



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

OSCAR RUBINI AVILA

**RESPOSTA HISTOLÓGICA AO USO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) ADICIONADO A TELAS DE
POLIPROPILENO IMPLANTADAS EM COELHAS**

Londrina
2015

OSCAR RUBINI AVILA

**RESPOSTA HISTOLÓGICA AO USO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) ADICIONADO A TELAS DE
POLIPROPILENO IMPLANTADAS EM 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)

A958r Avila, Oscar Rubini.
Resposta histológica ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP) sobre telas de polipropileno implantadas em coelhas / Oscar Rubini Avila. - Londrina, 2015.
42 f.: il.

Orientador: Sílvio 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. Abdome x Cirurgia – Teses. 2. Colágeno - Teses. 3. Materiais biomédicos - Teses. 4. Plaquetas (sangue) - Teses. 5. Inflamação – Teses. I. Almeida, Sílvio Henrique Maia de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 616.33/.34-089

OSCAR RUBINI AVILA

**RESPOSTA HISTOLÓGICA AO USO DE PLASMA RICO EM
PLAQUETAS (PRP) ADICIONADO A TELAS DE POLIPROPILENO
IMPLANTADAS EM 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. Cassio Luis Zanettini Ricetto
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marco Aurélio Freitas Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de julho de 2015.

“O PODER NASCE DO QUERER. SEMPRE QUE O HOMEM APLICAR A VEEMÊNCIA E PERSEVERANTE ENERGIA DE SUA ALMA A UM FIM, VENCERÁ OS OBSTÁCULOS, E, SE NÃO ATINGIR O ALVO FARÁ, PELO MENOS, COISAS ADMIRÁVEIS”

JOSÉ DE ALENCAR

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi concebido com a colaboração direta ou indireta de muitas pessoas, sem as quais jamais poderia ser realizado.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus que em sua infinita bondade, às vezes incompreendida, me iluminou com paciência, sabedoria e superação. Ele me tranquilizou nos momentos de angústia e aflição, conduzindo minha vida transformada, principalmente no primeiro ano desta jornada, me apoiando nos momentos mais penosos e impedindo que eu me desviasse dos meus objetivos, extraindo de mim uma força por mim desconhecida.

Aos meus pais. Fonte inspiradora de trabalho, responsabilidade, amor, dedicação e perseverança. Sem esta base que vocês me deram nada seria ou faria.

A minha esposa que me incentivou desde o início desta caminhada. Esteve ao meu lado, sempre me apoiando e dando o suporte que sem dúvidas tornou a jornada mais leve e suave. Entendeu os vários dias ausentes na semana e aceitou a mudança no ritmo de vida. Por tudo isso, obrigado.

As minhas filhas, presentes de Deus, força motriz dos meus atos e decisões. Obrigado por entenderem os momentos de ausência, as trocas nos dias de visitas e as substituições dos momentos de diversão por um simples almoço. Sem dúvidas eu não seria o mesmo sem vocês.

A todos os meus amigos de profissão. Sempre me incentivando a manter o ritmo e continuar a missão. Neste momento quero resaltar a participação dos colegas Paulo Cesar Caviqioli e Arnaldo Schaefer que fizeram a cobertura da grade de plantões e ambulatórios em minha ausência e um agradecimento especial para o colega Marcelo Bastos Del Hoyo sem o qual eu jamais teria conseguido o contato com o programa de pós-graduação da UEL, companheiro de muitos anos e irmão que Deus colocou em minha vida.

Aos colaboradores deste projeto, em especial aos colegas do biotério da UEL, a secretaria de pós-graduação em ciências da saúde, os amigos do laboratório de anatomia e patologia da universidade estadual de Maringá, aos acadêmicos do curso de medicina da UEL e a colega Natalia Parizi inseridos no projeto de pesquisa, ao meu estatístico Eduardo Cardoso da UNESP de Presidente Prudente. Todos vocês tiveram uma participação muito importante, e suas ausências neste projeto tornaria tudo muito mais difícil, talvez impossível.

Queria prestar um agradecimento especial ao professor Doutor Silvio H. M. Almeida, meu mestre. Apostou em minha proposta mesmo sabendo que estava começando um trabalho em um momento da vida no qual a maioria dos colegas já o fizeram e, ainda como agravante, os 180 quilômetros que separavam minha residência e a UEL. Obrigado pela confiança depositada em mim.

Agradeço aos membros da banca aqui presentes, pela atenção e contribuição com seus conhecimentos para enriquecer esse trabalho.

AVILA, Oscar R. **Resposta histológica ao uso de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) sobre telas de polipropileno implantadas em coelhas**. 2015. 42 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, 2015.

Resumo

Introdução: O plasma rico em plaquetas (PRP) faz parte de um conjunto de biotecnologias desenvolvidas para o emprego na bioengenharia tecidual, fornecendo uma série de fatores de crescimento que favorecem o reparo de diferentes tecidos. As telas de polipropileno são utilizadas na correção de defeitos da parede abdominal, do assoalho pélvico e na incontinência urinária de esforço (IUE), entretanto apresenta taxas significativas de complicações, provavelmente decorrente de uma resposta inflamatória inadequada. **Objetivo:** Investigar as alterações provocadas pelo PRP quando associado ao implante de telas de polipropileno em abdome de coelhas, na produção de colágeno tipo I e tipo III, no infiltrado inflamatório e na produção do tecido muscular. **Métodos:** Realizaram-se implantes abdominais de telas de polipropileno com e sem PRP em coelhas adultas (n=30) e eutanásia com 7, 30 e 90 dias. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada animal e analisadas em cinco diferentes campos de cada lâmina por cada uma das técnicas de coloração. O infiltrado inflamatório foi avaliado pela quantificação de células inflamatórias usando coloração por hematoxilina-eosina, a deposição do colágeno pela técnica de Picro-Sirius e o tricômio de Masson foi usado para avaliar estruturas musculares. Analisou-se os resultados com os testes de Wilcoxon, Kruskal-Wallis, Junckheere e Friedmann. **Resultados:** Houve diferença significativa do aumento do número de células inflamatórias no grupo com PRP se comparado com o grupo sem PRP ($p=0,01$) aos 90 dias. Ocorreram produções aumentadas de colágeno tipo I, tipo III e total com o uso do PRP, aos 7 dias. Não houve alteração na análise de estruturas musculares. **Conclusão:** O revestimento de tela de polipropileno com PRP associou-se com aumento de leucócitos no local do implante, e com tendência de incremento no decorrer do processo de reparação tecidual. O revestimento de tela de polipropileno com PRP associou-se com aumento da concentração de colágeno tipo I e colágeno tipo III, sendo a concentração de colágeno total aumentada após 7 dias do implante. O revestimento de tela de polipropileno com PRP não se associou com alteração da área do tecido muscular adjacente ao implante.

Palavras-chave: Colágeno. Inflamação. Coelho. Plaquetas. Tela. Plasma rico em plaquetas. PRP

Avila, Oscar R. **Effect of Platelet-Rich Plasma in polypropylene mesh-induced histological alterations in rabbits.** 2015. 42 p. Pol . MSc thesis (post-graduation in Health Sciences) – State University of Londrina. Londrina, 2015.

ABSTRACT

Introduction: The platelet-rich plasma is part of a set of biotechnologies developed for employment in tissue engineering, providing a number of growth factors that promote repair of different tissues. The polypropylene meshes are applied in correction of abdominal wall defects, pelvic floor and urinary incontinence (SUI), however, they induce many significant complications, possibly as a result of an inappropriate inflammatory response. **Objective:** To investigate the changes caused by PRP when associated with the implantation of polypropylene meshes in the abdominal female rabbits, in production of collagen type I and III, in the inflammatory infiltrate and in production of muscle tissue. **Methods:** We performed abdominal implant meshes with and without PRP in adult rabbits (n = 30) and euthanasia at 7, 30 and 90 days. Two plates were prepared for each animal and analyzed in five different fields of each slide by each staining techniques. The inflammatory infiltrate was evaluated by quantification of inflammatory cells using hematoxylin - eosin, deposition of collagen by Sirius red method and trichrome Masson was used to evaluate muscular structures. The results were analyzed applying the Wilcoxon test, Kruskal- Wallis, Junckheere and Friedmann. **Results:** There was a significant difference in the increase in the number of inflammatory cells between the groups with and without PRP (p = 0.01) at 90 days. There were increased production of collagen type I and type III and complete with the use of PRP, at 7 days. There was no change in the analysis of muscle structures. **Conclusion:** The polypropylene mesh coating with PRP was associated with increased leukocyte at the implant area, and an increase trend during the process of tissue repair. The polypropylene mesh coated with PRP was associated with increased concentration of collagen type I and collagen type III, the concentration of total collagen increased after 7 days of implantation. The polypropylene mesh coated with PRP was not associated with changes in the muscle tissue adjacent to the implant area.

Key words: Collagen. Inflammatory. Rabbit. Platelet. Mesh. Platelet-rich plasma. PRP

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Demonstração da média e desvio padrão do número de células inflamatórias obtido para as coelhas sacrificadas em 7, 30 e 90 para os grupos com e sem PRP	22
Tabela 2 -	Demonstração das médias e desvio padrão da área muscular (pixels/ μm^2) em coelhas sacrificadas em 7, 30 e 90 dias para os grupos com e sem PRP, pela técnica de tricômio de Masson	25
Tabela 3 -	Demonstração das médias e desvio padrão do colágeno total (pixels/ μm^2) em coelhas sacrificadas com 7, 30 e 90 dias com e sem PRP	28
Tabela 4 -	Demonstração das médias e desvio padrão das áreas (pixels/ μm^2) dos diversos tipos de colágeno, em relação à presença de PRP para os diferentes tempos de sacrifício (técnica de Picro-Sirius)	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico em linhas da média do número de células inflamatórias para as coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 por grupo, com e sem PRP.....	23
Figura 2 -	Imagens digitalizadas de microscopia óptica coradas com hematoxilina-eosina obtidas em diferentes tempos de sacrifício, com e sem PRP (aumento 400x)	24
Figura 3 -	Gráfico em linhas das médias áreas (pixels/ μm^2) das lâminas de Tricômio de Masson para grupos com e sem PRP. Nas ordenadas se demonstra os dias até a eutanásia e nas abscissas as médias das áreas das lâminas, coradas em vermelho (músculo liso).....	26
Figura 4 -	Gráfico <i>boxplot</i> das médias das áreas musculares (pixels/ μm^2) das coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 dias, por grupo com e sem PRP, conforme técnica de tricômio de Masson	26
Figura 5 -	Imagens de microscopia óptica digitalizadas, coradas por tricômio de Masson mostrando diferentes momentos de acordo com o sacrifício das coelhas, nas populações com e sem plasma rico em plaquetas (PRP). (Aumento de 400x).....	27
Figura 6 -	Gráfico em linhas das médias das áreas (pixels/ μm^2) do colágeno total, nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (Técnica de Picro-Sirius).....	28
Figura 7 -	Gráfico tipo <i>boxplot</i> das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágenos total nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (picro-Sirius).....	29
Figura 8 -	Gráfico em linhas das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágenos dos tipo I e III nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (técnica de Picro-sirius)	30
Figura 9 -	Gráfico tipo <i>boxplot</i> das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágeno tipo I nos diversos tempos de estudo, e a figura 7 para o colágeno total.....	31
Figura 10 -	Gráfico tipo <i>boxplot</i> das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágeno tipo III nos diversos tempos de estudo, e a figura 7 para o colágeno total.....	31
Figura 11 -	Imagens de microscopia óptica obtidas com luz polarizante por digitalização de lâminas coradas por Picro-Sirius para os diferentes tempos de sacrifício. As imagens da linha superior são de animais com PRP e na linha inferior sem PRP. (aumento 400x)	32

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de aprovação do Comitê de Ética no uso de animais da UEL..... 40

ABREVIATURAS E SIGLAS

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
FC	Fatores de Crescimento
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TGF-beta	Transform Growth Factor Beta
IGF	Insulin-like Growth Factor
UEM	Universidade Estadual de Maringá
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ZN	Zona de Névoa
IUE	Incontinência Urinária de Esforço

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA	17
3	OBJETIVO	17
	OBJETIVO GERAL	17
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1	Delineamento	18
4.2	Animais	18
4.3	Grupo de animais	18
4.4	Técnica para o preparo do PRP	18
4.5	Cirurgia do implante	19
4.6	Processamento das amostras	20
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
6	RESULTADOS	22
6.1	Avaliação do processo inflamatório	22
6.2	Avaliação do infiltrado muscular	25
6.3	Análise do colágeno	28
7	DISCUSSÃO	33
8	CONCLUSÃO	36
9	REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Desde 1958 se realiza o reparo dos defeitos da parede abdominal associando o uso de telas, na tentativa de diminuir a sua recorrência (1). Diferentemente das suturas convencionais, a correção dos defeitos da parede abdominal com o uso de telas diminui a taxa de recorrência e promove um retorno precoce às atividades habituais (2,3).

Lichtenstein et al no final da década de 80, aprimoraram e descreveram o método para o implante de tela livre de tensão, chamado “tension free” (4). Neste método o implante de uma tela larga e sem tensão foi o suficiente para manter o resultado quanto a correção da doença, porém com diminuição das queixas de dor e retração local.

Desde então telas sintéticas de diferentes composições e arranjos vêm sendo largamente utilizadas em reparo de hérnias e em uroginecologia (5,6). A relação entre as diferentes propriedades das telas e a reação inflamatória causada por estes materiais já foram estudados em outros trabalhos e será discutida mais adiante (7).

A implantação de um material exógeno, como uma tela, causa uma resposta inflamatória aguda, seguida por reação do tipo corpo estranho que resulta em uma extensa área de fibrose local (8,9) levando a formação de uma capsula fibrosa, mesmo se decorrido anos após a sua implantação (10).

A resposta do hospedeiro ao implante se relaciona ao tipo de material usado e é sabido que a faixa autóloga produz menos inflamação e colágeno (11). A resposta biológica dos tecidos ao corpo estranho depende muito do material e da conformação da faixa (12). A literatura aceita que as telas monofilamentares de polipropileno com poros largos induzem a menos complicações (13).

O reparo de hérnias abdominais, as correções de prolapso pélvicos e as correções de incontinência urinária com uso de tela representam numericamente o maior grupo de implantes na medicina moderna com cerca de 1 milhão de cirurgias realizadas em todo o mundo (14). Isso se deve a vários fatores como o baixo custo, manuseio fácil, a extensa incorporação pelos tecidos e sua não biodegradação (15). Apesar disto, ainda há poucos estudos randomizados e controlados para avaliar a ação de substâncias bioativas que atuem juntamente com estas telas durante a incorporação ao tecido receptor.

Outro uso bastante frequente ocorre na uroginecologia para o tratamento da incontinência urinária, especialmente nos casos de incontinência urinária de estresse com altas taxas de sucesso e poucos efeitos colaterais (16). Telas também foram introduzidas no tratamento de prolapso genitais como um método efetivo comparado aos altos índices de recorrência das técnicas de colporrafias tradicionais sítio-específicas (17).

Resultados adversos com relação ao implante uroginecológico tais como extrusão vaginal, erosão de órgãos adjacentes como o intestino, uretra e bexiga e aderências podem

estar relacionados a alguma anormalidade durante o processo de cicatrização (18). Uma revisão sistemática de Abed et al. (19) demonstra que das 200.000 mulheres que são submetidas a cirurgias do assoalho pélvico anualmente nos EUA, 29% são reoperações de cirurgias reparadoras com uso de telas. O FDA (United States Food and Administration) e NICE (UK's National Institute for Health and Clinical Excellence) anunciaram medidas de esclarecimento preventiva com relação ao uso de telas sintéticas em cirurgia vaginal ou pélvica devido a ausência de evidências nível 1 que apoiem o seu uso segundo parâmetros de segurança e eficácia (20).

Ainda segundo esta mesma revisão, a erosão causada após o implante geralmente se manifesta clinicamente após 6 semanas até 12 meses e tem uma incidência de 10,3% e geralmente se associa a alguns fatores de risco como: histerectomia concomitante, idade, experiência do cirurgião, tabagismo e diabetes. A retração do tecido adjacente e formação de granuloma ocorrem em 7,8% dos casos e são relatadas geralmente em 8 semanas após a cirurgia. Já os casos de dispareunia surgem em 9,1% dos casos e na maioria das vezes estão associados a reparo posterior do assoalho e erosão da faixa. Esses dados demonstram claramente a necessidade de aprimoramento de técnicas e materiais para os implantes de telas.

De fato, um grande número de diferentes materiais sintéticos vem sendo pesquisados para uso em procedimentos cirúrgicos utilizando telas, na tentativa de melhorar a resposta em longo prazo. Como consequência, algumas estratégias têm sido colocadas em prática para melhorar a integração implante-tecido (21). Uma delas é o estudo da reação inflamatória causada pelo implante e, a partir desses resultados, desenvolver métodos para melhorar a hospedagem do implante.

Substâncias bioativas que atuam na inflamação e que aceleram o processo de reparo foram testadas em diversos tipos de protocolos (22,23). Cobertura de telas de polipropileno com colágeno gel altamente purificado mostrou uma diminuição da intensidade do processo inflamatório e promoveu um aumento na aderência da tela ao tecido (24), outro estudo avaliou a resposta inflamatória e a deposição de colágeno quando usado óxido nítrico recobrimdo telas e demonstrou diminuição reação dos fibroblastos sem alterar o processo inflamatório agudo (25). Outros tipos de materiais foram utilizados na confecção de telas e são também citados tais como o pericárdio bovino e a submucosa intestinal suína (26). O titânio como cobertura em telas também foi usado, porém sua resposta em tecido humano não foi extensamente estudada, sendo ainda incerto se este tipo de cobertura oferece alguma vantagem (27). Nanopartículas de ouro ligadas a telas de polipropileno foram também utilizadas objetivando uma diminuição da reação de oxidação e consequente melhora dos resultados e demonstrou um aumento da celularidade sem efeitos adversos estruturais (28).

A busca por telas que causem menores eventos adversos ou indesejados e que apresentem uma resposta tecidual adequada com bons resultados clínicos é uma constante para a bioengenharia, sejam essas telas compostas de material simples ou complexo. Neste contexto que a avaliação constante dos processos que envolvem a interação tela hospedeiro se justifica, visto ser um terreno ainda a desvendar. Nessa linha de pensamento podemos usar produtos exógenos (resinas, colas biológicas) ou endógenos (óxido nítrico, PRP) e avaliar a sua

resposta. Porém há poucos estudos publicados que avaliem esta relação em implantes abdominais, especialmente se associados ao PRP. Alguns marcadores já foram estudados, como é o caso da proteína-C reativa (PCR) e da interleucina-6 (IL-6), que se mostraram aumentados quando associados ao uso de telas de polipropileno (29,30), porém estes estudos não apresentavam associação ao PRP.

O plasma rico em plaquetas é definido como uma amostra de plasma com concentração superior de plaquetas e fatores associados à coagulação quando comparada a uma amostra normalmente encontrada no sangue de um indivíduo sem esse processamento (31). Não existe um consenso a partir de qual a concentração mínima de plaquetas poderemos classificar o derivado como PRP ou mesmo qual a concentração adequada de plaquetas. Em geral a resposta celular ocorre quando a contagem de plaquetas atinge valores de duas a três vezes o valor basal (32). Outra questão ainda sem resposta é sobre o protocolo ideal para a produção do PRP, atualmente existem inúmeros protocolos descritos, porém nenhum deles é reconhecido como padrão, existem desde protocolos com “kits” comerciais e custos dispendiosos até protocolos realizados “in house” com custos muito inferiores (33).

A introdução do PRP como uma nova biotecnologia com possíveis efeitos terapêuticos deu-se a partir de estudos realizados por Marx *et al.* em 1998 (34,35), quando propôs introduzir estudos com PRP e explorar seu potencial. Posteriormente o interesse clínico do PRP como biomaterial aumentou devido sua capacidade de conduzir ao reparo em diferentes tecidos (36,37,38).

Desde meados dos anos 80 surgiram trabalhos utilizando o PRP no tratamento de feridas (39,40), sempre usando a variedade autóloga em forma de gel. Desde então este uso no tratamento de feridas cutâneas agudas e crônicas tomou impulso consistente (41) devido aos resultados justificando o seu uso devido aos múltiplos fatores de crescimento e proteínas plasmáticas contidas no gel. O potencial efeito do PRP é atribuído à capacidade de promover a regeneração de tecidos através da liberação de fatores de crescimento (FC) presente nos alfa-grânulos plaquetários. Estes grânulos liberam os fatores de crescimento logo após a formação do coágulo (42) e as proteínas contidas nestes grânulos alfa possuem uma forte influência nos fenômenos reparatórios das feridas. Entre outras proteínas encontram-se: PDGF (“platelet derived growth factor”) quimiotático de macrófagos, TGF-Beta (“transforming growth factor”) e IGF (“insulin-like growth factor”) também exercem ação quimiotática, mitogênica e angiogênica sobre as células, induzindo a síntese de colágeno. Algumas proteínas liberadas pelas plaquetas encontram-se ausentes nas feridas crônicas, evidenciando o papel dessas substâncias na reparação tecidual (43). As plaquetas começam a secretar essas substâncias em aproximadamente 10 minutos após a formação do coágulo. Após uma hora, mais de 95% dos fatores de crescimento foram liberados (44) sintetizando essas proteínas por mais 5 a 10 dias, após este período os macrófagos passam a regular a reparação tecidual e liberar seus próprios fatores.

O resultado em múltiplos estudos sobre a eficácia do PRP em variadas especialidades tem sido publicado. Estes estudos relatam uma melhora na cicatrização, diminuição dos índices de infecção, menor incidência de fístulas e hemorragias (45,46). Estudo

em feridas crônicas de pacientes diabéticos após a aplicação tópica de PRP demonstrou que sua utilização é mais efetiva que os métodos padrão para feridas profundas (47).

Em levantamento feito junto a database PubMed considerando as publicações literárias em língua inglesa entre os anos de 2000 e 2014 foram encontrados 83 estudos, destes 26 eram estudos randomizados, 14 eram estudos comparativos, 29 eram série de casos e 14 eram relatos de casos. Selecionamos então 40 estudos, aqueles randomizados e os comparativos, e estes estudos mostraram resultados favoráveis ao uso de PRP em 16 deles, os outros 24 mostraram-se sem qualquer alteração ou inconclusivos. Apesar de ainda não existirem estudos consistentes para o uso do gel de PRP associado ao uso de telas, dados preliminares em várias especialidades cirúrgicas indicam que o gel autólogo de PRP além de favorecer uma rápida cicatrização promove o aumento na produção de colágeno. Assim, seria possível que o PRP também estimulasse a produção de colágeno na matriz extracelular, melhorando o índice de sucesso com o uso de telas em reparo de defeitos em parede abdominal anterior, em uroginecologia ou ainda em hérnias lombares.

O uso de PRP para fixação de tela abdominal já foi descrito por Zieren et al e Sclafani et al observando uma aceleração no processo de cicatrização após o uso de PRP em herniorrafias sintéticas. Recentemente nova forma de utilização surgiu com o uso laparoscópico ou endoscópico para promover diminuição da incidência de fístulas, hemorragia e infecção após anastomoses gastrointestinais (48). Outros usos inovadores do PRP podem ser encontrados na literatura principalmente na área de ortopedia e odontologia.

Por outro lado, Einarsson et al (49) em um estudo clínico com pequeno número de pacientes submetidos a correção de prolapso vaginal anterior associado ao uso intra-operatório de gel de PRP, não demonstraram melhora na produção do colágeno aos 3 meses e nos índices de re-operação com 10 meses de acompanhamento.

2. JUSTIFICATIVA

Escolhemos o PRP para o estudo da aceleração do processo de reparo, por ser uma fonte de diversos fatores de crescimento, já largamente utilizada em outras áreas cirúrgicas (dermatologia, ortopedia, odontologia, etc) com bons resultados. Também o PRP é de fácil obtenção, com grande potencial de utilização sem adição de novas tecnologias e consequentemente custos.

Ainda que existam pesquisas associando PRP com telas de polipropileno, um estudo mais detalhado dessa associação pode permitir a seleção dos possíveis fatores de crescimento mais favoráveis a uma adequada integração tela-hospedeiro. Já que os trabalhos existentes não avaliam as alterações induzidas pelo PRP no tecido e no decorrer do tempo.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar o efeito da impregnação do gel de PRP na integração de telas de polipropileno monofilamentar implantadas no tecido subcutâneo abdominal de coelhas adultas.

Objetivos Específicos

Estudar as características da reação inflamatória induzida por telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas no tecido subcutâneo de coelhas adultas, através da contagem de células do infiltrado inflamatório no sítio de implantação.

Estudar as alterações na produção do colágeno tipo I, tipo III e total, induzidas por telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas no tecido subcutâneo de coelhas adultas, através da microscopia óptica com luz polarizada na coloração de Picro-Sirius.

Estudar as alterações na formação de tecido muscular induzidas por telas de polipropileno recobertas por PRP implantadas no tecido subcutâneo de coelhas adultas, através da densidade de fibras musculares em microscopia óptica na coloração de Tricômio de Masson.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto recebeu aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina em 01/07/2013 (CEUA 12071.2013.21)

4.1 Delineamento

Estudo experimental, onde a escolha do coelho ocorreu pela necessidade de obter quantidade suficiente de sangue para a produção de PRP. Também o coelho é um animal muito usado para estudos de biocompatibilidade. A opção por fêmeas foi para reproduzir a prática clínica, já que em mulheres com incontinência urinária ou prolapso genital frequentemente se utiliza esta tela.

4.2 Animais

A amostra de trinta coelhas adultas da raça White New Zealand, fornecidas pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. Tais animais foram observados por trinta dias, anteriormente ao início do estudo, afim de excluir doenças próprias desta espécie e permaneceram no biotério do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná, alojadas individualmente em gaiolas, sob condições ideais de temperatura, umidade e luz, sendo alimentadas com ração e água. Os espécimes foram adquiridos com 6 meses de vida e pesaram na data do implante entre 2.800 e 4.000 grs (média de 3.350 grs).

4.3 Grupo de animais

As trinta coelhas foram separadas em dois grupos iguais de quinze indivíduos escolhidos por sorteio. Foi implantada, na parede abdominal, na interface entre a hipoderme e a fáscia anterior da musculatura abdominal uma tela de polipropileno monofilamentar medindo 10 x 10 mm com poros de 1500 micra recoberta com gel de PRP (grupo I) e as outras 15 coelhas (grupo II) receberam a tela no mesmo local, porém sem o gel de PRP.

4.4 Técnica para o preparo do PRP

Para a obtenção do PRP utilizou-se o protocolo para humanos descrito por Anitua et al, citado por Macedo et al (50).

Utilizando-se técnica asséptica e uma seringa com capacidade para 10 ml, fez-se a aspiração de 1 ml de anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e posteriormente aspirou-se mais 5 ml de sangue total através de punção cardíaca subesternal transferindo toda a solução para um tubo de ensaio. A amostra foi gentilmente agitada para homogeneizar as soluções e então colocadas na centrífuga por 10 minutos usando uma velocidade de 1200 rpm a 24°C.

Após a primeira centrifugação a amostra de sangue ficou separada em diferentes fases: a fase inferior representada pelas hemácias, fase intermediária representada por uma fase esbranquiçada também referida como “zona de névoa” (ZN) que contém plaquetas e

leucócitos, e a fase superior que representa o plasma. As frações correspondentes à ZN um pouco de plasma, juntamente com uma pequena fração de hemácias foram aspiradas com pipeta e transferidas para 2 tubos “eppendorf”. O restante do material foi desprezado.

Os tubos de “eppendorf” foram levados novamente para centrifugação, agora por 10 minutos a 2000 rpm e a 24°C. Com o uso de agulha e seringa foi retirado 1 ml do volume superior do frasco e imediatamente adicionado 1,0 ml de gluconato de cálcio 10%. Realizado homogeneização. Colocado em banho-maria, a 37°C por 5 minutos, obtendo-se o gel. Após a formação do gel o material foi levado ao biotério nos tubos vedados e implantado sobre as telas.

Durante a elaboração do PRP um bioquímico do laboratório de pós-graduação que não tinha conhecimento do trabalho realizou a contagem de plaquetas através da coleta adicional de uma amostra colhida em 2 animais a cada grupo de cinco indivíduos, também escolhidos por sorteio. Os resultados mostraram o aumento da concentração do PRP em aproximadamente três vezes a encontrada antes da preparação.

4.5 Cirurgia de Implante

Os espécimes foram anestesiados com Xylasina e Quetamina intramuscular e deixados em observação até o efeito da medicação ser observado. Após a coleta de sangue para obtenção do PRP, realizou-se uma incisão transversa na região inferior do abdômen. Os tecidos foram então dissecados para o implante da tela sobre a fáscia da musculatura abdominal; no grupo I esta tela foi recoberta pelo gel de PRP e no grupo II (controle) foi implantada somente a tela, de forma padronizada em todos os animais. Após o implante a pele foi suturada com fio de nylon 4.0, tomou-se o cuidado de evitar que a tela ficasse em contato direto com a sutura da pele. Ainda anestesiadas cada coelha recebia uma dose de penicilina benzatina 40.000UI/kg intramuscular, que foi o antibiótico escolhido pelo médico veterinário do biotério.

Após o procedimento cirúrgico, e após a recuperação da anestesia, as coelhas foram levadas ao biotério da instituição, em suas gaiolas, onde permaneceram em condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação) até o momento da eutanásia. A analgesia pós-operatória foi realizada com solução de Tramadol 1mg/Kg via oral a cada 6 horas.

Os animais foram divididos em grupos:

Subgrupo 1: 05 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II, eutanásia aos 07 dias após o implante das telas

Subgrupo 2: 05 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II, eutanásia aos 30 dias após o implante das telas

Subgrupo 3: 05 coelhas do grupo I e 5 coelhas do grupo II, eutanásia aos 90 dias após o implante das telas

4.6 Processamento das amostras

Os animais foram novamente anestesiados com quetamina e xylasina, como realizado no ato do implante das telas. Somente após o efeito dos medicamentos é que foi possível submeter cada animal à eutanásia. Logo após foi retirada, em bloco, da parede abdominal, de forma asséptica. Preservaram-se as relações anatômicas entre as diversas camadas. Foi realizada a análise macroscópica do tecido, procurando-se evidenciar sinais de eritema, necrose, tumefação e coleções. Não houve infecção na ferida ou sinais de extrusão da tela. Em seguida, as amostras de tecido tiveram suas extremidades fixadas, com alfinetes, em placas de material (plástico) rígido, de forma a impedir retrações e dobras durante a fixação e desidratação do material.

A fixação tecidual foi realizada depositando-se as amostras em recipiente contendo formaldeído 10%, no qual permaneceram por 48 horas. A seguir, as regiões com os implantes foram identificadas e separadas, de forma a se obter retângulos de 10 mm por 10 mm. Cada fragmento quadrangular foi cortado em retângulos menores, de 10 mm por 2 mm. Estes fragmentos menores foram depositados em caixetas plásticas apropriadas para a inclusão em parafina. Foi feito o embocamento em parafina com a realização de 2 lâminas por animal tendo dois cortes em cada uma delas.

Para a confecção das lâminas foram realizados cortes na área central de cada bloco, em sentido perpendicular à tela e preservando-se as camadas.

As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina e Tricromico de Masson pelo Laboratório de Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina em microscopia ótica convencional. Para a técnica de Picro-Sirius, utilizou-se microscópio com luz polarizada. Os campos microscópicos foram escolhidos aleatoriamente e digitalizados em microscópio marca Olympus e câmera digital 3CCD pró-series, o programa de captura e análise Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Sprig, MD) e aumento de 400vezes. O colágeno tipo I, III e total foi medido por morfometria computacional dos cortes em cinco diferentes campos/corte em cada uma das lâminas (densidade por micra²) enquanto as células inflamatórias foram contados nos diferentes campos (aumento 400x). A concentração de fibras musculares foi avaliada por densidade por micra². Toda a avaliação histológica incluindo a captura de imagens e a obtenção dos dados por morfometria computacional foi realizada por patologista que não participou do projeto e não conhecia os grupos de animais.

A contagem de células inflamatórias foi utilizada para avaliar a resposta inflamatória do tecido para as diferentes populações e tempo até a eutanásia.

Para avaliar o grau de infiltração de tecido muscular nos espécimes foi escolhido o método de coloração das lâminas pelo tricômio de Masson. Neste método o tecido responde em três cores distintas: azul devido à anilina e que identificará o colágeno, negro devido à eosina e identificará principalmente os núcleos e finalmente o vermelho que realçará o tecido muscular devido ao corante fucsina. O objeto de estudo para este método foi a coloração vermelha proporcionada pela fucsina e sua quantificação foi obtida através da microscopia ótica e leitura digital medindo-se a densidade em pixels por micra² nos diferentes campos observados.

Para a avaliação do colágeno total, colágeno tipo I e tipo III utilizou-se a técnica de Picro-sirius. Este método foi o escolhido por ser específico para colágenos, aumentando a birrefringência deste material, através do uso de lente polarizada. Assim foi possível a diferenciação entre o colágeno do tipo I se colore em *vermelho* e o do tipo III que assume a cor amarelo-esverdeado (tratado aqui apenas como *verde*).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foram realizados o teste de Wilcoxon (rank sum), o teste de Kruskal-Wallis, o teste de Jonckheere–Terpstra (Teste de tendência de Jonckheere) e o teste de Friedman, considerando diferenças entre os grupos estatisticamente significativas quando $p < 0,05$ (5%).

O teste de Wilcoxon foi realizado para identificar diferenças estatisticamente significativas dos valores observados para os grupos (com ou sem PRP) e também para o tipo de colágeno (Tipo I e III). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar diferença dos valores observados para pelo menos dois dos intervalos de eutanásia (7, 30 e 90 dias).

O teste de Jonckheere teve por objetivo verificar se existe uma tendência a aumento com relação ao tempo até a eutanásia.

Já o teste de Friedman foi aplicado para avaliar se os valores têm diferenças estatisticamente significativas dentro do próprio grupo.

O programa utilizado para a análise estatística e confecção dos gráficos e tabelas foi o R version 3.1.2 (Pumpkin Helmet).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação do infiltrado Inflamatório

A tabela 1 e a figura 1 apresentam a soma das células inflamatórias para as coelhas submetidas a eutanásia com 7, 30 e 90 dias considerando os grupos com presença de PRP e sem a presença de PRP. Pelo teste de Wilcoxon não se observou diferença significativa entre os grupos com PRP e sem PRP ($p=0,49$), já pelo teste de Jonckheere observou-se que os valores apresentaram crescimento significativo ($p=0,027$), ou seja, existe uma tendência de aumento das células inflamatórias no grupo com PRP conforme aumenta o tempo até a eutanásia da cobaia.

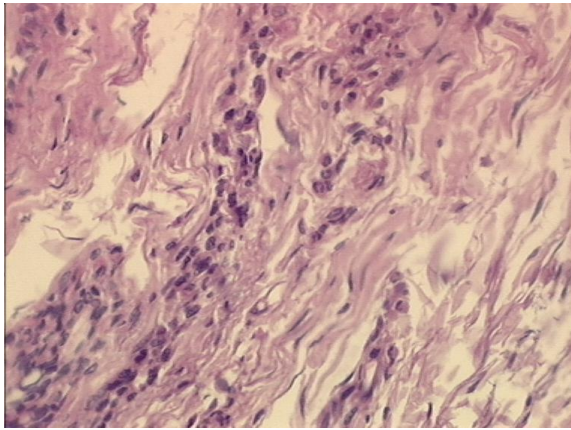
Tabela 1: Demonstração da média e desvio padrão do número de células inflamatórias obtido para as coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 por grupo, com e sem PRP.

Dias	Com PRP	Sem PRP	Total
7	55 ± 4,30	79 ± 12,76	134 ± 9,32
30	125 ± 22,89	107 ± 30,20	232 ± 24,60
90	266 ± 40,33	135 ± 19,85	401 ± 33,00
Total Geral	446 ± 30,82	321 ± 20,30	767 ± 26,04

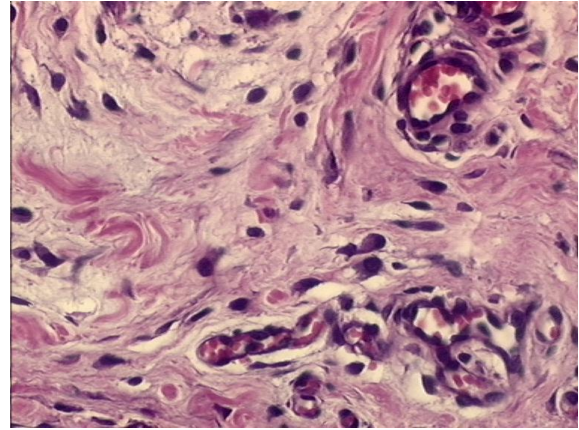
- * Teste de Wilcoxon para grupo: p-valor = 0,555
- * Teste de Wilcoxon para dias: p-valor = 0,171
- * Teste de Jonckheere: p-valor = 0,036
- * Teste de Friedman: p-valor = 0,135



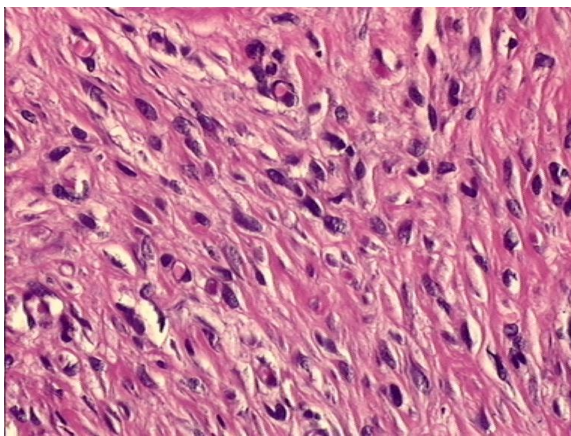
Figura 1: Gráfico em linhas da média do número de células inflamatórias para as coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 por grupo, com e sem PRP.



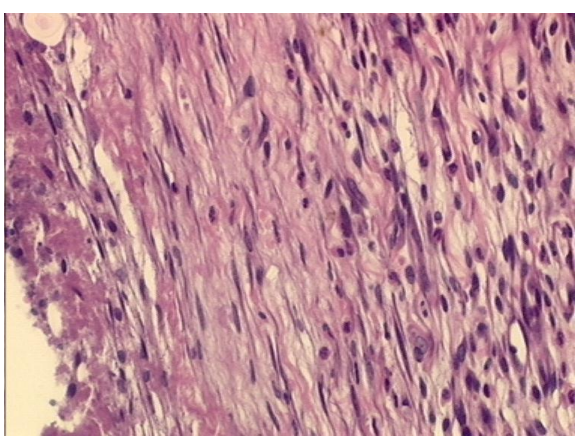
7 dias sem PRP



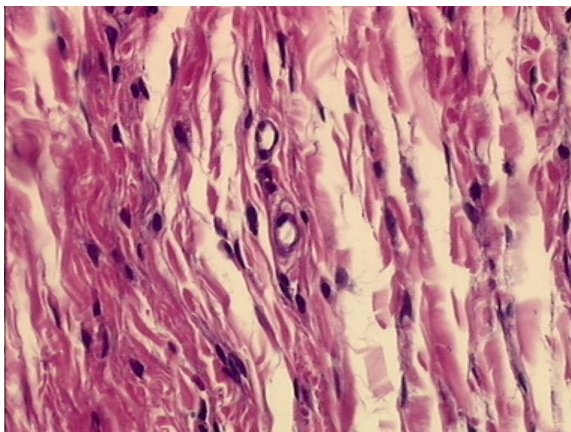
7 dias com PRP



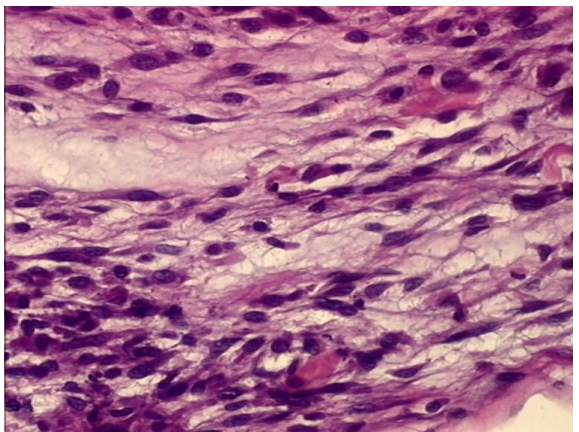
30 dias sem PRP



30 dias com PRP



90 dias sem PRP



90 dias com PRP

Figura 2 - Imagens digitalizadas de microscopia óptica mostrando infiltrado inflamatório em lâminas coradas com hematoxilina-eosina obtidas em diferentes tempos de sacrifício, com e sem PRP (aumento 400x)

6.2 A avaliação da infiltração muscular

Na tabela 2 e nas figuras 2 e 3 são apresentadas as médias (pixels/micra²) das lâminas coradas por tricômio de Masson para as coelhas submetidas à eutanásia com 7, 30 e 90 dias considerando os grupos com presença de PRP e sem a presença de PRP. Pelo teste de Wilcoxon não se observou diferença significativa entre os grupos com PRP e sem PRP, já pelo teste de Jonckheere observou-se que os valores observados para os tricômios não apresentaram crescimento significativa, ou seja, não existe uma tendência de que os valores observados aumentem conforme o tempo até a eutanásia da cobaia. Para o teste de Friedman não houve evidências de diferença significativa nos valores observados para os grupos até a eutanásia das cobaias.

Tabela 2: Demonstração das médias e desvio padrão da área muscular (pixels/ μm^2) em coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 dias para os grupos com e sem PRP, pela técnica de tricômio de Masson.

Dias	Com PRP	Sem PRP	Total
7	17474,27 ± 4629,33	21027,97 ± 5967,66	19251,12 ± 5298,49
30	19652,78 ± 5001,01	5226,38 ± 2811,58	13241,05 ± 4027,93
90	15238,38 ± 5160,62	16569,53 ± 5076,74	15903,96 ± 5118,68
Total Geral	17455,14 ± 4930,32	14920,93 ± 4747,74	16231,73 ± 4842,18

* Teste de Wilcoxon para grupo: p-valor = 0,513, Teste de Wilcoxon para dias: p-valor = 0,267

** Teste de Jonckheere: p-valor = 0,717, Teste de Friedman: p-valor = 0,607

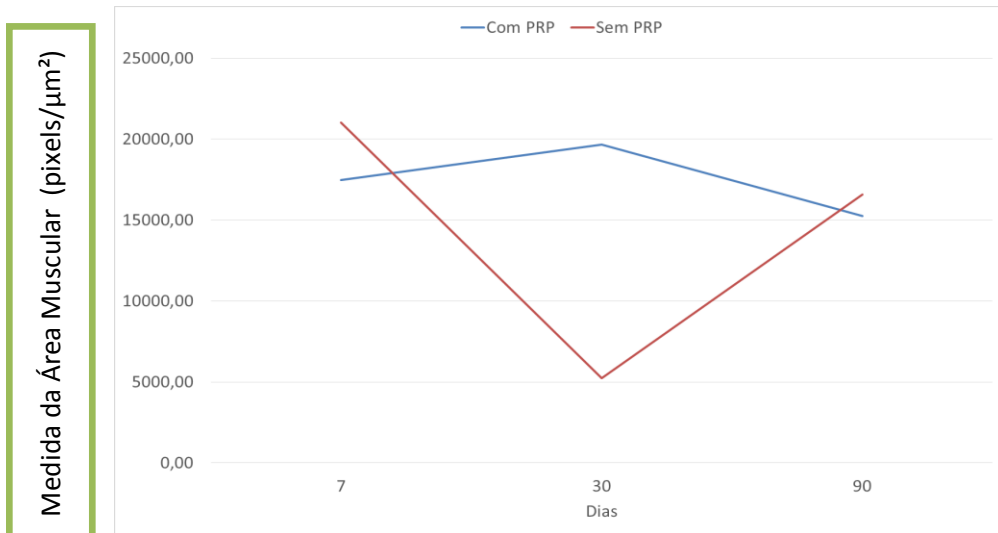


Figura 3: Gráfico em linhas das médias áreas (pixels/μm²) das lâminas de Tricômio de Masson para grupos com e sem PRP. Nas ordenadas se demonstra os dias até a eutanásia e nas abscissas as médias das áreas das lâminas, coradas em vermelho (músculo liso).

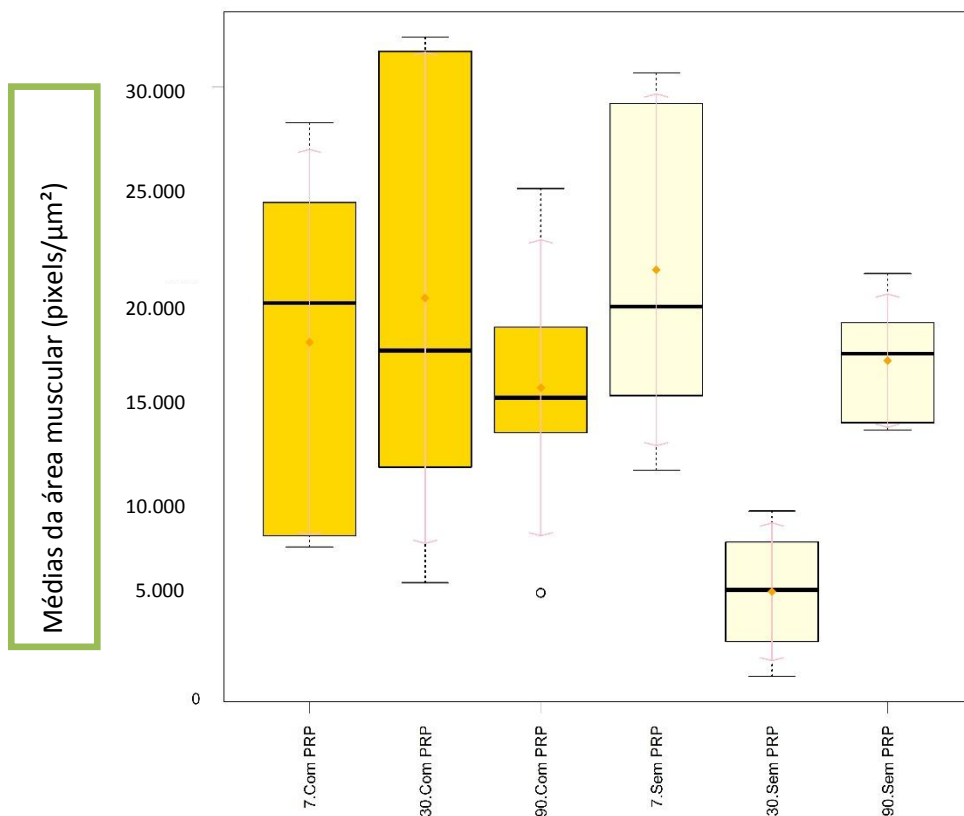
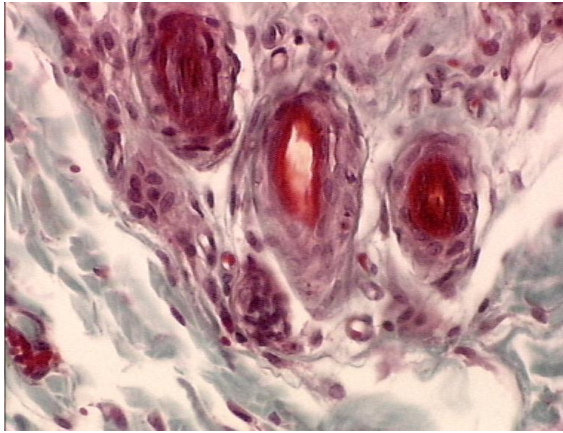
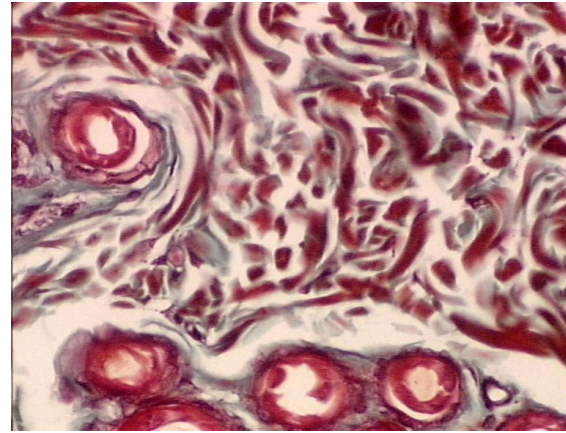


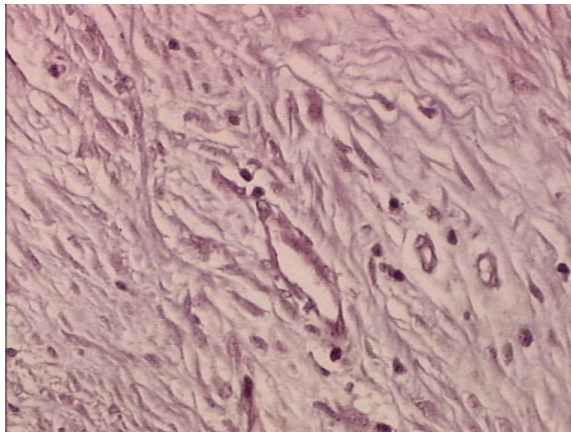
Figura 4: Gráfico *boxplot* das médias das áreas musculares (pixels/μm²) das coelhas submetidas à eutanásia em 7, 30 e 90 dias, por grupo com e sem PRP, conforme técnica de tricômio de Masson.



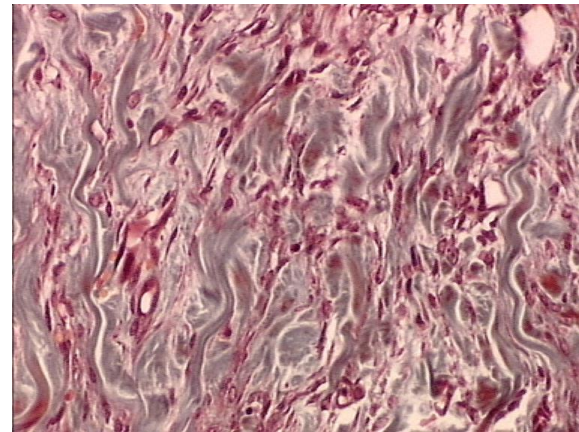
7 dias sem PRP



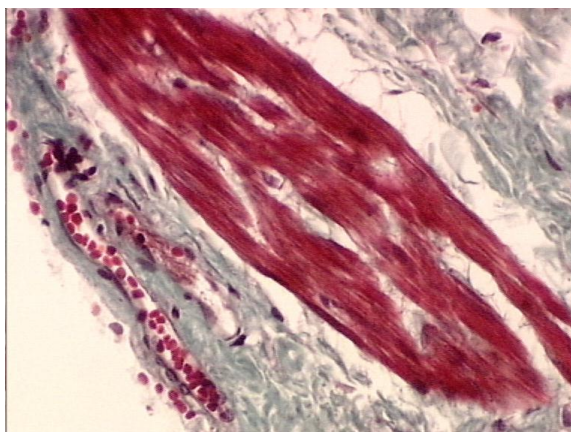
7 dias com PRP



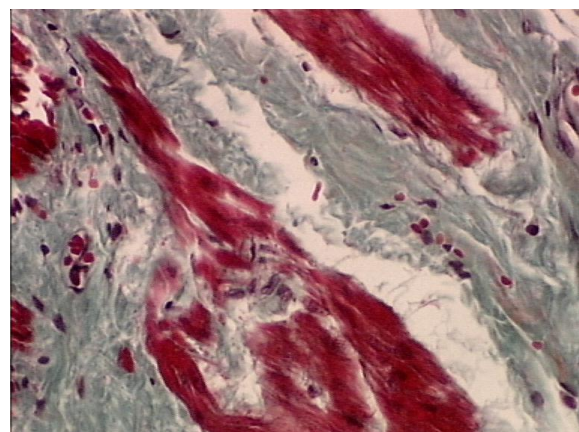
30 dias sem PRP



30 dias com PRP



90 dias sem PRP



90 dias com PRP

Figura 5 - Imagens de microscopia ótica digitalizadas, coradas por tricômio de Masson mostrando diferentes momentos de acordo com o sacrifício das coelhas, nas populações com e sem plasma rico em plaquetas (PRP). (Aumento de 400x).

6.3 Análise do colágeno

A tabela 3 e a figura 4 demonstram um aumento significativo de colágeno total para coelhas submetidas à eutanásia com 7 dias para o grupo com PRP, com o teste de Wilcoxon mostrando $p=0,008$, porém esta diferença não se sustenta com o tempo, voltando a níveis iguais em ambas as populações, isto fica demonstrado pelo Teste de Jonckheere com $p=0,008$. Ou seja, não há uma tendência de manutenção da diferença de concentração de colágenos com o seguimento em 30 e 90 dias.

Tabela 3: Demonstração das médias e desvio padrão do colágeno total (pixels/ μm^2) em coelhas submetidas à eutanásia com 7, 30 e 90 dias com e sem PRP.

Dias	Com PRP	Sem PRP	Total
7	23958,04 \pm 1910,83	11850,49 \pm 3316,61	17904,26 \pm 6872,54
30	8995,37 \pm 5489,29	9613,28 \pm 1591,89	9270,00 \pm 4015,29
90	11647,92 \pm 2363,43	12545,45 \pm 1357,48	12096,69 \pm 1877,59
Total Geral	14867,11 \pm 7535,18	11459,49 \pm 2469,32	13222,05 \pm 5850,09

* Teste de Wilcoxon p-valor para grupo = 0,316

* Teste de Wilcoxon p-valor para dias = 0,008

* Teste de Jonckheere: p-valor para tendência de aumento conforme dias = 0,844

* Teste de Friedman p-valor dentro do mesmo grupo = 0,563

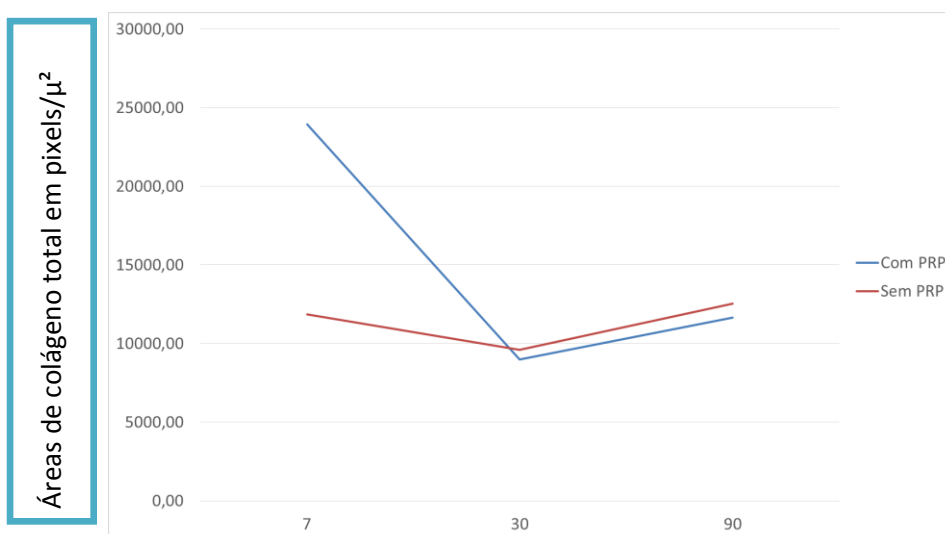


Figura 6: Gráfico em linhas das médias das áreas (pixels/ μm^2) do colágeno total, nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (Técnica de Picro-Sirius).

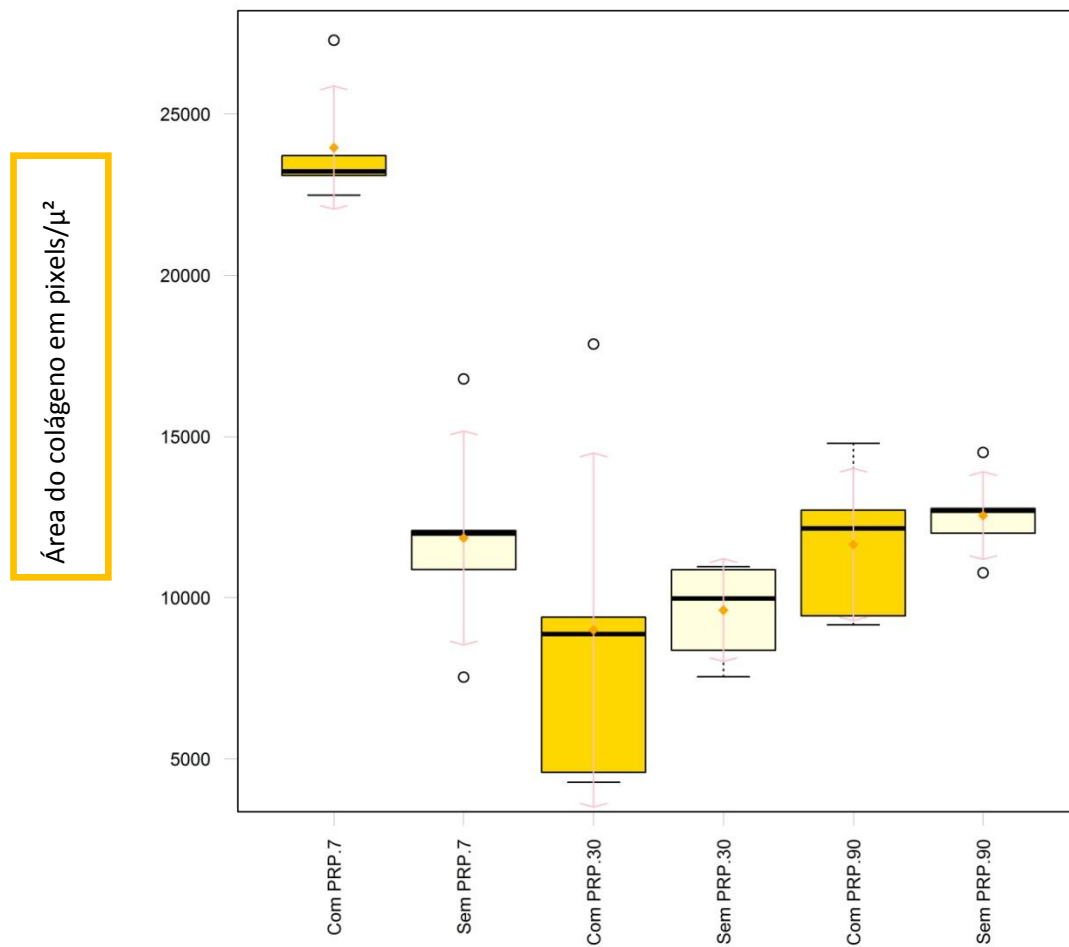


Figura 7 - Gráfico tipo *boxplot* das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágenos total nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (picro-Sirius).

Ainda para as coelhas submetidas à eutanásia com 7 dias, podemos observar uma diferença entre os tipos de colágenos para os grupos com e sem PRP. Tanto o colágeno do tipo I quanto o do tipo III nos espécimes em que foi usado o PRP mostram-se aumentados quando comparamos com a população sem PRP, isto fica bem demonstrado no gráfico de linhas da figura 5 (teste de Wilcoxon obteve um p-valor=0,001).

Tabela 4 - Demonstração das médias e desvio padrão das áreas (pixels/ μm^2) dos diversos tipos de colágeno, em relação à presença de PRP para os diferentes tempos até a eutanásia das coelhas (técnica de Picro-Sirius).

	Tipo I			Tipo III			Total
	Com PRP	Sem PRP	Total	Com PRP	Sem PRP	Total	
7	13362,03 ± 4225,86	9486,60 ± 4391,83	11424,32 ± 4308,85	10596,00 ± 6141,90	2363,89 ± 1472,40	6479,94 ± 3807,15	8952,13 ± 4058,00
30	5931,34 ± 2715,93	6663,91 ± 1797,79	6256,93 ± 2307,87	3064,03 ± 2081,34	2949,37 ± 1667,98	3013,07 ± 1897,62	4635,00 ± 2102,75
90	9173,23 ± 3697,00	9530,70 ± 2986,27	9351,97 ± 3341,63	2474,69 ± 1310,88	3014,75 ± 1394,80	2744,72 ± 1352,84	6048,34 ± 2347,24
Total Geral	9488,87 ± 3546,26	8695,87 ± 3148,69	9106,04 ± 3354,33	5378,24 ± 3178,04	2763,62 ± 1500,56	4116,01 ± 2368,22	6611,03 ± 2861,28

* Teste de Wilcoxon p-valor para grupo = 0,351,

* Teste de Wilcoxon p-valor para dias = 0,038

* Teste de Wilcoxon p-valor para tipo = < 0,001

* Teste de Jonckheere p-valor para tendência a aumento conforme o tempo = 0,954

* Teste de Friedman p-valor para grupo versus dias = 0,157

* Teste de Friedman p-valor para grupo versus tipo = 0,564

* Teste de Friedman para tipo versus dias: p-valor = 0,223

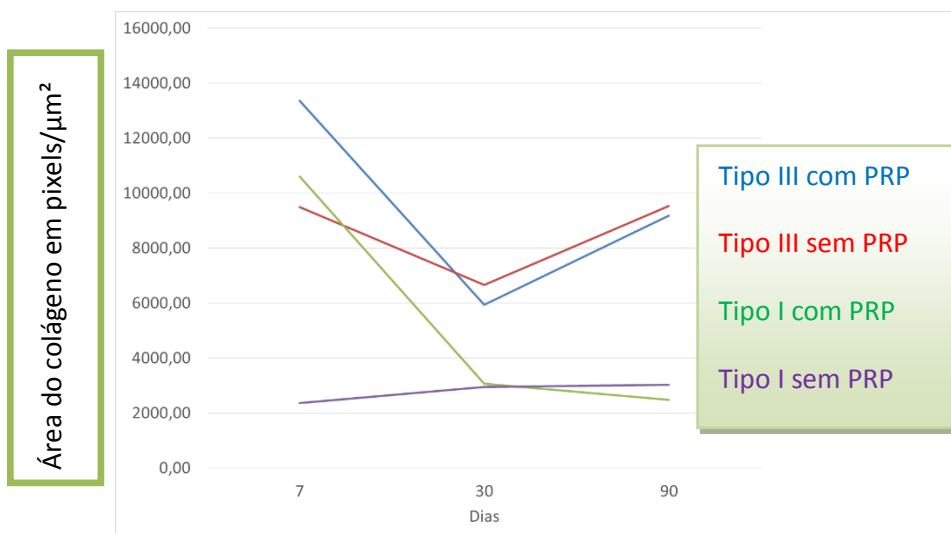


Figura 8 - Gráfico em linhas das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágenos dos tipos I e III nos diversos tempos de estudo, e para grupos com e sem PRP (técnica de Picro-sirius)

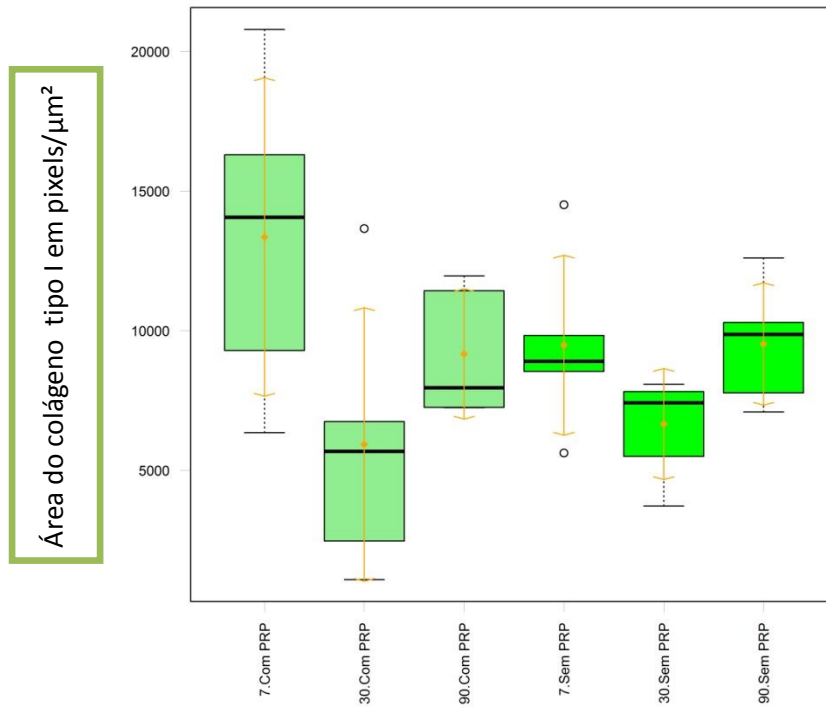


Figura 9 - Gráfico tipo *boxplot* das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágeno tipo I nos diversos tempos de estudo, e a figura 7 para o colágeno total.

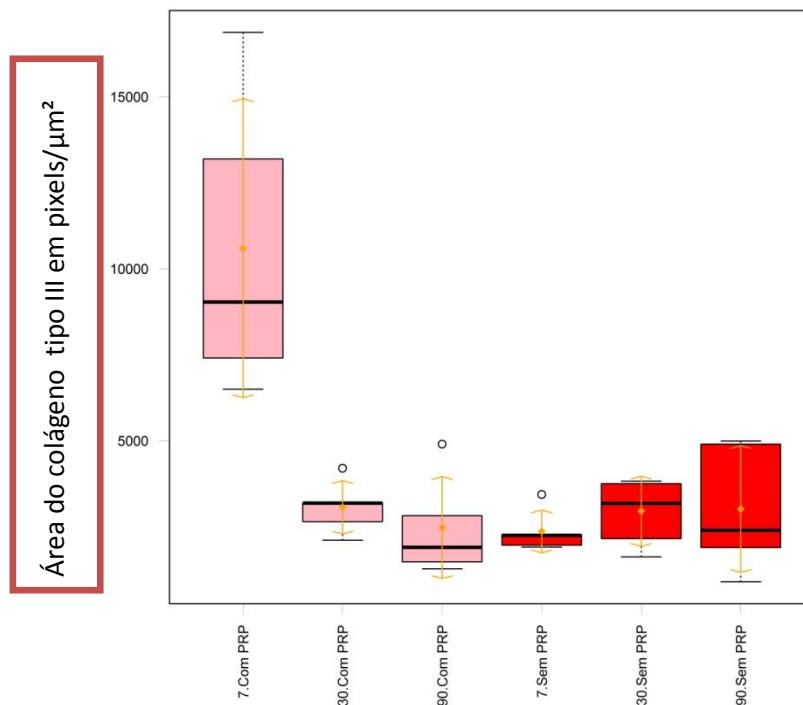


Figura 10 - Gráfico tipo *boxplot* das médias das áreas (pixels/ μm^2) de colágeno tipo III nos diversos tempos de estudo, e a figura 7 para o colágeno total.

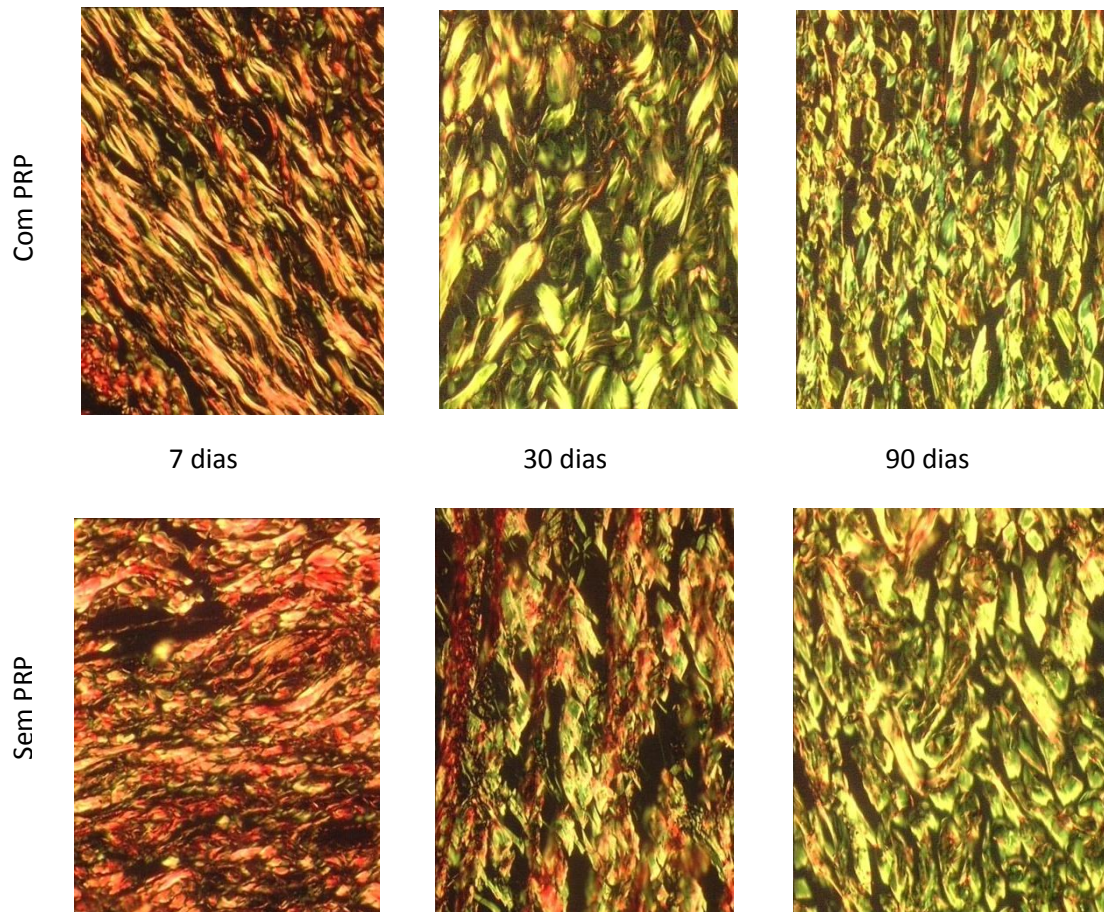


Figura 11 - Imagens de microscopia óptica obtidas com luz polarizante por digitalização de lâminas coradas por Picro-Sirius para os diferentes tempos de sacrifício. As imagens da linha superior são de animais com PRP e na linha inferior sem PRP. (aumento 400x).

7. DISCUSSÃO

Gerullis et al usando faixa recoberta por plasma em modelo animal concluíram que a reação inflamatória local é um evento que ocorre imediatamente após o implante e que não pode ser influenciado pela cobertura de plasma independente do local de implantação e que as primeiras células inflamatórias a surgirem após o implante são os neutrófilos atingindo sua maior concentração após 24 horas. Os neutrófilos tem acesso ao tecido devido à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas pelas plaquetas, aderem ao endotélio mediante ligação com receptores de membrana (selectinas) (51).

Os macrófagos e linfócitos-T migram para o tecido 48-96 horas após a lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Os macrófagos tem um papel fundamental no processo de cura, tanto na fase aguda do processo quanto no desfecho crônico, remodelando e reparando o tecido (52). “Tem papel fundamental no término do desbridamento iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular” (51). A estratégia que justificaria o uso do PRP não se concentra apenas nas modificações da resposta inflamatória inicial, mas também a médio e longo tempo o que permitiria uma melhor adaptação da tela ao hospedeiro (53).

Avaliando os dados obtidos em nosso trabalho pode-se notar que não há alteração significativa de células inflamatórias em uma fase inicial do processo (7 dias). Este resultado demonstra que o PRP não altera a resposta inflamatória inicial e, portanto não influencia negativamente nesta fase do processo. No entanto a partir dos 30 dias o aporte de células inflamatórias começa a aumentar atingindo uma diferença significativa aos noventa dias ($p=0,01$), justamente na fase tardia do processo, quando se estabelece o reparo. Delavary et al (54) afirmaram que o infiltrado inflamatório que ocorre tanto inicialmente quanto durante o processo de reparo respondem a estímulos quimiotático como PDGF, presente em macrófagos e plaquetas, e isso pode explicar a manutenção da migração de células inflamatórias que favorecem o reparo final já que os macrófagos e linfócitos são os principais responsáveis pela manutenção dos estímulos na fase tardia (51).

A fibrose do tecido ao redor da tela é realizada principalmente pelos colágenos do tipo I e tipo III. O colágeno tipo III aparece em uma fase inicial e na presença de células inflamatórias, porém é o colágeno do tipo I, que surgirá somente em uma fase mais tardia, que estabilizará o processo e organizará a incorporação do implante (11). Essa aderência que ocorre entre o material sintético e o hospedeiro é que determina o sucesso. Neste contexto podem-se incluir outros fatores que influenciam, tais como fatores locais (isquemia, infecção, corpo estranho, edema) e fatores sistêmicos (diabete melito, hipovitaminose, hipotireoidismo, alterações da coagulação, idade, sepse, insuficiência hepática e renal, desnutrição, radioterapia, uso de medicamentos) (51). Assim, o uso do PRP é um recurso interessante na dinâmica do processo em questão, pois o incremento da produção dos dois tipos de colágeno deve estar associado ao crescimento local dos fibroblastos, favorecendo uma melhor fixação da tela ao sítio em que foi empregada. Desta forma, pode-se propor que a ação do PRP

ajudaria a fixação definitiva do implante que é o resultado final ideal, pois é a segurança da fixação da tela que garantirá o resultado permanentemente adequado ao processo.

Em nosso experimento é nítida a diferença de resposta à produção do colágeno ($p=0,001$) de ambos os tipos (I e III). As linhas demonstrativas da produção mostram um aumento principalmente no colágeno do tipo I ao se comparar os grupos com e sem PRP para as coelhas sacrificadas com 7 dias, chegando a uma diferença de aproximadamente 4,5 vezes. Isto é muito relevante visto que este tipo de colágeno é o mais comum no final do processo de reparo do tecido. O colágeno do tipo I mostra um incremento no início do processo, sugerindo uma possível aceleração no processo de reparo por ação do PRP, mas não há diferença significativa ao final do processo de reparação, mantendo o mesmo nível de concentração dos indivíduos que não foram submetidos ao uso de PRP. O colágeno do tipo III também apresenta um incremento de produção nas coelhas submetidas à eutanásia aos 7 dias, embora em menor amplitude quando comparado ao colágeno tipo I, porém é nesta fase inicial que o colágeno do tipo III é mais ativo e responsável pela reparação do tecido. Isto posto, pode-se concluir que a resposta inicial está aumentada para a produção do colágeno, que é um dos elementos da reparação do tecido, em indivíduos que foram implantados adicionando PRP e isto pode repercutir favoravelmente para uma melhor resposta de fixação tela-hospedeiro.

Com base nos resultados obtidos em nosso estudo, pode-se sugerir que o PRP aumentou a reação inflamatória final e também alterou a produção de colágeno total em uma fase inicial. Isso traduz uma possível ação ativa do derivado estudado em prol de resultados favoráveis para uma melhor incorporação do implante ao hospedeiro. Essas reflexões ficam evidentes ao se estudar as duas variáveis em conjunto, concentração de células inflamatórias e produção de colágeno. Em um processo inicial quando a reação inflamatória intensa pode causar uma rejeição do material implantado (10), o PRP não alterou esta reação, porém quando a concentração de células inflamatórias se faz necessária para a manutenção do processo crônico, visando uma integração definitiva do material, é que o PRP demonstra uma resposta positiva, já que esta concentração aparece aumentada quando comparamos as populações com e sem PRP. Soma-se a isto o fato da produção de colágeno total encontrar-se aumentada na fase inicial do processo, mostrando uma possível aceleração do processo de reparo tecidual.

Neste estudo, o processo de fixação da tela ao hospedeiro inicia-se de forma incrementada pela produção aumentada de colágeno total justamente em um momento em que a concentração de células inflamatórias está seguindo os parâmetros habituais para indivíduos que recebem telas de polipropileno, ou seja, o processo de fixação do implante está ocorrendo sem que haja uma exacerbação de uma reação inflamatória que poderia resultar em reação de corpo estranho e rejeição do material. Já na fase tardia a concentração de células inflamatórias aumenta no grupo com PRP e isto mantém o processo inflamatório ativo o que pode facilitar a manutenção da incorporação da tela ao tecido do hospedeiro. Entretanto a produção do colágeno mantém-se nos mesmos níveis nos grupos com e sem PRP. Talvez se o experimento contemplasse tempos mais tardios para a eutanásia, por exemplo, seis meses, se observaria os efeitos desse aumento tardio do número de células inflamatórias e na produção de colágeno.

Assim pode-se sugerir uma ação do PRP tanto na fase inicial quanto na fase tardia do processo, agindo por diferentes vias, mas de forma sinérgica, isso ocorre possivelmente pela ação dos fatores de crescimento fornecidos pelos alfa grânulos plasmáticos.

Neste estudo não houve alteração estatisticamente significativa da resposta do tecido muscular. Esta constatação merece uma ressalva visto que o implante da tela foi realizado na face aponeurótica sem contato direto com o tecido muscular, quando implantado diretamente sobre tecido muscular como bexiga verifica-se a penetração deste tipo tecido (6). Portanto outros estudos para análise do efeito do PRP adicionado a telas de polipropileno em tecidos musculares devem ser realizados e os dados obtidos neste trabalho referentes a este aspecto não devem ser considerados.

Alguns pontos devem ser considerados, este trabalho utilizou-se de coelhas em fase adulta reprodutiva, porém as telas para uso ginecológico são geralmente empregadas em mulheres na menopausa, assim outros estudos simulando esta condição podem apresentar novidades em relação aos resultados. Outra questão a ser abordada é o fato de não ter havido uma diferenciação dos tipos celulares que compunham o infiltrado inflamatório, talvez uma análise diferenciando os tipos de leucócitos presentes no infiltrado inflamatório nos diferentes tempos, principalmente os linfócitos e macrófagos, possa trazer mais luz a questão.

Apesar destas considerações, ainda existe muitas perguntas a serem respondidas sobre a influência do PRP sobre os implantes e se isso pode repercutir satisfatoriamente em clínica. Para isso a avaliação imunohistoquímica dos tecidos e a análise da presença de PDGF nas diferentes fases do processo e sua comparação nos grupos com e sem PRP em seus diferentes momentos, podem ser a chave para explicar se está mesmo ocorrendo uma produção contínua e sustentada de PDGF ou outros fatores, em prol de uma melhor incorporação da faixa ao tecido. A avaliação de marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios nas diferentes fases do processo de reparo, sempre comparando as duas populações em questão, pode responder a perguntas como, quando e qual a intensidade da resposta inflamatória e se existe um desequilíbrio causado pela ação do PRP no tecido, sobretudo na presença de telas de polipropileno.

Portanto, apesar do discorrido acima, outros estudos deverão ser realizados para melhorar o entendimento da ação do PRP no tecido do hospedeiro e sua real validade para o uso em clínica.

8. CONCLUSÃO

O revestimento de tela de polipropileno com PRP associou-se com aumento de células inflamatórias no local do implante, e com tendência de incremento no decorrer do processo de reparação tecidual.

O revestimento de tela de polipropileno com PRP associou-se com aumento da concentração de colágeno tipo I e colágeno tipo III, sendo a concentração de colágeno total aumentada após 7 dias do implante.

O revestimento de tela de polipropileno com PRP não se associou com alteração da área do tecido muscular adjacente ao implante.

9. REFERÊNCIAS

1. Brown CN, Finch JG. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl.* 2010; 92(4): 272-278.
2. Scott NW, McCormack K, Graham P, Go PM, Ross SJ, Grant AM. Open mesh versus non-mesh for repair of femoral and inguinal hernia. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 4: CD002197.
3. Rutkow IM. Demographic and socioeconomic aspects of hernia repair in United States in 2003. *Surg Clin North Am* 2003; 83: 1045-1051.
4. Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK, Montllor MM. The tension-free hernioplasty. *Am J Surg* 1989; 157: 188–193.
5. Dietz HP, Svehla M, Walsh W: Mechanical properties of urogynecologic implant materials. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction.* 2003; 14: 239-243.
6. Afonso JS, Martins PA, Girão MJ: Mechanical properties of polypropylene mesh used in pelvic floor repair. *International Urogynecology Journal and Pelvic Floor Dysfunction.* 2008; 19: 375-380.
7. Gerullis H et al: Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of surgical innovation. 2013; *Biomed Research International.* 2013; 1-6.
8. Usher FC, Wallace SA. Tissue reaction to plastic: a comparison of nylon, orlon, Dacron, Teflon and Marlex. *Arch Surg.* 1958; 76: 997-1005.
9. Walker AP (1995) Biomaterials in hernia repair. In: Nyhus LM, Condon RE (eds) *Hernia*, 4th ed. Lippincott, Philadelphia, pp 534-540.
10. Klosterhaufen B, Junge K, Hermanns B, Klinge U. Influence of implantation interval on a long term biocompatibility of surgical mesh. *Br J Surg.* 2002; 89: 1043-1048.
11. Almeida SHM, Rodrigues MAF, Gregório E, Crespígio J, Moreira HA: Influence of sling material on inflammation and collagen deposit in an animal model. *Int J Urol.* 2007; 14: 1040-1043.
12. Bellon JM, Bujan J, Contreras L, Hernando A: Integration of biomaterials implanted into abdominal wall: process of scar formation and macrophage response. *Biomaterials* 1995; 16: 381-387.
13. Birch C, Fynes MM: The role of synthetic and biological prostheses in reconstructive pelvic floor surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002; 14: 527-535.

14. Schumpelick V, Klinge U, Welty G, Klosterhalfen B: Meshes within the abdominal wall. *Chirurg*. 1999; 70: 876-887.
15. Shankaran V, Weber DJ, Reed RL II, Luchette FA. A review of available prosthetics for ventral hernia repair. *Ann Surg* 2011; 253: 16–26.
16. Karram MM, Segal JL, Vasalo BJ, Kleemann SD. Complications and untoward effects of the tension free vaginal tape procedure. *Obstet Gynecol* 2003; 101: 929-932.
17. Miedel A, Tegersted G, Mörlin B, Hammarström M. A 5 year prostective follow-up study of vaginal surgery for pelvic organ prolapsed. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 19(12): 1593-1601.
18. Klinge U, Schumpelick V, Klosterhalfen B. Functional assessment and tissue response of short- and long-term absorbable surgical meshes. *Biomaterials* 2001; 22: 1415–1424.
19. U. S. Food and Drug administration. FDA Safety communication: UPDATE on Serious Complications Associated with Transvaginal Placement of Surgical Mesh for Pelvic Organ Prolapse. July 2011. From: <http://www.fda.gov/medicaldevices/alertsendnotices/ucm262435.htm>
20. Baessler K, Malher CF: Mesh augmentation during pelvic floor reconstruction surgery: risks and benefits. *Curr Opin Obstet Gynaecol*. 2009; 18: 560-566.
21. Abed H, Rahn DD, Lowenstein L, Balk EM, Clemons JL, Rogers RG: For de Systematic Review Group of the Society of Gynecologic Surgeons. Incidence and management of graft erosion, wound granulation, and dyspareunia following vaginal prolapsed repair with graft materials: a systematic review. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunction*. 2011; doi: 10.1007/s00192-011-1384-5.
22. Silver FH, Wang MC, Pins GD: Review preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials* 1995; 16: 891-903.
23. Sponitz WD: Fibrin sealant: past, present and future: a brief review. *World J Surg* 2010; 34: 632-634.
24. Siniscalchi RT, Melo M, Palma PCR, Dal Fabbro IM, Vidal BC, Riccetto CLZ: Highly purified collagem coating enhances tissue adherence and integration properties of monofilament propylene meshes. *Int Urogynecol J* 2013; 24(10): 1747-54.
25. Usher FC, Wallace SA. Tissue reaction to plastic: a comparison of nylon, orlon, Dacron, Teflon and Marlex. *Arch Surg*. 1958; 76: 997-1005.
26. Di Vita G, Milano S, Patti R, Raimondo D, Di Bella G, D'Agostino P, Leo P, Cilliari E. Cytokine modifications after tension-free hernioplasty or open conventional inguinal hernia repair. *Am J Surg*. 2001; 181: 487-491.
27. Prudente A, Oliveira MG, Riccetto CLZ: Can nitric oxide improve tissue integration of polypropylene mesh implanted in subcutaneous rats? *The Journal of Urol* 2012; 184(4S):e10.

28. Huffaker RK, Muir TW, Rao A et al: Histologic response of porcine collagen-coated and uncoated polypropylene grafts in a rabbit vaginal models. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198(582): 1-7.
29. Carinci F, Volinia S, Pezzetti F, Franciolo L, Tosi L, Piatelli A: Titanium cell interaction: analysis of gene expression profiling. *J Biomed Mater Res*. 2003; 66B: 341-346.
30. Grant DN, Benson J, Cozad MJ et al. Conjugation of gold nanoparticles to polypropylene mesh for enhance biocompatibility. *J Matter Sci*. 2011; 22: 2803-2812.
31. Andrew JG, Hoyland JA, Fremont AJ, Marsh DR. Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*. 1995; 16: 455-60.
32. Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schonberg J P, Hoffman J, Overdevest EP, Box HA, Van Zundert A: Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol*. 2006; 38(2): 174-187.
33. Klein CP, Wagner SC, Silva JB. Platelet-rich plasma: evaluation of centrifugation effect on platelet concentration and comparison of protocols.. *Braz J of Bioscience*. 2011; 9(4): 509-513.
34. Marx RE: Quantification of growth factor leves using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxilofac Surg*. 2000; 58(3): 300-301.
35. Marx RE: Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxilofac Surg*. 2004; 62(4): 489-496.
36. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezasa AI, Orive G, Andia I. Efectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res Appl Biomater*. 2008; 84(2): 415-421.
37. Cervellini V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spangholi LG, Orlandi A: Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009; 15(4): 625-634.
38. Kozakos K, Liras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M: The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury*. 2009; 40(8): 801-805.
39. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg*. 1986; 204: 322-30.
40. Steed DL, Goslen JB, Holloway GA, Malone JM, Bunt TJ, Webster MW. Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers. CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo. *Diab Care*. 1992; 15: 1598-604.
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; 8: 187-195.

42. Anuita E. Plasma rich growth factors: preliminary results of use in preparation of futures sites for implants. *Int Oral Maxillofac Surg.* 1999; 14: 529-51.
43. Taylor DW, Petrera M, Hendry M, 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; 0: 1-9.
44. Vendramin FS, Franco D, Schamall RF, Romero Franco T. Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in skin grafts in rabbits. *Rev. Bras. Cir. Plast.* 2010; 25: 4-10.
45. 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.
46. Taylor DW, Petrera M, Hendry M, 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; 0: 1-9.
47. Margolis DJ, Bartus C, Hoffstad O, Malay S, Berlin JA. Effectiveness of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005; 13: 531–536.
48. Zieren J, Zieren H, Jacobi CA et al. Prospective randomized study comparing laparoscopic and open tension-free inguinal hernia repair with Shouldice's operation. *Am J Surg.* 1998; 175: 330-333.
49. Einardson JI, Jonsdottir K, Mandle R. Use of autologous platelet gel in female pelvic organ prolapsed surgery: A Feasibility Study. *J Minim Invasive Gynecol.* 2009; 16(2): 204-207.
50. Macedo AP, et al. Getting protocol and Applications PRP clinics. In: Pontual MAB, Magini RS, et al. *Das pesquisas científicas à Clínica Odontológica.* São Paulo: Santos Editora Ltda; 2004. pp. 189-230.
51. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Wound healing. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2007; 20(1): 51-58.
52. Klinge U, Klosterhalfen B, Muller M, Schumpelick V. Foreign body reaction to meshes used for the repair of abdominal wall hernias. *Eur J Surg.* 1999; 165: 665–673.
53. Shankaran V, Weber DJ, Reed RL II, Luchette FA. A review of available prosthetics for ventral hernia repair. *Ann Surg.* 2011; 253: 16–26.
54. Delavary BM, W.M. van der Veer, et al. Macrophages in skin injury and repair. *Immunology.* 2011; 216(7): 753-62.
55. Eckes B, Zigrino P, Kessler D. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Bio.* 2000; 99(4): 352-332.

ANEXO



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.

Cumprе 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