

# ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO IMPLANTE DE MATRIZES DE COLÁGENO NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

**Filadelpho, André Luís**

Pós-Graduando do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP.

**Artoni, Silvana Martinez Baraldi**

Docente do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP.

**Orsi, Antonio Marcos**

Docente do IBB/UNESP, Botucatu, SP.

**Dias, Luis Gustavo Gosuen Gonçalves**

**Cabrini, Tatiana Monici**

**Bariani, Mario Henrique**

**Lot, Rômulo Francis Stangari**

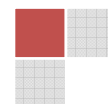
Docentes da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, Garça, SP.

## 1- INTRODUÇÃO

Ao que parece, um dos grandes desafios da cirurgia moderna, atualmente, é a substituição de tecidos do organismo com biocompatibilidade tecidual, que tem sido uma prática necessária no caso de perdas de estruturas anatômicas decorrentes de defeitos congênitos; seqüelas de trauma, ou injúria grave, e também em conseqüência da realização de cirurgias de reparo em Oncologia (Andrews, 1988; Filho *et al.*, 2004).

As substituições, implantes ou inclusão de tecidos de natureza biológica, ou de produtos sintéticos, ao nível cirúrgico, tem avançado ao longo dos anos recentes, e, principalmente, como decorrência do acervo de conhecimentos que originou a chamada Ciência dos Materiais e o seu desdobramento, posterior, na Engenharia de Materiais (Instituto Inovação, 2004).

O desdobramento, antes citado, foi muito importante por ter lançado os alicerces, de base, e o ulterior desenvolvimento da Engenharia Biomédica. Essa vem desenvolvendo, com sucesso, importantes materiais biocompatíveis (“biomateriais”, vide Fredel e Barra, 2004, para referência geral), visando-se, inclusive, a utilização destes materiais, ou produtos histocompatíveis, em Medicina Humana e em Medicina Veterinária.



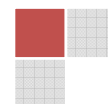
O conceito de “biomaterial”, segundo Boretos e Eden (1984), se refere a qualquer nova substância desenvolvida, exceto as drogas medicamentosas, ou se reporta, ainda, à elaboração de uma combinação estável de substâncias, com origem sintética ou natural. Essas devem poder ser usadas, durante qualquer período de tempo, em parte, ou “*in totum*”, sobre uma parte de um sistema orgânico, ou em parte de um segmento orgânico, os quais se trata ou se repara cirurgicamente.

Ademais, um biomaterial se configura num “produto” que possa substituir qualquer tecido; órgão, ou até mesmo beneficiar o ganho e re-equilíbrio de uma função orgânica, determinada, na parte somática do corpo ( Franke, 2003).

Biocompatibilidade, segundo Williams (1987), se refere à habilidade de um desempenho adequado, ou favorável, entre um material produzido para implante cirúrgico, ou para inclusão biológica, e a obtenção de uma resposta orgânica apropriada do hospedeiro, em termos de uma aplicação específica daquele material, segundo alguns autores citados (vide Franke, 2003, para referência geral).

Com a finalidade de se proceder implantes, e/ou inclusões, para reparo cirúrgico, muitos materiais foram utilizados, sendo tanto “produtos” sintéticos como materiais de natureza biológica (Marques, 1984). No Reino Unido (“UK, Commonwealth”), em 1937, iniciou-se a utilização de resinas sintéticas, tais como o polietileno e o metacrilato de metila, com objetivos de bio-implantação cirúrgica. Desde então, outros materiais foram desenvolvidos, tais como o silicone, o “poli-tetra-fluor-etileno”, o polietileno poroso e a poliamida, podendo ser veiculados em solução salina, ou em forma de gel (Marques *et al.*, 1989; Filho *et al.*, 2004).

Scales (1953), definira as características de um implante sintético ideal, as quais englobariam cerca de nove parâmetros, conforme segue: 1) não causar modificação física no tecido ou órgão hospedeiro; 2) ser quimicamente inerte; 3) não ser um material carcinogênico; 4) não causar reação alérgica, ou reação de corpo estranho; 5) ter a comprovada capacidade de resistência a forças mecânicas, tais como a tração e a tensão físicas a que se possa submeter a área do implante; 6) poder ser fabricado na forma, ou na conformação, desejadas (e, se possível, em escala compatível com a



demanda); 7) poder ser submetido à esterilização; 8) existir, ou estar disponível, em diferentes tamanhos e formatos, e, 9) não necessitar de reparo, após ser realizado o implante (Scales, 1953; Filho *et al.*, 2004).

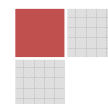
Logo, grandes esforços vêm sendo despendidos na busca de um material (um “produto” ou uma substância), e/ou de um conjunto de materiais, que desenvolvam reação inflamatória mínima, quando, cirurgicamente, implantados, num tecido hospedeiro determinado, o qual quer se tratar, ou reparar (Antell e Smith, 1991).

Assim sendo, foi sugerido, em relação ao emprego de materiais sintéticos de implantes, visando à utilização cirúrgica, que se obtivessem, de modo ideal, repostas inflamatórias agudas mínimas, assim como uma incorporação tecidual perfeita, ou adequada, a cujo conjunto pudesse se denominar de biocompatibilidade, e a ser consagrada pelo uso rotineiro e mediante aceitação universal (Nell, 1983).

Materiais biocompatíveis, e seguros, foram considerados aqueles que ao serem submetidos a testes biológicos, e também a testes mecânicos, não mostraram resultados, de reatividade histopatológica, ou apenas uma reatividade inflamatória mínima, em termos de bio-incorporação e de histocompatibilidade (Holmes, 1990; Filho *et al.*, 2004).

Por outro lado, tem sido referido que a segurança e a efetividade dos materiais utilizados, para proceder reparos cirúrgicos, necessariamente, deveria incluir o conhecimento histopatológico da interface material-tecido. Deve-se, ainda, levar em consideração a possibilidade de ocorrência de um processo inflamatório crônico e/ou de uma resposta granulomatosa, presentes “*in loco*” (Silver e Mass, 1994).

A última consideração exarada depõe favoravelmente ao objetivo, e à proposição, deste trabalho, quanto a analisar a histocompatibilidade, e possíveis decorrências histopatológicas “leves”, de implantes cirúrgicos de MLC (matriz liofilizada de colágeno, segundo Vulcani *et al.*, 2008), em tecido subcutâneo do dorso de ratos *Wistar*. Verificar, ademais, os seus possíveis reflexos, decorrentes da implantação, no compartimento fascial e/ou na hipoderme (tecido subcutâneo), dos ratos albinos utilizados experimentalmente.



Concernente ao implante de substitutos biológicos, de procedência animal, muita importância tem sido dada ao pericárdio bovino, utilizado principalmente na cirurgia cardiovascular, em consequência de sua alta resistência e da fácil aquisição deste material, segundo Bartek *et al.* (1974) e Filho *et al.* (2004).

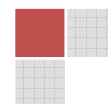
Ademais, outras membranas biológicas têm sido utilizadas, experimentalmente, ou na prática médica, tal como o centro tendinoso do diafragma de cão, objetivando a reparação de defeitos musculares em ratos *Wistar* (Brun *et al.*, 2004). Utilizaram-se, também, membranas da camada cortical óssea, desmineralizada e liofilizada, de bovino para implante subcutâneo em ratos (Yamatogi *et al.*, 2005); a cartilagem auricular conservada em glicerina a 98%, e, as matrizes de colágeno, previamente preparadas em soluções alcalinas, por exemplo, no reparo cirúrgico da parede abdominal de eqüinos (Vulcani *et al.*, 2008).

Quanto à utilização de matriz de colágeno liofilizada (Vulcani *et al.*, 2008), descreveram que o uso de matriz liofilizada de colágeno, no reparo cirúrgico da parede abdominal de eqüinos, após cirurgia, foi feita a partir do emprego do colágeno, presente em centros tendinosos diafragmáticos, previamente submetidos a soluções alcalinas por diferentes períodos de tempo.

O biomaterial então obtido, genericamente chamado de “matriz liofilizada de colágeno” (MLC), decorreu da submissão do colágeno a diferentes testes físico-químicos, para a seguir ser usado como implante cirúrgico. As amostras, aparentemente, ideais para implante foram aquelas tratadas em meio alcalino, durante 72 horas, e liofilizadas, utilizando-se, como implante eficaz, as amostras de MLC submetidas a uma solução aquosa de glicerina a 98%. Esse será o biomaterial utilizado, neste delineamento experimental proposto.

A aplicação de membranas biológicas (Brun *et al.*, 2004; Yamatogi *et al.*, 2005), como, por exemplo, o uso de um “fragmento” adequado de MLC (Vulcani *et al.*, 2008), tem sido útil no reparo cirúrgico, constituindo-se num achado valioso para a técnica cirúrgica, e, que aparenta ser inquestionável.

## 2- MATERIAL E MÉTODO



No presente trabalho foram utilizados, aproximadamente, 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da variedade *Wistar*, adultos, machos com pesos corpóreos variando entre 320 e 400 gramas. Estes roedores serão divididos em dois grupos experimentais Grupo 1 (G1): implantes de blocos de MLC; e Grupo 2 (GC): incisão do dorso até o nível do tecido subcutâneo (hipoderma), caracterizando o grupo controle.

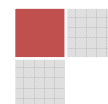
Os períodos de observação pós-operatória, cujos dados e resultados foram analisados, fixando-se os períodos de tempos, após as cirurgias, respectivamente, em 15, 30 e 45 dias de pós-operatório.

Nas fases que antecederam as cirurgias experimentais, bem como durante o período pós-operatório, que precedeu a eutanasia para observações e coletas de tecidos com o implante (MCL), “biocompatibilizado”, os ratos foram mantidos em cativeiro, isolados entre si, em ambiente adequado (Salas de Biotérios da FAMED e da UNESP), com a administração de alimentação sólida: ração Purina™ para roedores de laboratório, e água pura, ofertadas “*ad libitum*”.

Como procedimento inicial, os roedores foram submetidos à anestesia geral, por meio de inalação de halotano™. A assepsia da região do dorso torácico foi realizada com álcool iodado e procedeu-se uma cuidadosa tricotomia regional. Em seqüência, foi feita uma incisão longitudinal mediana adequada do dorso torácico, abaixo da borda caudal das duas escápulas, com posterior “divulsão” dos tecidos moles subjacentes, e, identificação da musculatura epaxial dorsal superficial.

Na conclusão dos tempos experimentais, os roedores foram eutanasiados com saturação anestésica de quetamina™, administrada por via intraperitoneal, e a seguir serão abertas as secções cirúrgicas que foram previamente suturadas, após a colocação dos implantes de MLC.

As suturas, “*in loco*”, foram feitas com o uso de fio de nylon - monofilamento 5.0, segundo metodologia preconizada para suturas de planos externos do corpo (Leonard, 1968). Neste momento, foi analisada a condição macroscópica da região implantada, eventualmente, com a realização de fotografias “*in situ*”.



Fragmentos de tecidos com a incorporação dos materiais incluídos, ou amostra “tissular” circunjacente às inclusões, foram coletados e fixados, em fixadores específicos para estudos de microscopia de luz (MO), quais sejam: solução fixadora de formalina<sup>TM</sup> neutra tamponada e/ou solução de Bouin. Decorridos os tempos de fixação histológica, os tecidos serão conduzidos para a rotina habitual de MO, com obtenção de cortes histológicos incluídos em parafina histológica<sup>TM</sup> e/ou em paraplast<sup>TM</sup>.

De todos os materiais, processados para MO, foram obtidos cortes histológicos de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espessura, que serão corados com HE e tricrômicos de Masson e de Mallory. Os cortes foram analisados e documentados em microscópio óptico de pesquisa Olympus BH-2<sup>®</sup> (Japão).

### 3- RESULTADOS

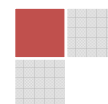
Ao analisar-se o material processado a MO verificou-se os seguintes resultados:

#### **G1**

- **15 DIAS** : Processo inflamatório crônico (ao exame microscópico nota-se infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (linfócitos, plasmócitos e histiócitos) intensa quantidade de células mononucleares ao redor de arteríolas e vênulas, moderada quantidade de células gigantes tipo corpo estranho associado à presença de tecido conjuntivo fibroso em fase de maturação e intensa proliferação fibroblástica periférica (tentativa de encapsulamento) (Fig 1).

- **30 DIAS**: Processo inflamatório crônico (ao exame microscópico nota-se infiltrado inflamatório mononuclear associado a proliferação de fibroblastos, neovascularização e início de maturação de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 2).

- **45 DIAS**: Processo inflamatório crônico (ao exame microscópico nota-se infiltrado inflamatório crônico com predomínio de células mononucleares, macrófagos, circunscritos por tecido conjuntivo fibroso (tecido de granulação =



cápsula) com necrose e calcificação central. Observa-se ainda proliferação de glândulas serosas (Fig. 3).

## **GC**

- **15, 30 e 45 DIAS:** Neste observou-se a evolução gradativa de um processo cicatricial, com tecido cicatricial maduro (ao exame microscópico nota-se fibras colágenas coradas em verde, raros vasos sanguíneos e fibroblastos (fibrócitos).

## **4- CONCLUSÃO**

Observou-se que no material processado do GRUPO 01, aos 15 dias a matriz liofilizada de colágeno encontrava-se com grandes dimensões quando comparada ao material coletado 30 e 45 dias de implantação.

A membrana biológica é absorvida à medida que os dias vão aumentando e nota-se dentro de algumas células gigantes do tipo Langerhans uma área mais clara sem afinidade pelos corantes (HE, tricrômicos de Masson e Mallory) que podem ser fragmentos da membrana biológica fagocitada, porém não notou-se a absorção total em nenhum dos animais dentro deste grupo.

Finalmente, não houve rejeição em nenhum dos animais do experimento e frente à análise histológica, fica evidenciada a biocompatibilidade da matriz liofilizada de colágeno no tecido subcutâneo destes animais.

## **5- FIGURAS**

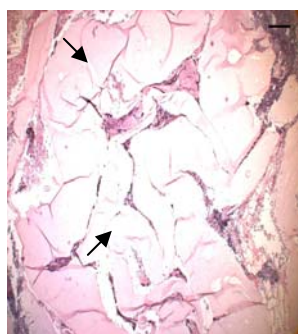


Fig.1- MLC (setas) 15 dias(15 x)

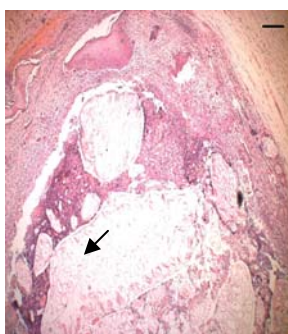


Fig.2- MLC (seta) 30 dias(15 x)

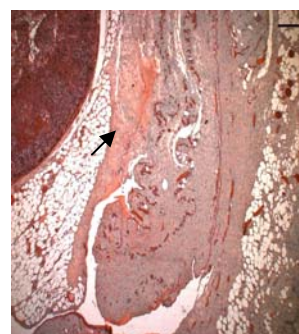
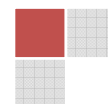


Fig.3- MLC (seta) 45 dias (20 x)



## 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrews, J.M. Biomateriais em cirurgia plástica. *In*: Mélega, J.M., Zanini A.S. e Psillacks, J.M. **Cirurgia plástica reparadora e estética**. 3<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica Científica; 1998. p.111-118.

Antell, D.E. e Smith, J.W. Implantation of materials. *In*: Smith, J.W., Aston S. e Smith G. (ed.). **Plastic surgery**. 4<sup>o</sup> ed. Boston: Little Brown. 1991. p.107-125.

Bartek, I.T. *et al.* Frame mounted tissue heart valves techniques of reconstruction. **Thorax** 1974. v. 29, p. 51-55.

Boretos, J. W. e Eden, M. (ed.) Contemporary biomaterials: material and host response: clinical application. *In*: **New Technology and legal aspects**. 1984. Park Ridge, NJ: Noyes Med. Publ. 1984.

Brun, M.V. *et al.* Solução hipersaturada de sal ou glicerina a 98%, como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2004. v. 34, p. 147-153.

Filho, D.H. *et al.* Estudo comparativo das reações teciduais ao implante de pericárdio bovino e a inclusão de “politetrafluoroetileno” expandido em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** 2004. v. 19, p. 131-135.

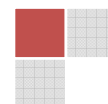
Franke, M. **Biomateriais**. Universidade Federal de Santa Catarina (ed.), Florianópolis, 2003.

Fredel, M.C. e Barra, G. **Tópicos especiais: biomateriais**, Universidade Federal de São Carlos (ed.), São Carlos, 2004.

Holmes, R.E. Alloplastic implants. *In*: McCarthy, J.C. (ed) **Plastic surgery**. 4<sup>o</sup> ed. Philadelphia: Saunders. 1990. p.698-731.

Instituto Inovação: **“Da pedra lascada aos nanomateriais”**. Belo Horizonte, Instituto Inovação (ed.), 2004.

Leonard, E.P. **Fundamentals of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 1968. 269p.





Marques, A.F. **Pericárdio bovino na reparação da parede abdominal de cães** (Tese – Mestrado). Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. 1984.

Marques, A.F. *et al.* Biomateriais na substituição de tecidos moles. **Acta Cirúrgica Brasileira** 1989. v. 4, p. 158-167.

Nell, B. Implants of gore-tex. **Archives of Otorhinolaryngology** 1983. v.109, p. 427-433.

Scales, J. Tissue reaction to synthetic materials. **Proceedings of the Royal Society of Medicine** 1953. p. 466-647.

Silver, F.H. e Mass, C.S. Biology of synthetic facial implant materials. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, New York, 1994. v. 2, p.241-253.

Vulcani, V. A . S. *et al.* Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de eqüinos. 2008. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 778-785.

Yamatogi, R.S. *et al.* Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina, implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2005. v. 35, p.837-842.

