proposto por *Bonferroni* foram empregados nas comparações entre os grupos com e sem PRP e nas comparações entre o número de dias pós-cirurgia. Para todas as análises o nível de significância adotado foi de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a mediana e o intervalo interquartilico de todos os critérios avaliados, as células inflamatórias foram contadas por campo, nos demais critérios utilizou-se Micras² como unidade de medida.

Tabela 1 – Mediana e Intervalo interquartilico nos diferentes tempos de eutanásia, dos grupos com e sem PRP para todos os critérios avaliados. Quantificados em contagem de células por campo (células inflamatórias) e micra² (colágeno tipo I, tipo III e M.lisa).

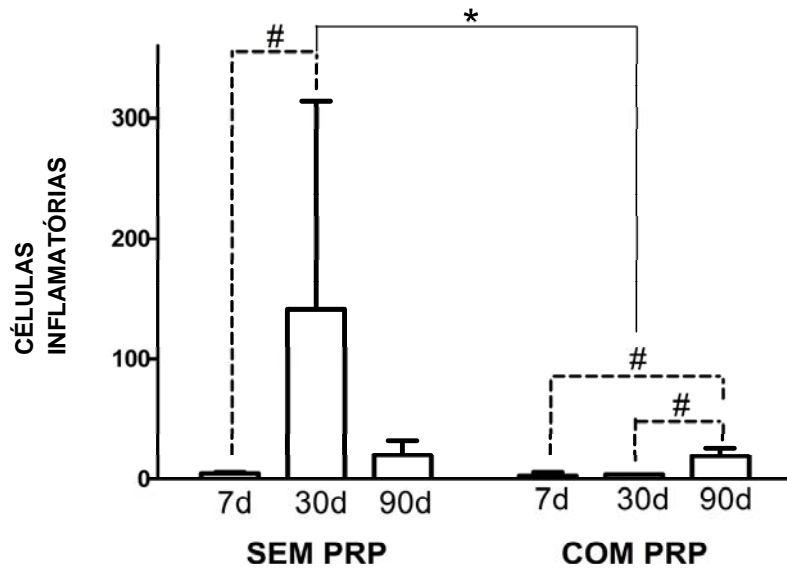
	7 DIAS		30 DIAS		90 DIAS		*	
	SEM PRP	COM PRP	SEM PRP	COM PRP	SEM PRP	COM PRP	SEM PRP	COM PRP
Células inflam.	5,00 (1,00)	3,00 (3,00)	141,00 (173,00) #	4,00 (0,00) #	20,00 (12,00)	19,00 (7,00)		
Colágeno III	2874,01 (2140,42)	3455,19 (1040,62)	3463,84 (1836,11)	3846,56 (1614,01)	2304,46 (1383,01) #	8617,72 (16671,74) #		30<90
Colágeno I	3060,48 (1094,56)	2398,66 (194,05)	2613,64 (4687,18)	2543,25 (495,76)	2247,62 (487,07)	1153,37 (18101,06)		
M. lisa	15522,15 (11707,01)	16829,06 (3085,59)	10216,80 (2361,56)	15085,41 (8758,95)	6198,46 (1562,64)	10734,65 (9259,69)		

$P<0,05$ Sem PRP x Com PRP teste Mann-whitney; * $P<0,05$: Comparação entre os dias; teste Kruskal-Wallis. Mediana e intervalo interquartilico (P75-P25).

5.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A presença de células inflamatórias, como avaliação da resposta inflamatória, está demonstrada na figura 3. Constata-se que a quantidade de células inflamatórias nos primeiros 7 dias não sofreu elevação, já após 30 dias o grupo com PRP apresentou níveis significativamente inferiores aos do grupo sem PRP. Após 90 dias a resposta inflamatória se iguala novamente entre os grupos.

Figura 3a – Demonstração dos resultados obtidos para a contagem do número de células inflamatórias por campo, nos grupos com e sem PRP nos diferentes tempos do estudo.



$P < 0,05$ Sem PRP x Com PRP (teste Mann-whitney) * $P < 0,05$ Comparação entre os dias (teste Kruskal-Walis)

Figura 3b – Aspecto histológico da reação inflamatória com 30 dias de eutanásia no grupo sem PRP (coloração HE, objetiva de 20x).

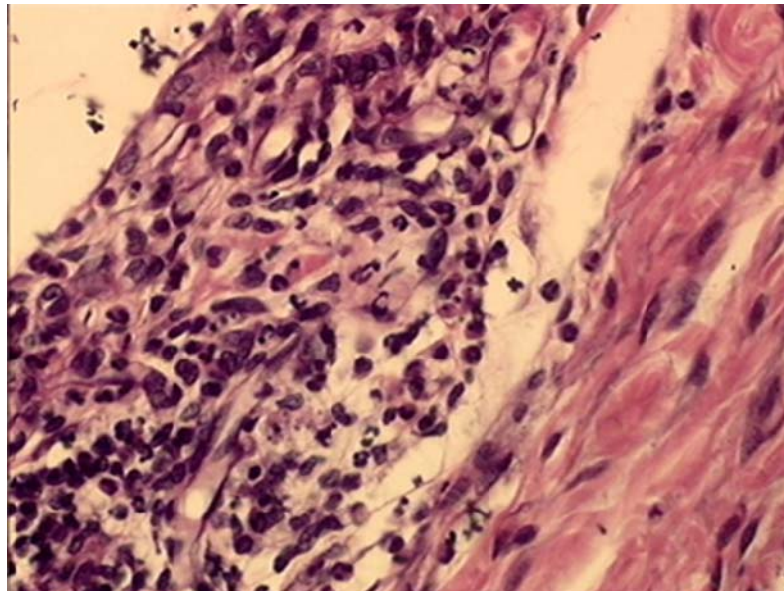
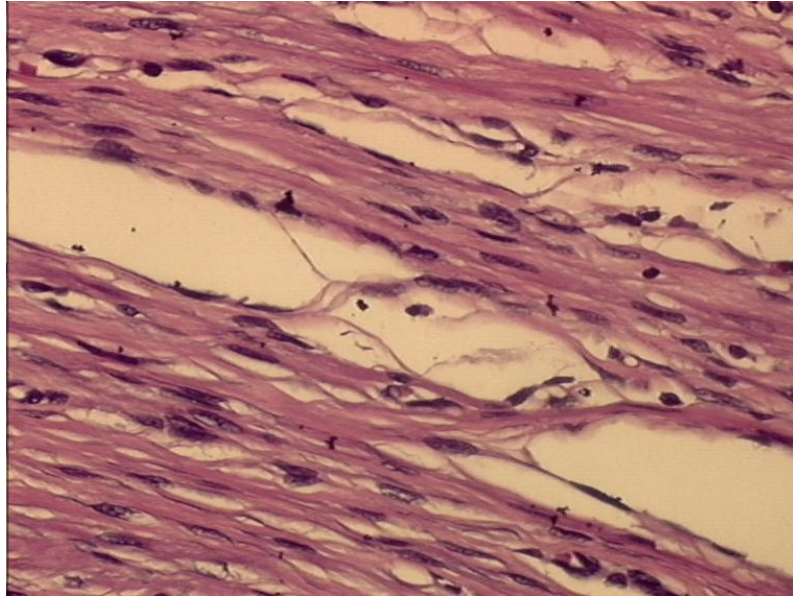


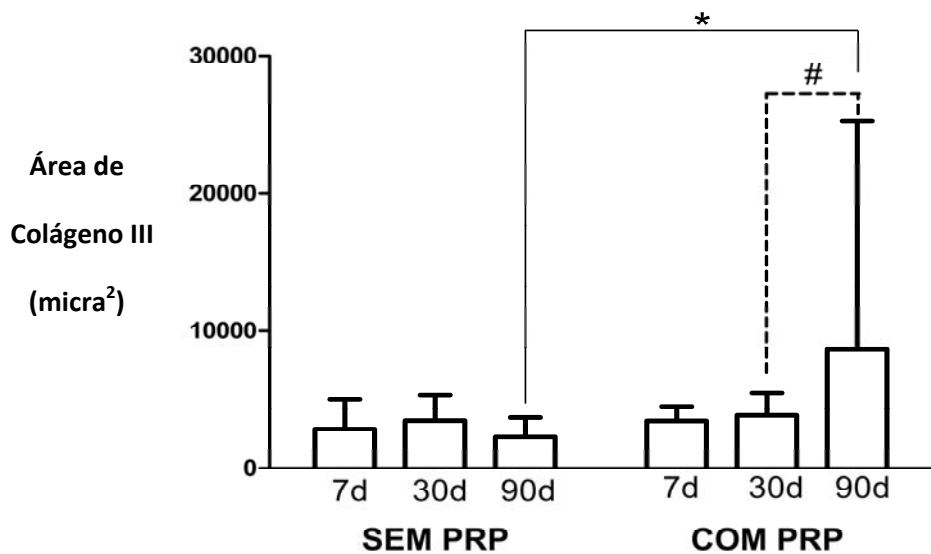
Figura 3c – Aspecto histológico da reação inflamatória com 30 dias de eutanásia no grupo com PRP (coloração HE, objetiva de 20x).



5.2 COLÁGENO TIPO III

A figura 4a demonstra que a concentração de colágeno imaturo (tipo III) não variou entre os tempos de eutanásia no grupo sem PRP. No grupo com PRP este valor apresentou elevação significativa após 90 dias.

Figura 4a – Apresentação da mediana em Micra^2 para o colágeno tipo III nos diferentes tempos de eutanásia para os grupos com e sem PRP.



$P < 0,05$ Sem PRP x Com PRP teste Mann-whitney. Mediana e intervalo interquartilico (P75-P25)

Figura 4b – Aspecto histológico do colágeno tipo III com 90 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x)

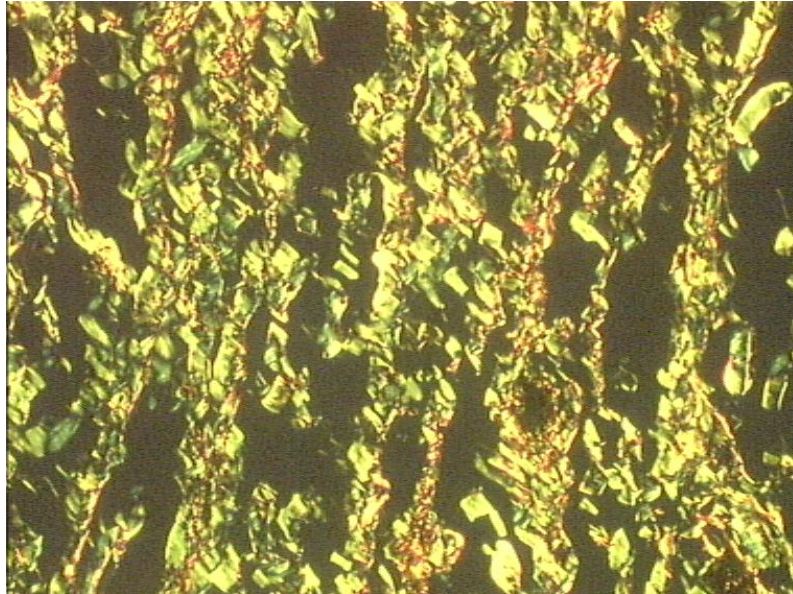
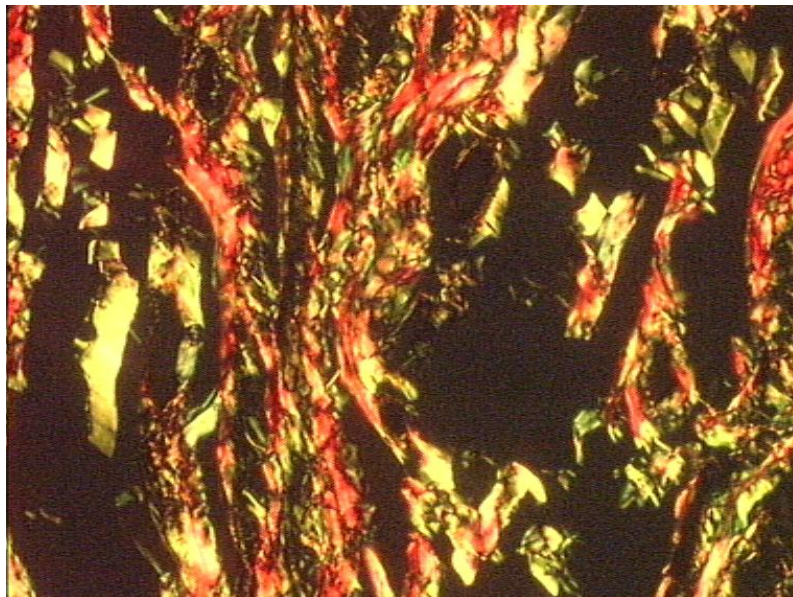


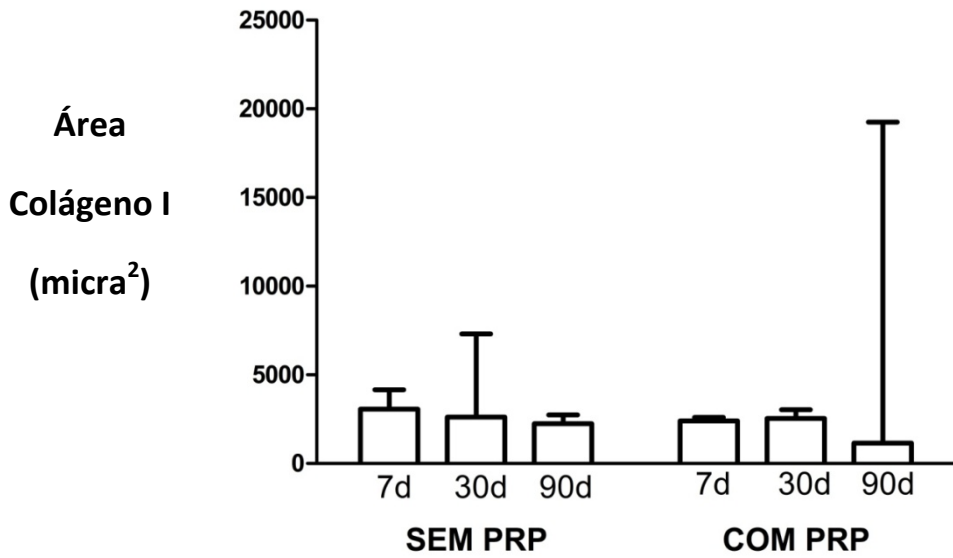
Figura 4c – Aspecto histológico do colágeno tipo III com 90 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Picrosirius, objetiva 20x).



5.3 COLÁGENO TIPO I

Quando se avalia a concentração de colágeno maduro (tipo I), se observa a ausência de diferença entre os valores tanto nos grupos com PR quanto nos sem PRP. Esses valores não se alteram também nos diferentes tempos de eutanásia. (figura. 5a).

Figura 5a – Apresentação da mediana em Micra^2 para o colágeno tipo I nos diferentes tempos de eutanásia para os grupos com e sem PRP.



Mediana e intervalo interquartil (P75-P25).

Figura 5b – Aspecto histológico do colágeno tipo I com 90 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Picosirius, objetiva 20x).

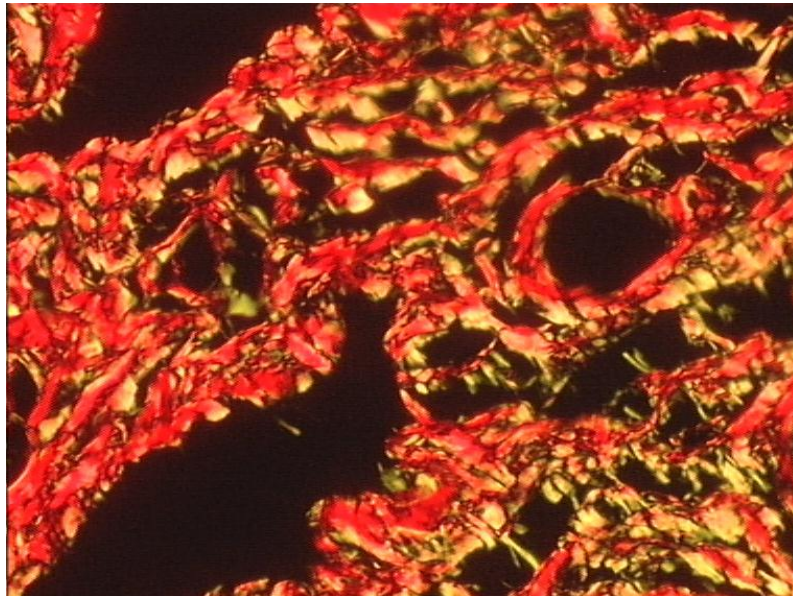
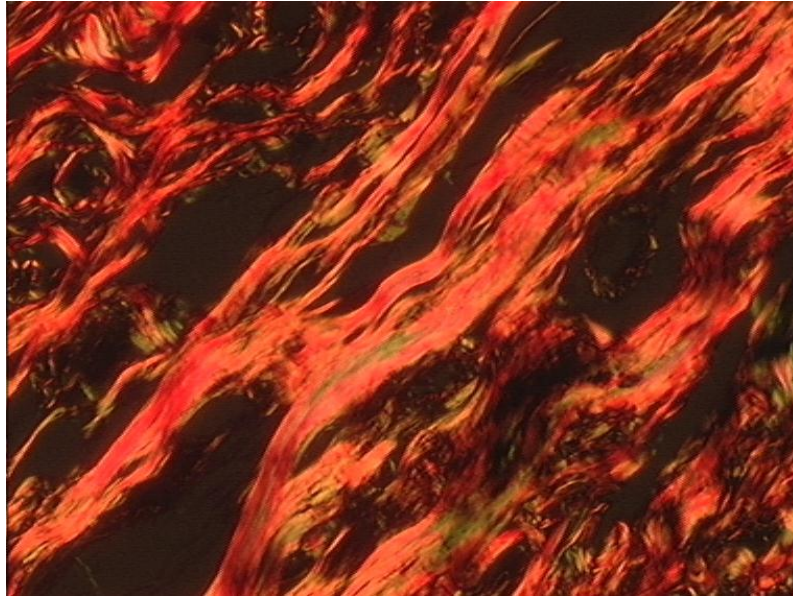


Figura 5c – Aspecto histológico do colágeno tipo I com 90 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Picosirius, objetiva 20x).



5.4 MUSCULATURA LISA

A Figura 6a demonstra um discreto aumento da área de musculatura lisa na técnica de Tricômio de Masson, porém esta elevação não foi suficiente para uma diferença significativa entre todos os grupos e subgrupos.

Figura 6a – Apresentação da mediana em Micra² da área de musculatura lisa, nos diferentes tempos de eutanásia para os grupos com e sem PRP.

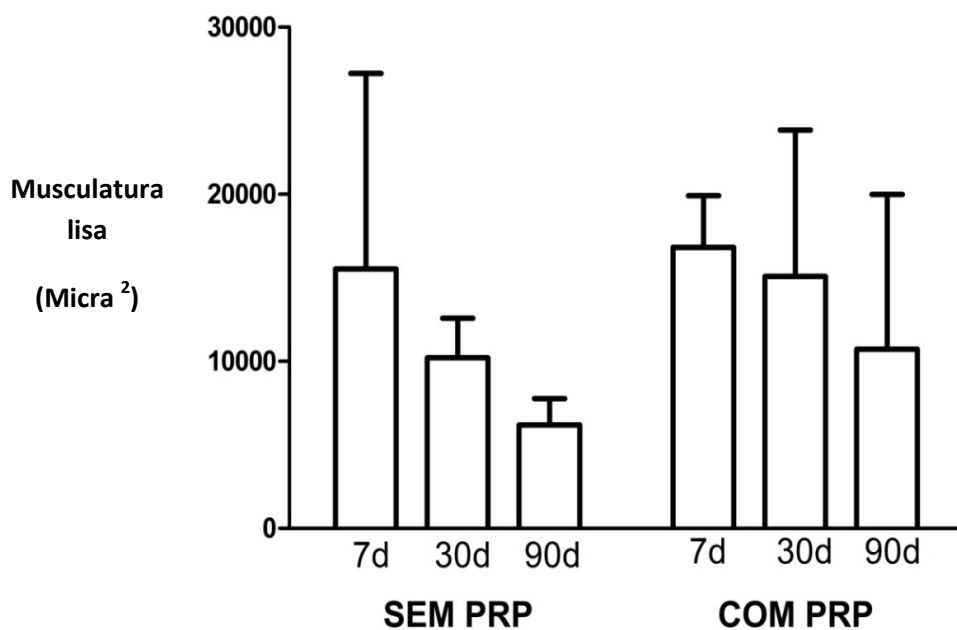


Figura 6b – Aspecto histológico da musculatura lisa com 07 dias de eutanásia no grupo com PRP (Coloração Tricômio de Masson, objetiva 20x).

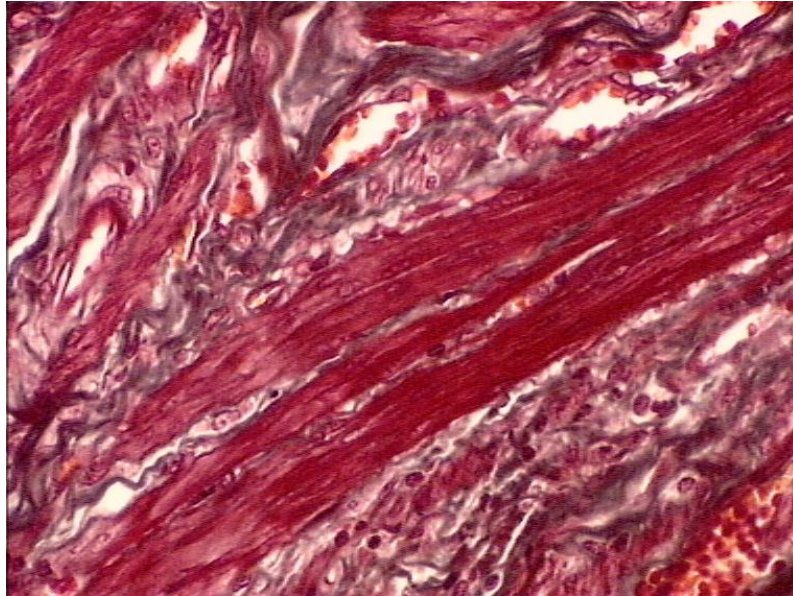
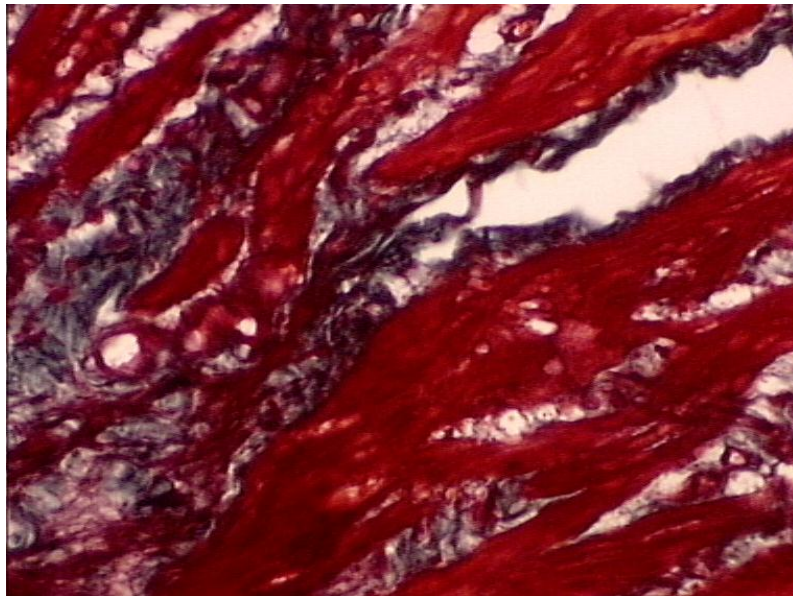


Figura 6c – Aspecto histológico da musculatura lisa com 07 dias de eutanásia no grupo sem PRP (Coloração Tricômio de Masson, objetiva 20x).



6 DISCUSSÃO

Neste estudo se avaliou a resposta inflamatória aguda e o processo de reparo de feridas induzido por um corpo estranho (tela) na presença ou ausência do PRP através da contagem de células inflamatórias e da concentração de colágenos tipo I e III.

Para ocorrer o reparo de qualquer ferida é necessário um processo inflamatório, uma complexa interação celular, molecular e bioquímica. Em conjunto a este fenômeno se inicia a cascata de coagulação onde as plaquetas, com papel fundamental neste processo, secretam grânulos responsáveis pela liberação de fatores de crescimento, responsável pela atração de neutrófilos para o local da agressão⁴⁹.

Conforme observado no presente estudo, a reação inflamatória aguda ocorreu nos grupos com e sem PRP de maneira similar nas coelhas eutanasiadas com 7 dias após a lesão tecidual, sugerindo que o uso do PRP não interferiu no processo inflamatório inicial. Gerullis et al. em um estudo em animais concluiu que o uso do plasma sobre telas de diversos materiais não influenciou a reação inflamatória precoce, mas sim os processos inflamatórios de médio e longo prazo⁵⁰.

Nas coelhas eutanasiadas com 30 dias foi constatada uma diferença significativa de células inflamatórias entre os grupos com e sem PRP. O grupo com PRP apresentou uma importante redução de células inflamatórias, comparado ao grupo sem PRP, sugerindo que o PRP abreviou o tempo de resposta inflamatória aguda, conduzindo o processo de reparo tecidual para fase proliferativa precocemente. Também nas coelhas eutanasiadas após 90 dias pertencentes ao grupo com PRP houve um aumento significativo das fibras de colágeno tipo III, colágeno imaturo, o primeiro a ser produzido na presença de células inflamatórias⁵⁰.

A matriz extracelular é uma formação complexa de ligações entre proteínas e inúmeras outras macromoléculas, sendo o colágeno seu principal componente, com papel fundamental na resistência tecidual e integração com os demais tecidos, sendo essencial no processo cicatricial. Desta maneira a elevação do colágeno durante o processo de reparo de ferida ocorre em condições fisiológicas, independente do uso do PRP⁵¹.

Tecidos saudáveis contêm porcentagens de colágeno tipo I e tipo III de 80% e 20% respectivamente, porém esta proporção no tecido de granulação se altera, chegando a 30 a 40% do colágeno tipo III, mesmo após 1 ano este colágeno ainda é menos organizado do que no tecido são, sua força tensil se reduz, atingindo 80% após 90 dias⁴⁹. O processo de reparo de feridas e reação de corpo estranho já está estabelecida 90 dias após a lesão tecidual e estudos com seguimento destas feridas por até 2 anos não observaram alterações significativas na lesão⁵².

O colágeno tipo III é produzido em maior quantidade na fase inicial da formação da matriz extracelular e é gradualmente substituído pelo colágeno tipo I, responsável pela força tensil do tecido⁵¹. O colágeno tipo III elevado com 90 dias de eutanásia sugere que a ferida mesmo macroscopicamente cicatrizada ainda encontra-se em processo de remodelação⁵¹. Young et al. (2011) menciona que o tecido cicatricial pode levar até 2 anos para ter um epitélio mais próximo possível ao tecido sã⁵³.

Quando estudadas as fibras de colágeno maduras, do tipo I, colágeno responsável pela organização celular e incorporação da tela (corpo estranho) não se observou significância estatística entre os grupos com e sem PRP e nos diferentes tempos de eutanásia.

Souza et al. (2014) estudou o uso do PRP na cicatrização de feridas em equinos, observando um aumento da expressão gênica dos colágenos tipo I e III, entretanto este aumento não resultou em uma cicatrização precoce⁵¹.

Várias limitações devem ser consideradas a respeito deste estudo. Como em qualquer estudo em animais, a extrapolação dos resultados para a prática clínica deve ser cuidadosa.

A coelha é considerada um bom modelo animal para implantes vaginais, ainda que não seja primata ou de grande porte. A vagina de coelhas tem duas porções, a interna é mais similar à histologia de um intestino delgado, contudo a porção mais larga da parede anterior da porção vaginal externa a fazem um bom modelo para estudos de histocompatibilidade⁵⁴.

A resposta inflamatória e de reparo vai muito além do tipo de tela a ser implantada, cada tecido e local de implante responde de maneira distinta a agressão sofrida⁵⁵, implantes abdominais, por exemplo, ocorrem em ambiente estéril, com o processo de biomecânica completamente diferente dos implantes em vagina, este sendo um ambiente potencialmente contaminado. Culligan et al. durante histerectomias vaginais encontrou taxas de 52% e 25% de pacientes com mais de 5 mil colônias de bactérias, 30 e 150 minutos após preparo cirúrgico⁵⁶.

O processo de cicatrização da parede abdominal cursa de maneira similar ao vaginal, com um processo inflamatório agudo, evoluindo para crônico, proliferação de fibroblastos, neovascularização e progressiva reepitelização com depósito de colágeno. Porém na lesão em parede abdominal após 4 a 7 dias do trauma ocorre o surgimento de uma crosta de fibrina, que assume o papel de curativo oclusivo desta lesão, processo que não ocorre nas lesões em mucosa vaginal⁵⁷ que apesar de não exposta ao ambiente externo, o que teoricamente a faria menos exposta à infecções, é considerada um ambiente contaminado pela presença de uma flora própria.

Assim, a utilização de coelhas e o implante na mucosa vaginal são pontos importantes em nosso estudo. Entretanto também já conhecido que uma mucosa vaginal atrófica consequente a hipoestrogenia é muito menos receptiva ao implante de telas, elevando as taxas de complicações. Da mesma forma a reposição pós-operatória de estrógeno por 8 semanas em coelhas aumentou a deposição de colágeno no sítio de implante de telas vaginais⁵⁸.

Outra questão a ser observada é o intervalo entre as eutanásias, a reação inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, sendo os neutrófilos as primeiras células a chegarem a ferida com concentração máxima em 24 hrs, gradativamente estes neutrófilos são substituídos por macrófagos e posteriormente por fibroblastos⁴⁹, com a eutanásia após 7 dias este fenômeno não foi observado, talvez por isto não observamos alterações significativas neste tempo de eutanásia nos grupos com e sem PRP. Todavia a persistência de células inflamatórias em valores elevados aos 30 dias, no grupo sem PRP nos sugere que o processo inflamatório não cursou de maneira fisiológica.

Devemos mencionar também a falta de padrão para a obtenção do PRP e para a definição de PRP na literatura. Marx et al.³³ em um *White Paper* afirmaram que um protocolo de dupla centrifugação é essencial para que se possa, verdadeiramente, concentrar as plaquetas durante o preparo do PRP. Por outro lado, Anitua⁴⁶ preconiza um protocolo de única centrifugação, embora a concentração de plaquetas obtida com esse procedimento não tenha sido demonstrada. Grandes variações nas concentrações de plaquetas são encontradas nos protocolos de única centrifugação³⁵. Nossas coletas de controle do número de plaquetas apresentaram índices de elevação das plaquetas em torno de 300%, valores que podem ser considerados de elevação moderada, porém dentro das margens consideradas pelas definições existentes para PRP³³⁻⁴³.

Alguns estudos procuraram analisar a efetividade do PRP no sentido de potencializar o reparo, relacionando os resultados obtidos com as várias concentrações de plaquetas empregadas. Resultados têm mostrado que a efetividade do PRP pode seguir padrão concentração-dependente, ou seja, concentrações muito altas teriam efeito prejudicial³⁵.

Os resultados deste estudo sugerem um processo de reparo de feridas mais efetivo, já que o PRP tornou a resposta inflamatória até os 30 dias menos intensa, estimulando precocemente o processo de reparo e cicatrização. Ainda são necessários estudos com o uso do PRP em implantes de telas em vaginas de coelhas ooforectomizadas, idosas, ou mesmo que pariram, e comparar esses resultados com os deste corrente estudo, antes de se justificar o uso na prática clínica.

7 CONCLUSÃO

Não houve alteração na resposta inflamatória aguda (7 dias) com o uso do PRP.

A contagem de células inflamatórias que aumentou significativamente no grupo sem o PRP após 30 dias, não se elevou no grupo com PRP, indicando uma redução da resposta inflamatória.

Houve aumento significativo de colágeno tipo III após 90 dias do estudo, aumento este que não se manteve no colágeno tipo I.

Não houve alteração na proliferação de musculatura lisa nos grupos com e sem PRP nos diferentes tempos de eutanásia.

REFERÊNCIAS

1. Shawn AM, Lewis W. Incontinência, Prolapsos e Distúrbios do Assoalho Pélvico. In: Novak Tratado de Ginecologia. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 600-661.
2. Goldman L, Ausiello D. Incontinência urinária. In: Cecil Textbook of Medicine. 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.127-28.
3. DeCherney AH, Nathan L. Relaxamento das estruturas de sustentação da pelve. In: Current obstetric & gynecologic diagnosis and treatment. 9. ed. McGraw Hill Companies; 2003. p. 661-79.
4. Ogah J, Cody JD, Rogerson L. Minimally invasive synthetic suburethral sling operations for stress urinary incontinence in women. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010 Mar;115(3):654-6.
5. Mallipeddi PK, Steele AC, Kohli N, Karram MM. Anatomic and functional outcome of vaginal paravaginal repair in the correction of anterior vaginal wall prolapse. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 2001;12(2):83-8.
6. Maher CF, Murray CJ, Carey MP, Dwyer PL, Ugoni AM. Iliococcygeus or sacrospinous fixation for vaginal vault prolapse. Am J Obstet Gynecol 2001 Jul;98(1):40-4
7. Azevedo MJ, Azevedo H, Alves C, Vivas J, Cruz BM. Effects of pelvic floor rehabilitation in urinary incontinence. Rev. SPMFR. 2012(20); 21:22-28.
8. Fantl JA, Wyman JF, Anderson RL, Matt DW, Bump RC. Postmenopausal Urinary Incontinence: Comparison Between non-estrogen-supplemented and estrogen-supplemented women. Obstet. Gynecol. 1988 Jun;71(6):826-828.
9. Norton PA, Norman RZ, Yalcin I, Bump RC. Duloxetine versus placebo in the treatment of stress urinary. Am J Obstet Gynecol. 2002 Jul;187(1):40-8.
10. Colombo M, Vitobello D, Proietti F, Milani R. Randomised comparison of Burch colposuspension versus anterior colporrhaphy in women with stress urinary incontinence and anterior vaginal wall prolapse. BJOG 2000 Apr;107(4):544-51.
11. Ho YH, Ang MG, Nyam D, Tan M, Seow-Choen F. Transanal approach to rectocele repair may compromise anal sphincter pressures. Dis Colon Rectum 1998 Mar; 41(3): 354-58.
12. Kahn MA, Stanton SL. Posterior colporrhaphy: its effects on bowel and sexual function. Br J Obstet Gynaecol 1997 Jan; 104(1): 82-6.
13. Petros PE, Ulmsten UI. An integral theory and its method for the diagnosis and management of female urinary incontinence. Scand J Urol Nephrol Suppl. 1993; 153:1-93.
14. Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varhos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. Int Urogynecol J. 1996;7(2):81-86.
15. Debodinance P, Delporte P, Engrand BJ, Boulogne M. Tension-free Vaginal Tape (TVT) in the treatment of urinary stress incontinence: 3 years experience involving 256

- operations. *European J of Obst. & Gynecol. and Reprod. Biology.* 2002 Oct; 105(1): 49-58.
16. Riccetto C, Miyaoka R, de Fraga R, Barbosa R, Dambros M, Teixeira A, et al. Impact of the structure of polypropylene meshes in local tissue reaction: in vivo stereological study. *Int Urogynecol J* 2008 Aug;19(8):1117–23.
 17. Haylen BT, Freeman RM, Swift SE, Cosson M, Davila GW, Deprest J, et al. An International Urogynecological Association (IUGA) / International Continence Society (ICS) joint terminology and Classification of the complications related directly to the insertion of prostheses (meshes, implants, tapes) & grafts in female pelvic floor surgery. *Int Urogynecol J.* 2011;22(1):3-15.
 18. Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral sling materials. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005; 6: 56-9.
 19. Amid PK, Lichtenstein IL, Shulman AG, Hakakha M. Biomaterials for “tension-free” hernioplasties and principles of their applications. *Minerva Chir* 1995; 50:821-6.
 20. Schreiner L, Carvalho EX, Santos TG. Sling Suburetral: Vantagens e desvantagens dos materiais utilizados. *R Femina* 2011;36(7);407-412.
 21. Cervigni M, Natale F. The use of synthetics in the treatment of pelvic organ prolapse. *Curr Opin Urol* 2001;11:829-35.
 22. Baessler K, Hewson A, Tunn R, Quatawneh A, Maher C. Intravaginal sling distress. *Neurol Urodyn* 2003;22:408.
 23. Glavind K, Sander P. Erosion, defective healing and extrusion after tension-free urethropexy for the treatment of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2004 May; 15(3):179-83.
 24. Siegel AL, Kim M, Goldstein M, Levey S, Ilbeigi P. High incidence of vaginal mesh extrusion using the intravaginal slingplasty sling. *J Urol* 2005 Oct;174(4 Pt 1);1308-11.
 25. Cosson M. [Risk of infection and prostheses: time out or a red flag?. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004 Nov;33(7):559-560.
 26. Versi E, Harvey MA, Cardozo L, Brincat M, Studd JW. Urogenital prolapse and atrophy at menopause: a prevalence study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001;12(2):107-110.
 27. Yildirim A, Basok EK, Gulpinar T, Gurbuz C, Zemheri E, Tokuc R. Tissue reactions of 5 sling materials and tissue material detachment strength of 4 synthetic mesh materials in a rabbit model. *J Urol* 2005;174:2037-40.
 28. Bazi TM, Hamade RF, Hussein IAH, Nader KA, Jurjus A. Polypropylene midurethral tapes do not have similar biologic and biomechanical performance in the rat. *Eur Urol* 2006; 51(5):1364-1375.
 29. Barski D, Gerullis H, Georgas E, Bär A, Lammers B, Ramon A, et al. Coating of mesh grafts for prolapse and urinary incontinence repair with autologous plasma: exploration stage of a surgical innovation. *J Biomed Research Int.* 2014 Aug; 2014:1-7

30. Prudente A, Oliveira MG, Riccetto CL. Can Nitric Oxide Improve Tissue Integration of Poltpropylene Mesh Implanted in Subcutaneous Rats? *The J. of Urology*. 2012; 187: e10.
31. Prudente A, Riccetto CL, Simões MM, Pires BM, de Oliveira MG. Impregnation of Implantable Polipropylene Mesh with S-nitrosoglutathione – loaded Poly (vinyl alcohol). *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 108:178-84.
32. Gerullis H, Georgas E, Eimer C, Arndt C, Barski D, Lammers B, et al. Coating with Autologous Plasma Improves Biocompatibility of Mesh Grafts In Vitro: Development Stage of a Surgical Innovation. *Biomed Research International*. 2013; 2013:1-6.
33. Marx RE. Platelet rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?. *Implant Dent*. 2001;10(4):225-8.
34. Andrew JG, Hoyland JA, Fremont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*. 1995;16:455-60.
35. Oliveira-Filho MA, Almeida LE, Pereira JA, Nassif PF, Czczko NG, Kume MH, et al. Plasma rico em plaquetas de coelhos: introdução a um modelo animal experimental. *ABCD, arq. bras. cir. dig*. 2008;21(4):175-9.
36. Klein CP, Wagner SC, Silva JB. Obtenção de plasma rico em plaquetas: avaliação do efeito da centrifugação sobre a concentração de plaquetas através da comparação entre protocolos. *R. bras. Bioci*. 2011; 9:509-513.
37. Vanat N, Medeiros TNS, Balarin MRS, Pereira PM, Biasi F. Modificações de técnicas de preparo do plasma rico em plaquetas em cães. *Semina: Ciências Agrárias* 2012;33(1):313-322.
38. Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Romero Franco TR. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in skin grafts in rabbits. *Rev. Bras. Cir. Plást*. 2010; 25: 4-10.
39. Taylor DW, Petrera M, Hendry MB, Theodoropoulos JS. A Systematic review of the use of Platelet-Rich Plasma in sports medicine as a new treatment for tendon and ligament injuries. *Clin J Sport Med* 2011 Jul;21(4):1-9.
40. Spyridakis M, Christodoulidis G, Chatzitheofilou C, Symeonidis D, Tepetes K. The Role of the Platelet-Rich Plasma in Accelerating the Wound-Healing Process and Recovery in Patients Being Operated for Pilonidal Sinus Disease: Preliminary Results. *World J Surg* 2009;33:1764-1769.
41. Rappl LM. Effect of platelet rich plasma gel in a physiologically relevant platelet concentration on wounds in persons with spinal cord injury. *Int Wound J* 2011 Apr; 8(2):187-195.
42. Everts PA, Overdevest EP, Jakimowicz JJ, Oosterbos CJ, Schonberger JC, Knape TT, et al. The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. *Surg Endosc* 2007 Nov;21(11):2063-2068.
43. Batista MA, Leivas TP, Rodrigues CJ, Arenas GCF, Belitardo DR, Guarniero R. Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia. *Clinics* 2011;66(10):1787-1792.

44. Zieren J, Zieren Hu, Jacobi CA, Wenger FA, Müller JM. Prospective randomized study comparing laparoscopic and open tension-free inguinal hernia repair with Shouldice's operation. *Am J Surg* 1998 Apr;175(4):330-333.
45. Einarsson JI, Jonsdottir K, Mandle R. Use of Autologous Platelet Gel in Female Pelvic Organ Prolapse Surgery: A Feasibility Study. *J Minim Invasive Gynecol*. 2009 Mar-Apr;16(2):204-7.
46. Anitua E, Andia I, Sanches M, Azofra J, Zaldueño MM, Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J of Orthop. Research*. 2005 Mar; 23(2):281-286.
47. Macedo AP, Ferreira CF, Souza DC, et al. Protocolo de Obtenção e Aplicações Clínicas do PRP. In: Pontual MAB, Magini RS. *Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Fatores de Crescimento - das Pesquisas Científicas à Clínica Odontológica*. São Paulo: Santos; 2004:189-230.
48. Rubod C, Boukerrou M, Brieu M, Dubois P, Cosson M. Biomechanical properties of vaginal tissue. I. New experimental protocol. *J Urol*. 2007; 178:320–325, discussion 325.
49. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8.
50. Gerullis H, Georgas E, Boró M, Klosterhalfen B, Eimer C, Arndt C, et al. Inflammatory Reaction as Determinant of Foreign Body Reaction Is an Early and Susceptible Event after Mesh Implantation. *BioMed Research International*; 2014 Mar; 2014:1-6.
51. Souza MV, Pinto JO, Costa MBM, Alves MS, Silva MO, Martinho KO, et al. Expressão gênica do colágeno em feridas cutâneas de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. *Pesq. Vet. Bras*. 2014 Mar; 34(3):233-240.
52. Gerullis H, Klosterhalfen B, Borós M, Lammers B, Eimer C, Georgas E, Otto T. IDEAL in Meshes for Prolapse, Urinary Incontinence, and Hernia Repair. *Surg Innov* 2013 20:502-508.
53. Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery*. 2011; 29:475-479.
54. Couri BM, Lenis AT, Borazjani A, Paraiso MF, Damaser MS. Animal models of female pelvic organ prolapse: lessons learned. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 2012; 7:249-260.
55. Patel H, Ostergard DR, Sternschuss G. Polypropylene mesh and the host response. *Int Urogynecol J*. 2012 Jun;23(6):669-679.
56. Culligan P, Heit M, Blackwell L, Murphy M, Graham CA, Snyder J. Bacterial colony counts during vaginal surgery. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2003;11:161-5.
57. Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros SM, Miller JJ, Alshahrour A, et al. Histologic characterization of vaginal vs. abdominal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair and Regen* 2007; 15(1):80–86.
58. Higgins EW, Rao A, Baumann SS, James RL, Kuehl TJ, Muir TW, et al. Effect of estrogen replacement on the histologic response polypropylene mesh implanted in the rabbit vagina model. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 201(5): 505.e1-9.

59. Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Goldberg RP, Sand PK. Vaginal incisional wound healing in a rabbit menopause model: A histologic analysis. *Int Urogynecol J* 2012; 23(12):1763–1769.

ANEXOS

ANEXO 1

Aprovação pelo Comitê de Ética no uso de Animais - CEUA/UEL

**Universidade
Estadual de Londrina****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****OF. CIRC. CEUA N ° 118/2013****Londrina, 01 de Julho de 2013.****Prezado Pesquisador,**

A CEUA/UEL reunida em 25 de Junho de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado - **“Análise imunohistoquímica do efeito do uso de plasma rico em plaquetas (PRP) na integração de telas de polipropileno”**, processo CEUA n° 12071.2013.21, pesquisa do Centro de Ciências da Saúde de sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 30 coelhos fêmeas, da linhagem White New Zealand, com idade de 6 meses e peso de 2 kg provenientes de Biotério. O projeto tem como objetivo estudar o efeito da impregnação com gel contendo plasma rico em plaquetas na integração de telas de polipropileno monofilamentar implantadas no tecido subcutâneo de coelhos. Para isto os coelhos serão submetidos a procedimentos pré-operatório compatíveis ao procedimento cirúrgico ao qual serão submetidos, nos quais serão anestesiados com Hypnol administrado através da veia caudal. Após anestesia os coelhos serão submetidos a duas incisões transversais na região inferior do abdômen sendo uma a direita e outra a esquerda. A avaliação anatomopatológica será realizada e em seguida os animais serão eutanasiados e divididos da seguinte forma: G1) 10 coelhos serão eutanasiados no 7° dia após a implantação das telas. G2) 10 coelhos serão eutanasiados no 30° dia após o implante das telas. G3) 10 coelhos serão eutanasiados 90 dias após o implante das telas. A retirada da parede abdominal será de forma asséptica, e de maneira a preservar as relações anatômicas entre epiderme, derme e tecido subcutâneo, procurando evitar sinais de eritema, necrose e tumefação. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 4 meses após aprovação.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Verrri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior
Coordenador da CEUA/UEL