

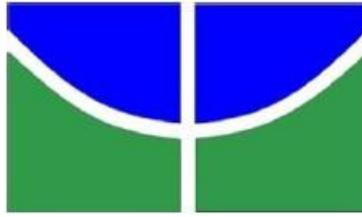
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

COMPARAÇÃO ENTRE AS HISTERORRAFIAS COM FIOS DE SUTURA DOS TIPOS CATEGUTE E QUITOSANA: MACROSCÓPICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

LÚCIO NEVES HUAIXAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2013



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

COMPARAÇÃO ENTRE AS HISTERORRAFIAS COM FIOS DE SUTURA DOS TIPOS CATEGUTE E QUITOSANA: MACROSCÓPICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

LÚCIO NEVES HUAIXAN

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 087/2013

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO/2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

COMPARAÇÃO ENTRE AS HISTERORRAFIAS COM FIOS DE SUTURA DOS TIPOS CATEGUTE E
QUITOSANA: MACROSCÓPICA, HISTOQUÍMICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

LÚCIO NEVES HUAIXAN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL

APROVADO POR:


EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, DOUTOR (UNB)


JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, DOUTOR (UNB)


VALENTIM ARABICANO GHELLER, DOUTOR (UFMG)

BRASÍLIA/DF, 13 DE DEZEMBRO DE 2013

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

HUAIXAN, L.N. **Comparação entre as histerorrafia com fios de sutura dos tipos categute e quitosana: macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2013, 20p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Huaixan, Lúcio Neves

Comparação entre as histerorrafias com fios de sutura dos tipos categute e quitosana: macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica. /Lúcio Neves Huaixan
Orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima.
Brasília, 2013. 20p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2013.

1. Ovino. 2. Cesariana. 3. Biomateriais. 4. Laparotomia vídeo assistida. 5. Colágeno. I. Lima, E.M.M. II. Doutor

Agris/FAO

É com amor que dedico este trabalho aos animais

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por guiar meus passos e me dar sustentação cada dia da minha vida.

Aos meus pais Queid e Marilda, por tudo que fizeram por mim até hoje, se cheguei até aqui é por ter vocês como exemplo de vida.

As minhas irmãs Sara e Marcela, pelo amor que concedem a mim e pela ajuda e conselhos nos momentos de dificuldade.

As minhas tias Izabel e Malvina, por tanto carinho e por me mostrarem sempre, que a vida pode ser tão simples, amo vocês.

A minha mulher Silvana, eterna companheira, por toda ajuda e suporte emocional, sem você não teria conseguido.

Ao Doutor Rivelino Montenegro, da Medovent GmbH (Mainz, Alemanha), pela confecção dos fios de quitosana para caráter experimental.

Ao Hospital Veterinário de Grandes Animais da Universidade de Brasília e aos animais que lá estiveram, no período em que lá trabalhei, me proporcionando tanto aprendizado.

Aos estagiários Janiny e André Leonardo, pela ajuda durante o experimento e na confecção da dissertação.

A Roberta Godoy, pela ajuda na aquisição dos fios e por tudo que fez por mim no período em que estivemos juntos na minha caminhada em Brasília. Devo toda a minha vida em Brasília a você. Você acreditou em mim.

Aos professores José Renato e Fábio Ximenes, pela ajuda durante o experimento, pelos conselhos, por tanto aprendizado e tudo mais que fizeram por mim nestes quatro anos de Brasília e, sobretudo pela amizade.

Ao meu orientador Eduardo Maurício Mendes de Lima, por ter acreditado em mim, pela confiança, pela pronta disposição em ajudar, pelos conselhos, pela sinceridade, pelo caráter, pela paciência e por tanta ajuda na elaboração deste trabalho. Só lamento por uma coisa, não ter te conhecido antes. Obrigado por tudo.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABSTRACT.....	1
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
MATERIAL E MÉTODOS.....	2
RESULTADOS.....	4
DISCUSSÃO.....	8
CONCLUSÃO.....	10
REFERÊNCIAS.....	10

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
Fig.	Figura
h	Horas
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Logaritmo negativo da atividade de íons de hidrogênio
UI	Unidades internacionais
VEGF-A	Fator de crescimento vascular endotelial específico para angiogênese
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Imagem laparoscópica indicando a presença de aderência da área de rafia, com categute, com o omento. Aderência da área de rafia com categute com o corno contralateral.	4
Figura 2	Fotomicrografia (Picrossirius red) da disposição dos colágenos tipo III e I em útero de ovelhas pós rafia. Área controle, área de rafia com categute, e área de rafia com quitosana. A cor verde representa fibras de colágeno do tipo III e vermelha fibras de colágeno do tipo I.	5
Figura 3	Fotomicrografia da disposição de tecido conjuntivo (Tricrômico de Masson) em útero de ovelhas pós rafia. Área controle, área de rafia com categute e área de rafia com quitosana.	6
Figura 4	Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-A (Imunohistoquímica) e de tecido vascular (Hematoxilina – Eosina) em útero de ovelhas pós rafia. Área controle, área de rafia com categute e área de rafia com quitosana.	7
Figura 5	Gráfico representando média e erro padrão da média dos valores obtidos dos grupos controle, categute e quitosana, n=7, referentes ao percentual de colágeno tipo III, colágeno tipo I, tecido conjuntivo, VEGF-A e vasos sanguíneos.	8

Comparação entre as histerorrafias com fios de sutura dos tipos catgut e quitosana: macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica¹

Lúcio N. Huaixan², Silvana S.B. Arruda², André Santos-Leonardo², Janiny C. Viana², Eduardo M.M. Lima^{2*}

ABSTRACT.- Huaixan L.N., Arruda S.S.B., Santos-Leonardo A., Viana J.C. & Lima E.M.M. 2013 [Comparison between hysterorrhaphy with sutures of the types catgut and chitosan: macroscopic, histochemical and immunohistochemical.] Comparação entre as histerorrafias com fios de sutura dos tipos catgut e quitosana: macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UNB), ICC Sul, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70760-701, Brazil. E-mail: limaemm@unb.br.

The occurrence of dystocia in ovine is arising of unusual events that alter the physiology of eutocic parturition. The cesarean section is a surgical procedure performed frequently in this specie for resolution of these interurrences, however the techniques of hysterorrhaphy, even as the material used, constitutes a very important step, arousing the interest in search for materials with ideal qualities. The chitosan proves to be interesting, since it is a biomaterial, with favorable properties and applications in healing. The aim of this study was to compare the quality of the healing process in the areas of hysterorrhaphy with sutures of the types catgut and chitosan by evaluating macroscopic, histochemical and immunohistochemical. Were used seven healthy ewes, Santa Inês breed, that were submitted to surgical technique of video-assisted laparotomy followed by laparotomy. After exteriorization of the uterus, was performed hysterotomy with subsequent hysterorrhaphy, in both horns, with chitosan and catgut. The macroscopic evaluation and biopsies of hysterorrhaphy areas and control area were performed after 30 days. Adhesions were found in five animals of the catgut group and none in the chitosan group. Was observed statistical difference with increase of collagen type III and connective tissue in the chitosan group when compared with control and catgut, was also observed a greater presence of blood vessels in the control group when compared to catgut and chitosan. In quantification of collagen type I and VEGF-A, was not observed statistical difference between the groups. The chitosan suture promoted preventive effect in the formation of postoperative adhesions in the areas of hysterorrhaphy, with increased deposition of collagen type III in the tissue repair process and giving better quality scar when compared to catgut.

INDEX TERMS: Ovine, video-assisted laparotomy, biomaterials, caesarean, collagen.

RESUMO.- A ocorrência de distocia em ovinos é decorrente de eventos inusitados que alteram a fisiologia do parto eutócico. A cesariana é um procedimento cirúrgico realizado com frequência nesta espécie para resolução destas intercorrências, contudo as técnicas de histerorrafia, bem como o material empregado, constituem um passo muito importante, despertando o interesse na busca de materiais com qualidades ideais. A quitosana revela-se interessante, pois é um biomaterial, com propriedades e aplicações favoráveis a cicatrização. O objetivo deste trabalho foi comparar a qualidade do processo cicatricial formada nas áreas de histerorrafia com fios de sutura do tipo catgut e quitosana, através de avaliação macroscópica, histoquímica e imuno-histoquímica. Foram utilizados sete ovinos hípidos, da raça Santa Inês que foram submetidos à técnica cirúrgica de laparotomia vídeo assistida seguida de laparotomia. Após exteriorização do útero, foi realizada histerotomia com posterior histerorrafia, em ambos os cornos, com catgut e quitosana. A avaliação macroscópica e as biópsias das áreas de histerorrafia e área controle foram realizadas após 30 dias. Foram encontradas aderências em cinco animais do grupo catgut e nenhuma no grupo quitosana. Foi observada diferença estatística com aumento de colágeno do tipo III e tecido conjuntivo no grupo quitosana quando comparado ao controle e catgut, também foi observada maior presença de vasos sanguíneos no grupo controle em relação ao catgut e quitosana. Da quantificação de colágeno do tipo I e VEGF-A, não foi observada diferença estatística entre os grupos. O fio de quitosana promoveu efeito preventivo no processo de formação de aderências pós-cirúrgicas das áreas de histerorrafia, com aumento da deposição de colágeno do tipo III no processo de reparação tecidual e conferindo melhor qualidade cicatricial, quando comparado ao catgut.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ovino, laparotomia vídeo assistida, biomateriais, cesariana, colágeno.

¹ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

² Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UNB), ICC Ala Sul, Campus Darcy Ribeiro, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70760-701, Brasil. *Autor para correspondência: limaemm@unb.br

INTRODUÇÃO

A cesariana é um procedimento cirúrgico antigo e bastante realizado, no entanto, as técnicas empregadas ainda são motivos de discussões e estudos, principalmente no que se refere à histerorrafia. A síntese constitui um passo muito importante no procedimento cirúrgico, despertando interesse dos pesquisadores e fabricantes na busca de materiais com qualidades ideais, assim como, na melhoria das técnicas operatórias utilizadas para obtenção de melhor qualidade cicatricial (Greenberg et al. 2011).

O processo de reparação tecidual é caracterizado, entre outros eventos, pela cascata inflamatória com eventos celulares que possuem funções importantes. O fibrinogênio está diretamente envolvido na inflamação promovendo a matriz para migração de células inflamatórias, fibroblastos e células endoteliais, além de ser precursor de fibrina. No entanto, em ovinos e outros ruminantes, a fibrinogênese é particular e ocorre de maneira mais acentuada, o que facilita a formação de aderências quando comparado a outras espécies (Murata et al. 2004). Portanto, o material de sutura deve apresentar a menor reação inflamatória possível, ser capaz de manter sua força tênsil até que a cicatrização da ferida cirúrgica esteja completa, restabelecendo a funcionalidade do órgão. Devido a fatores como o trauma pela inserção da agulha, isquemia por tensão, reação do tecido ao material empregado, autólise tecidual e fatores inerentes às propriedades físico-químicas que compõe os fios de sutura, o material de sutura altera o processo normal de cicatrização. (Greenberg & Clark 2009). Dessa forma, as propriedades de um fio de sutura são extremamente importantes, e sua escolha deve ser feita sempre visando o tipo de órgão que sofrerá a síntese

Os biomateriais a base de quitosana constituem uma classe emergente, com propriedades usualmente aplicáveis em vários campos biomédicos. O aumento do interesse da quitosana tem gerado oportunidades de produção de biomateriais especializados, principalmente com modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos (Aranaz et al. 2009).

O objetivo deste trabalho foi comparar a qualidade do processo cicatricial em útero de ovelhas submetidas à histerorrafia com fios de sutura do tipo catagute ou de quitosana, através de avaliação macroscópica da presença ou ausência de cicatrização completa, deiscência, absorção das suturas, aderências e histoquimicamente e imuno-histoquimicamente pela quantificação de colágenos dos tipos III e I, tecido conjuntivo, VEGF-A e vasos sanguíneos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sete ovinos fêmeas, da raça Santa Inês, uníparas, com idade aproximada de três anos. A hígidez foi confirmada a partir da realização de exame clínico geral e específico pela avaliação ultrassonográfica (Aloka SSD-500, probe linear UST-588U-5, Tokyo, Japão) dos órgãos genitais. Os animais permaneceram estabulados em baía de 100m², com alimentação, sal mineral e água ad libidum. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Brasília (#110687/2012).

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 36 horas e hídrico de 24 horas. Foi realizada tricotomia de toda a região abdominal, sedação com detomidina 1% (0,01mg/kg IV) e morfina 1% (0,1mg/kg IM). Dez minutos após, os animais foram posicionadas em decúbito dorsal com inclinação de 45° (*Trendelenburg negativo*) em maca cirúrgica específica para ovinos. Foi realizada antisepsia da região abdominal com iodopolividona degermante 10%, iodopolividona tópico 10% e álcool 70%. Para anestesia local dos pontos de trocaterização e incisão foi utilizada lidocaína 2%. Imediatamente após o início do procedimento cirúrgico foi administrado escopolamina 2% (0,1mg/kg IV).

Os animais foram submetidos à laparotomia videoassistida (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, Veterinary video câmera III, 692360 20) seguida de laparotomia, para realização de histerotomia e histerorrafia em ambos cornos uterinos. Foi realizada uma incisão cutânea de aproximadamente 0,5cm de comprimento, estando afastada cerca de 5 a 10 cm cranialmente ao úbere e lateralmente à esquerda da linha alba. Nesta incisão foi introduzido trocáter (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, Yellow, 7mm de diâmetro, 10,5cm de comprimento, com válvula multifuncional, válvula para insuflação, mandril piramidal, 30160MP), estabelecendo pneumoperitônio com CO₂, através deste, foi introduzida uma ótica de versão curta (Hopkins[®], Baltimore, Maryland, Estados Unidos da América, II, 10mm de diâmetro e 31cm de comprimento, color code: red) oblíqua de 30° com cabo de fibra óptica (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, 1,80m, 69495 NL) conectado a uma fonte de luz (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, Cold Light Fountain, Halogen 250 twin, 201133 20), e, acoplada a ótica, empregou-se câmera Karl Storz Telecam[®] (Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, 38mm, 20200043) para projeção das imagens laparoscópicas em monitor (Samsung[®], Seul, Coréia do Sul, SyncMaster 2033M, LCD, 10000:1 DC). Em uma segunda incisão, na parede lateral direita, lateralmente a linha alba, tomando como base as mesmas estruturas anatômicas, nesta incisão, foi introduzido o segundo trocáter (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, Black, 6mm de diâmetro, 10,5cm de comprimento, com válvula multifuncional, válvula para insuflação, mandril piramidal, 30160MP), para a introdução de um bastão de manipulação (Karl Storz[®], Tuttlingen, Baden-Württemberg,

Alemanha, 5mm de diâmetro, 36cm de comprimento, 26175T), para auxiliar na manipulação uterina. Após a localização do útero, foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm de comprimento, paralela e cranial ao segundo trocáter, por onde foi introduzida uma pinça (Karl Storz®, Tuttlingen, Baden-Württemberg, Alemanha, Clickline Babcock grasping, com dentes múltiplos fenestrados, atraumática) para contenção do útero e posterior exteriorização. Em ambos os cornos uterinos foi realizado uma incisão de 4cm de comprimento, seccionando o peritônio, o miométrio e o endométrio. Imediatamente após, foi realizada a histerorrafia com padrão de sutura do tipo Schmieden, sendo o corno uterino direito submetido à refia com fio do tipo categut (PolySuture®, São Sebastião do Paraíso, Minas Gerais, Brasil; simples 2-0; CS23120, monofilamento) e o corno uterino esquerdo submetido à refia com fio de quitosana (MED VENT GmbH®, Mainz, Rhineland-Palatinate, Alemanha; 2-0; 2013-10, monofilamento). Em seguida o útero foi lavado com solução heparinizada (Hepamax®, Blausiegel Ind. e Com. Ltda., Cotia, São Paulo, Brasil; 15UI/ml) para retirada do sangue, evitando assim, as aderências, e reposicionado na cavidade abdominal.

As rafias das regiões de trocaterização foram realizadas através de padrão de sutura do tipo Wolf somente na pele. Já a refia do ponto de exteriorização do útero, por sua vez, teve como base quatro planos de sutura com padrão Sultan (peritônio; porção muscular do músculo reto do abdome e às aponeuroses dos músculos oblíquo interno e externo do abdome). Por fim, sutura de pele com padrão Wolf e fio nylon 0 (Bioline®, Anápolis, Goiás, Brasil; NLOCT30, monofilamento).

A recuperação anestésica do procedimento cirúrgico ocorreu em sala com piso de borracha e paredes acolchoadas, em seguida, os animais foram soltos em baias individuais de 4m², com alimentação, sal mineral e água ad libidum. A antibioticoterapia profilática foi instituída com penicilina benzatina (40.000UI/kg, a cada 48 horas, 3 doses, IM). Também foi empregado antiinflamatório não-esteroidal flunixin meglumine (2,2mg/kg, a cada 24 horas, 3 doses, IV). Diariamente foi realizado exame clínico geral e curativo das feridas cirúrgicas com permanganato de potássio 10% e repelente (Bactrovet®, König, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina). A remoção da sutura de pele se deu dez dias após o procedimento cirúrgico.

Biópsias

Ao completarem 30 dias de pós-operatório, durante a fase de cicatrização caracterizada por processo de remodelamento, quando a qualidade do processo cicatricial pode ser avaliada (Young & McNaught 2011; Sinno & Prakash, 2013), os animais foram resubmetidos a laparotomia vídeo assistida, empregando a mesma técnica supracitada, possibilitando a avaliação macroscópica da cavidade abdominal e do útero, assim como, sua sintopia. Foram realizadas biópsias de ambos os cornos uterinos, de aproximadamente 1cm², das regiões de refia uterina (porção central da sutura) e de uma área contígua, não operada, na extremidade do corno uterino, tomando esta, como controle para avaliação histomorfométrica dos processos de cicatrização. A região de biópsia no útero foi suturada e o mesmo foi reposicionado, posteriormente, a parede abdominal foi suturada, finalizando assim o procedimento cirúrgico.

Processamento das amostras

Após a coleta, os fragmentos foram lavados com solução de cloreto de sódio a 0,9% para remoção do sangue, fixados em solução aquosa a 10% de formaldeído por cerca de 48 horas. Então, foram incluídos em parafina, seccionados com 4µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina, Picrossirius red ou Tricrômico de Masson, visando a evidenciação de macrófagos, linfócitos, vasos, glândulas, colágeno I e III e tecido conjuntivo.

Imuno-histoquímica

Para realização da imuno-histoquímica os cortes confeccionados foram desparafinados e hidratados. A recuperação antigênica foi realizada com solução de tampão citrato (pH=6, 60°C) e, posteriormente, deu-se o bloqueio de peroxidase endógena com solução 4% de peróxido de hidrogênio. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de 1% de albumina sérica bovina (BSA). Esses fragmentos foram incubados com os anticorpos primários VEGF-A (1:500; M7273, DakoCytomation, Glostrup, Copenhaga, Dinamarca), com posterior incubação por 12h em câmara úmida a 4°C, seguido por incubação com anticorpo secundário (Polímero; P0163, DakoCytomation, Glostrup, Copenhaga, Dinamarca). Em seguida os fragmentos nas lâminas foram lavados em com PBS, revelados com diaminobenzidina e contracorados com hematoxilina.

Análise de imagens

As lâminas dos fragmentos de corno uterino foram analisadas através de microscópio óptico (BX51 Olympus®, Tokyo, Japão) acoplado ao programa de captura e análise de imagens (ProgRes® Capture Pro 2.5, Jena, Turíngia, Alemanha), foram obtidas fotomicrografias (TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) de quinze campos aleatórios de cada fragmento, sendo que para a diferenciação das fibras de colágeno utilizou-se microscopia com luz polarizada. Para a quantificação do tecido conjuntivo e dos tipos de

colágeno foi empregado programa de análise de imagem (Image- Pro Plus.6.0[®], Rockville, Maryland, Estados Unidos da América). A quantificação da área ocupada pelos macrófagos, linfócitos e vasos foi realizada com auxílio do software de análise de imagens STEPanizer[®] (<http://stepanizer.com/>).

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média e erro padrão da média através de estatística descritiva, seguida pela aplicação do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Friedmann através do programa GraphPad Prism[®] 6. Foi considerado $p \leq 0,05$, como estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Macroscopicamente observou-se completa cicatrização, ausência de deiscência e absorção completa dos fios de sutura, tanto os do tipo categute, quanto os de quitosana. Porém, foi observada a presença de aderências em cinco animais, todas elas em áreas cuja sutura foi realizada com fios do tipo categute (Figura 1), sendo que em três animais estas aderências ocorreram no corno contralateral, outra na base do corno ipsilateral e uma com o omento. Já nas áreas de rafia uterina com fios do tipo quitosana não foram observadas aderências.

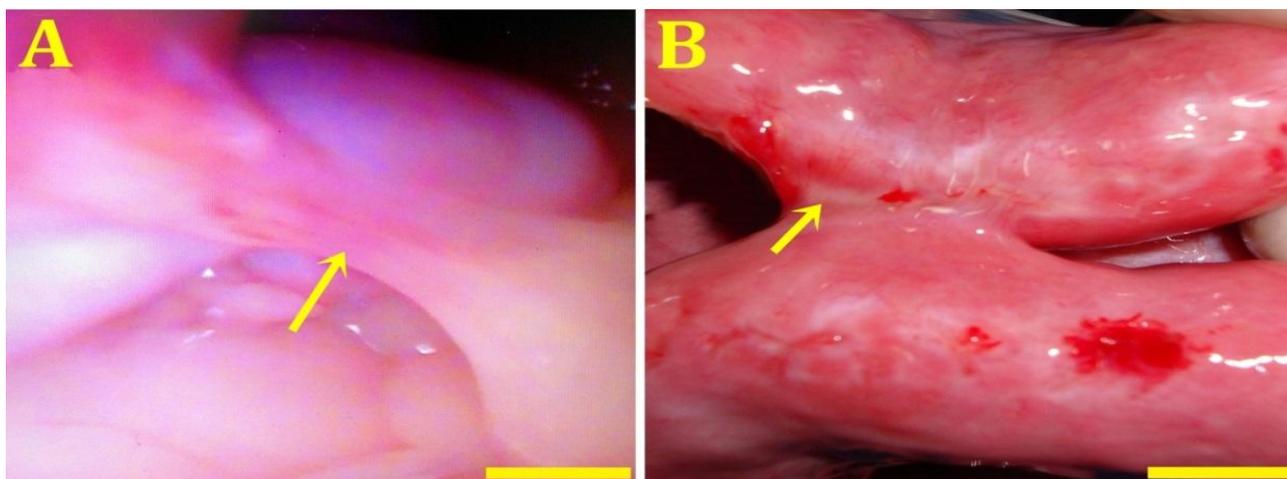


Fig.1. Imagem laparoscópica indicando a presença de aderência (seta) da área de rafia, com categute, com o omento (A). Aderência (seta) da área de rafia com categute com o corno contralateral (B). Escala: 10mm.

A quantificação de macrófagos e linfócitos revelou ausência de diferença estatística entre os grupos estudados para macrófagos e predomínio de linfócitos no grupo categute quando comparado ao grupo controle (Figura 5).

O colágeno do tipo III apresentou maior expressão no grupo quitosana (Figura 2 e 5), com ausência de diferença estatística entre os grupos controle e categute (Figura 5). O colágeno do tipo I, demonstrou ausência de diferença estatística entre os três grupos avaliados (Figura 5), conforme ilustrado entre os grupos da Figura 2.

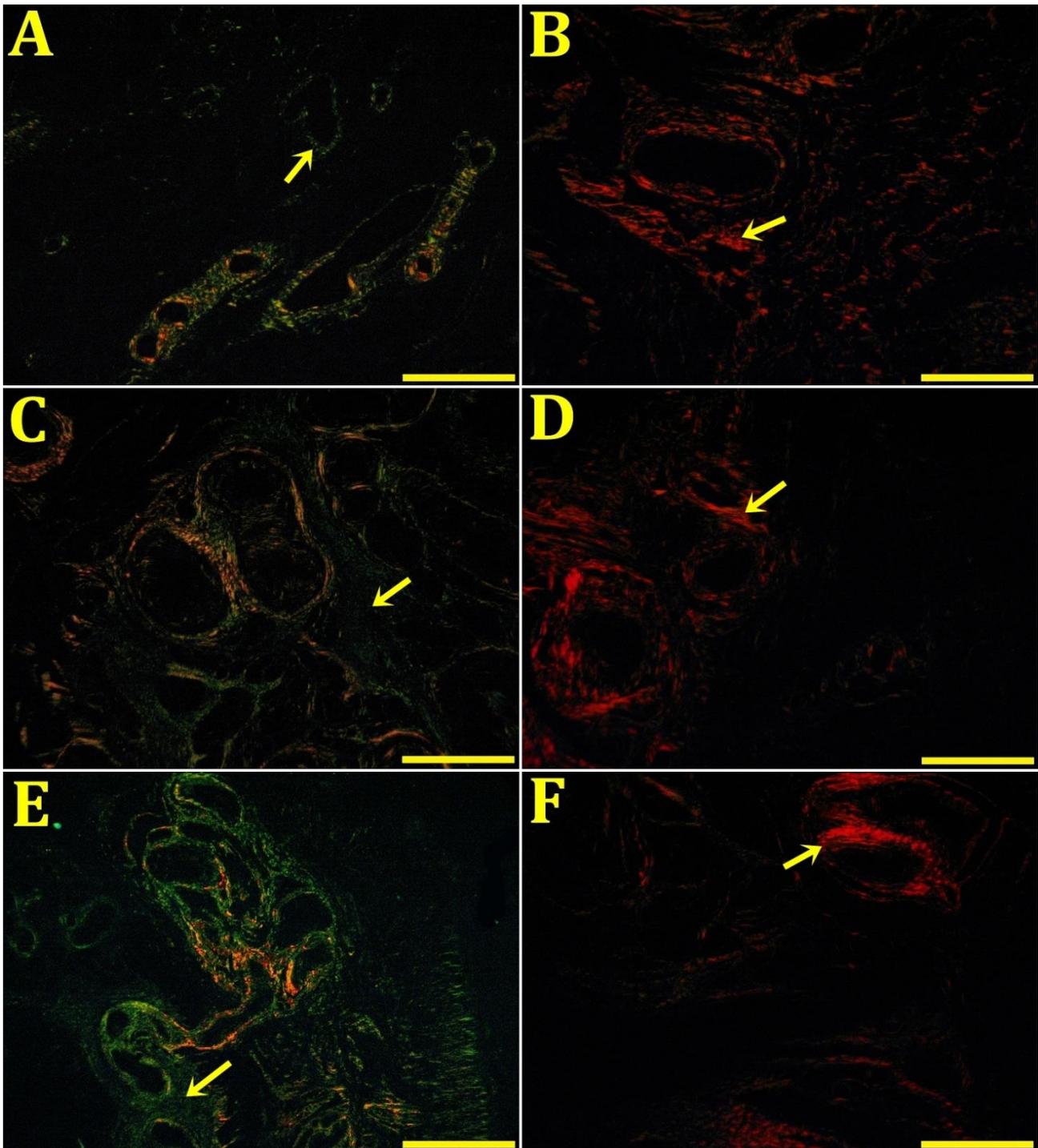


Fig.2. Fotomicrografia (Picrosirius red) da disposição dos colágenos tipo III e I em útero de ovelhas pós rafia. A e B – área controle, C e D – área de rafia com categute, E e F – área de rafia com quitosana. A cor verde representa fibras de colágeno do tipo III (seta), em proporção maior na área de rafia com quitosana. A cor vermelha representa fibras de colágeno do tipo I (seta), em proporção semelhante nos três grupos. Escala: 60µm

Na avaliação de tecido conjuntivo não houve diferença estatística quando comparado os grupos controle e categute. Comparando os grupos quitosana e categute, houve diferença estatística, e foi observado maior proporção de tecido conjuntivo nos animais do grupo quitosana (Figura 5). Na Figura 3 foram observadas essas diferentes quantidades de tecido conjuntivo, tomando como base coloração azul expressa pela adoção do Tricrômico de Masson, nos diferentes grupos avaliados.

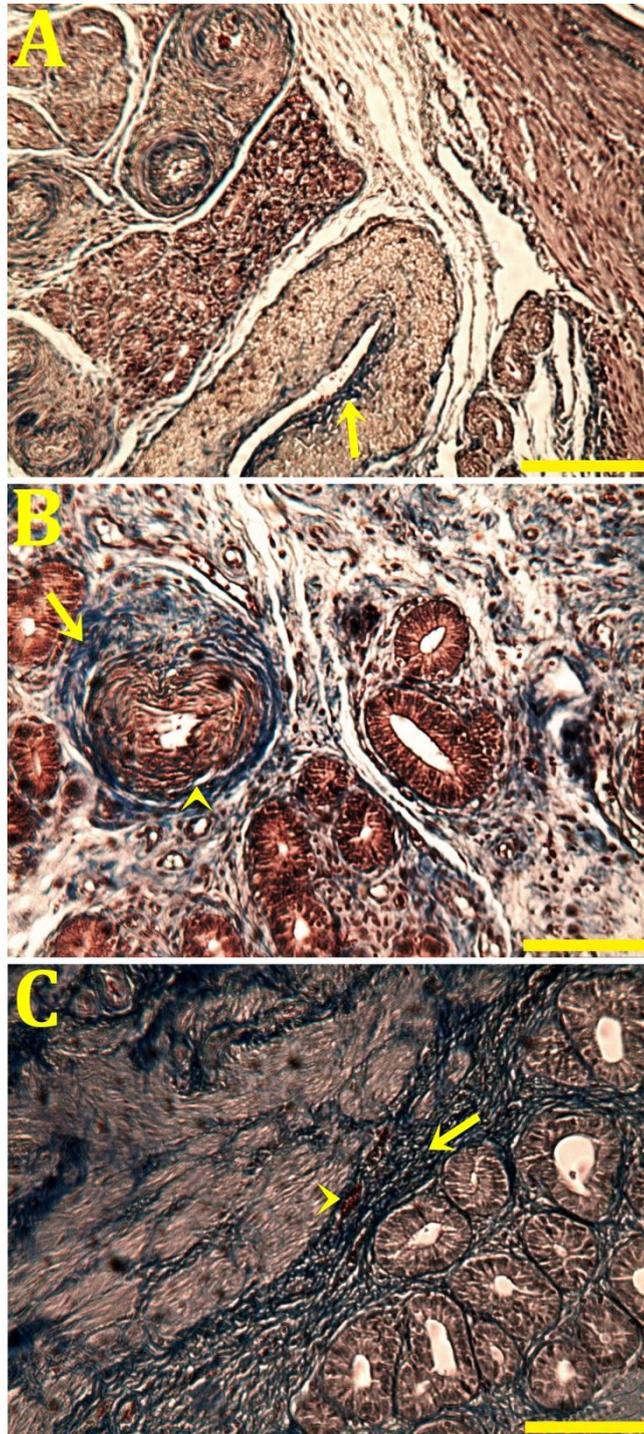


Fig.3. Fotomicrografia da disposição de tecidos conjuntivo (Tricrômico de Masson) em útero de ovelhas pós rafia. A - área controle, B - área de rafia com catégute, C - área de rafia com quitosana. Seta curta indica a presença de vasos sanguíneos e seta longa tecido conjuntivo. A cor azul representa áreas de tecido conjuntivo, em maior proporção na área de rafia com quitosana. Escala: 30 μ m.

Os resultados referentes ao VEGF-A, indicaram ausência de diferença estatística entre os grupos (Figura 5). Quando foi possível visualizar os tecidos onde houve a expressão de VEGF-A através da marcação, cor amarela nos diferentes grupos conforme a Figura 4. Dos vasos sanguíneos, por sua vez, foi possível observar maior quantidade destas estruturas nos úteros dos animais do grupo controle (Figura 4 e 5). Não houve diferença estatística entre os grupos catégute e quitosana (Figura 5).

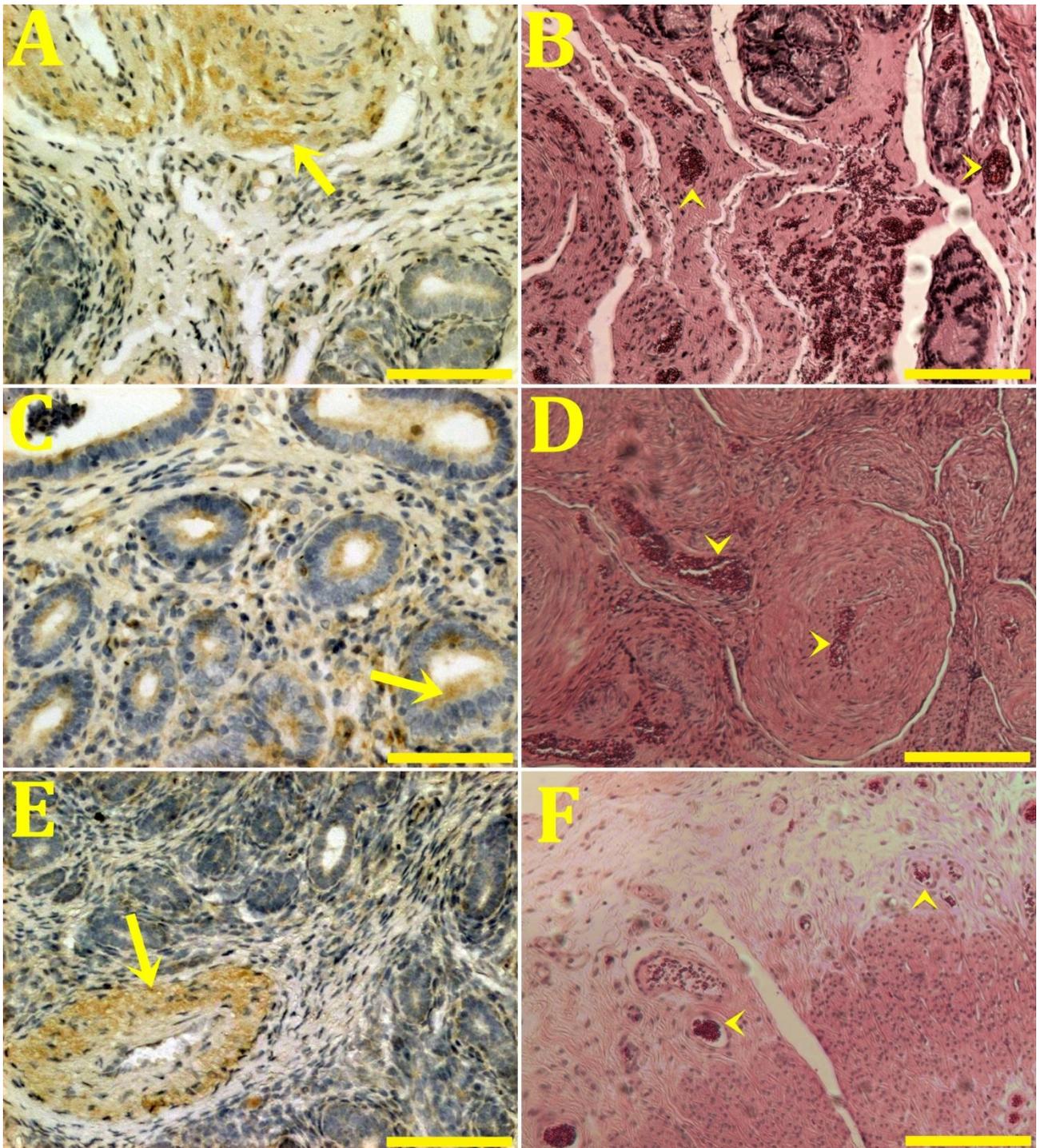


Fig.4. Fotomicrografia da localização da proteína VEGF-A (Imuno-histoquímica: A, C e E) e de tecido vascular (Hematoxilina – Eosina: B, D e F) em útero de ovelhas pós rafia. A e B – área controle, C e D área de rafia com categute, E e F – área de rafia com quitosana. Seta curta indica a presença de vasos sanguíneos, em proporção maior no grupo controle e seta longa áreas de expressão de VEGF-A, representadas pela coloração amarela em proporção semelhante nos três grupos Escala: 30µm.

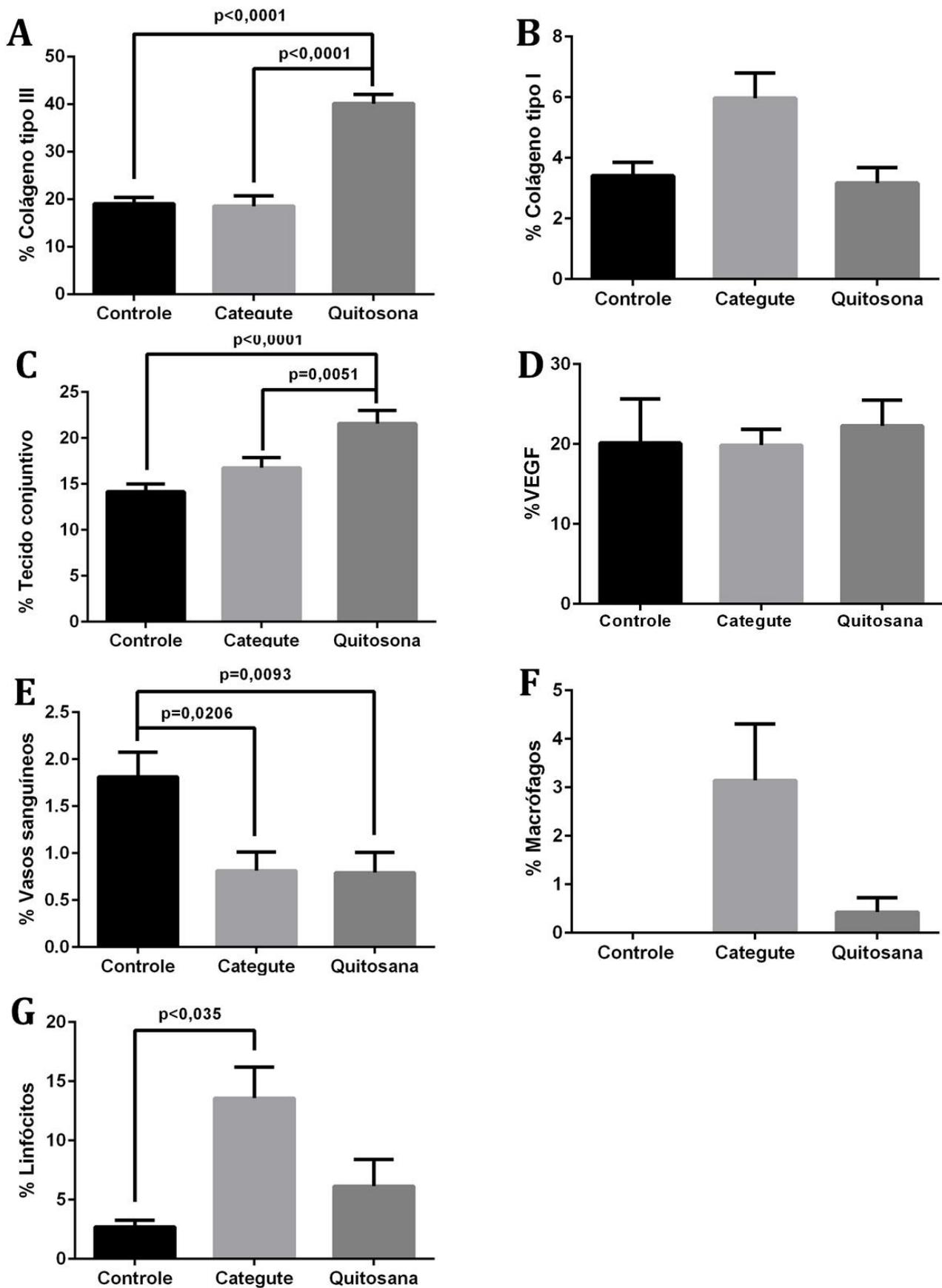


Fig.5. Média e erro padrão da média dos valores obtidos dos grupos controle, categute e quitosana, n=7, referentes ao percentual de colágeno tipo III (A), colágeno tipo I (B), tecido conjuntivo (C), VEGF-A (D), vasos sanguíneos (E), macrófagos (F) e linfócitos (G). A presença de chave entre as colunas representa diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os valores.

DISCUSSÃO

A cicatrização tecidual é um processo biológico complexo, que consiste em uma coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos interagindo entre si, quando o organismo busca a restauração das características fisiológicas do tecido na tentativa de reestabelecer sua função. Estes eventos ocorrem em três fases, inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Young & McNaught 2011) e a duração destas é bem determinada apesar de ocorrer alguma sobreposição. A resposta inflamatória é a fase inicial e geralmente ocorre em até 48 horas (Sinno & Prakash 2013), quando se inicia a fase proliferativa persistindo até duas semanas com a formação de tecido de granulação e consequente acúmulo de maiores quantidades de colágeno (Campos et al. 2007). A terceira e última etapa envolvida é a fase de remodelamento, que pode durar até dois anos e responde pelo desenvolvimento do epitélio normal e maturação da cicatriz (Young & McNaught 2011). A fisiologia da cicatrização aplica-se de maneira equivalente para órgãos com arranjos estruturais semelhantes, isto é, útero, intestino, peritônio, entre outros. No entanto existem vários fatores que podem influenciar diretamente e acarretar complicações como deiscência de pontos e aderências (Young & McNaught 2011), dentre eles, manipulação tecidual, tipo de fio de sutura, biomaterial, forma de apresentação do mesmo e técnica de rafia empregada (Greenberg et al. 2011).

A inflamação envolvida no processo de cicatrização persiste enquanto há necessidade, através da ação de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e outros fatores inflamatórios, que garantem a remoção de debris e materiais estranhos do tecido. No entanto a manutenção prolongada da resposta inflamatória pode causar dentre outras complicações, a formação de aderências. O fio de sutura atuou como corpo estranho, sendo que o grau de reação tecidual depende da natureza das características químicas e físicas dos vários tipos de materiais de sutura (Greenberg & Clark 2009). O categute é um polímero biodegradável, e a natureza de sua composição e processamento faz desse material uma alternativa pouco ideal atualmente, principalmente pela inconsistente força tênsil de retenção e características ruins de manuseio (Greenberg et al. 2011). A presença de aderências em cinco animais no grupo submetido à histerorrafia com categute foi atribuída à reação inflamatória inerente ao tipo de fio de sutura, coincidindo com o observado na sutura da vesícula urinária de ratos (Kosan et al. 2008). O predomínio de linfócitos no grupo categute, em relação ao grupo controle, pode ser entendido devido ao fato de que estas células em processo inflamatório normal tem tempo de ação de até 120 horas (Young & McNaught 2011). Justificando a formação de aderências que estiveram presentes ao longo da fase de remodelamento, originadas em eventos inflamatórios com formação de exsudato, rico em fibrinogênio, no início da fase proliferativa (Akinrinmade & Lawal 2010).

Considerando a manipulação tecidual como fator determinante ao estímulo de aderências, a intervenção cirúrgica através de laparotomia vídeo assistida também exige certa modificação e alteração da estática visceral, porém é menos invasiva e traumática (Einarsson et al. 2012). Sobretudo deve ser enfatizado o menor efeito da mesma sobre o estímulo à reação inflamatória tecidual e consequente formação de aderências, em contraste ao emprego da laparotomia convencional. Todos os animais, neste estudo, foram submetidos à laparotomia vídeo assistida, o que sugeriu estímulo equivalente quanto à possível reação inflamatória e formação de aderências, em todos os animais, tornando menor o efeito da intervenção cirúrgica sobre complicações do processo cicatricial.

Os biomateriais a base de quitosana possuem propriedades analgésicas, antitumorais, hemostáticas, antimicrobianas, antifúngicas, cicatrizantes e antiinflamatórias. (Aranaz et al. 2009). Esta última característica é atribuída à sua ação antiinflamatória, dependente de sua forma de apresentação, promovendo inibição da produção fator de necrose tumoral- α , interleucina-I, prostaglandinas e ciclooxigenase-2 (Chou et al. 2003). Na prevenção de aderências peritoniais em ratos, diante do emprego de duas formas de apresentação, filme e gel de quitosana, foi observado formação de aderência nos animais submetidos a tratamento com filme de quitosana e inibição dessas formações quando utilizado gel de quitosana (Zhang et al. 2006). Esses autores também demonstraram ausência de interferência do tipo de tecido em relação à formação das aderências. Reforçando a justificativa que envolve o efeito da forma de apresentação de quitosana no estímulo ou inibição da formação de aderência (Greenberg et al. 2011). Portanto, a ausência de aderências no grupo de animais submetido à histerorrafia com fio de quitosana foi justificada pela propriedade inerente a sua forma de apresentação. Fato que provavelmente favoreceu a inibição de fatores relacionados à inflamação e consequente formação de aderências.

O papel particular de diferentes tipos de técnicas de sutura na cicatrização ainda necessita ser elucidado, no entanto sabe-se que as rafias podem retardar o processo cicatricial ocasionando isquemia, injúria tecidual, inflamação e consequente aderência e deiscência de pontos (Ceci et al. 2012). A cicatrização completa e ausência de deiscência de pontos verificada na avaliação macroscópica nos grupos quitosana e categute sugeriram o efeito benéfico da técnica de sutura empregada. Avaliando a influência do tipo de sutura à inflamação com consequente formação de aderências, verificou-se em enterorrafias no cólon de equinos, que o padrão invaginante de sutura promoveu menor reação inflamatória quando comparado a padrão aposicional (Lucas et al. 2001), corroborando com o tipo de sutura utilizado neste estudo. Além disso, a técnica foi padronizada para os grupos submetidos à rafia com quitosana e categute, sugerindo possível estímulo inflamatório equivalente para ambos. Reforçando que houve menor impacto da

técnica de sutura sobre a formação de aderências no tecido em questão, já que estas foram verificadas apenas no grupo categute.

Considerando a fisiologia do processo cicatricial, as biópsias ocorreram na fase de remodelamento, quando o período de 30 dias foi, um momento de não sobreposição com o final da fase proliferativa, que possivelmente terminou em até 14 dias após a injúria provocada pela intervenção cirúrgica, corroborando com Campos et al. (2007). Além disso, esses autores afirmaram que a fase de remodelamento é clinicamente mais importante, pois ocorre a deposição de colágeno de maneira organizada, portanto é o melhor momento para avaliação da qualidade cicatricial das rafias uterinas.

O início da deposição de colágeno tipo III ocorre no final da fase proliferativa, quando a proporção dos tipos I e III de colágeno pode levar até um ano ou mais para ser reestabelecida e varia conforme o tecido, com predomínio de colágeno tipo III em tecidos moles (Campos et al. 2007). Coincidindo com o observado nos animais do grupo controle. Não houve diferença estatística na avaliação de colágeno tipo III considerando os grupos categute e controle, porém quando comparado o grupo quitosana, com os grupos demais, verificou-se diferença estatística, com aumento significativo de colágeno do tipo III nas áreas de histerorrafia com quitosana. Sugerindo a ocorrência de qualidade superior no processo de reparação tecidual deste grupo, corroborando com estudo em que avaliaram os efeitos de quitosana em pó na cicatrização de anastomoses em cólons de ratos com elevação significativa da deposição de colágeno e consequente melhora na cicatrização (Citgez et al. 2012). Da mesma forma, Ueno et al. (2001) demonstraram aumento da deposição de colágeno do tipo III com uso de formulações tópicas a base de quitosana na cicatrização de feridas.

Para o colágeno do tipo I, não foi observada diferença estatística entre os grupos, uma vez que o mesmo é de formação estrutural, pouco presente em processos de reparação tecidual. Principalmente durante o início da fase de remodelamento quando as coletas foram realizadas e o colágeno do tipo III predominou. O que condiz com os achados de autores que não observaram a presença de colágeno do tipo I no tecido de granulação, na fase de remodelamento (Ueno et al. 1999). Da quantificação do tecido conjuntivo, não foi observada diferença estatística entre os grupos categute e controle. Já o grupo quitosana quando comparado com os grupos controle e categute demonstrou diferença estatística, com aumento de tecido conjuntivo nos animais do grupo em que se empregou quitosana, coincidindo com Eirnaasson et al. (2012) em avaliação de histerorrafias em ovelhas. Para Martins et al. (2013) a membrana de quitosana em feridas induzidas experimentalmente em equinos, intensificou a formação do tecido de granulação, destacando potencial efeito reparador. Na fase proliferativa, o tecido de granulação é um tecido conjuntivo imaturo e na fase de remodelamento, torna-se maduro. Portanto, os achados referentes ao tecido conjuntivo podem ainda ser associados ao aumento do colágeno tipo III no grupo quitosana, já que o tecido de granulação está envolvido com a síntese de colágeno, sugerindo assim melhor qualidade cicatricial. A ausência de diferença estatística entre os grupos, tomando como base o VEGF-A foi atribuída ao momento de realização da biópsia. Isto é, ocorreu na fase de remodelamento tecidual. Sugerindo que não houve aumento da ação de fatores de crescimento endoteliais nesta fase. Fato que coincide com estudo onde afirmaram que a ação de VEGF-A esteve relacionada à fase proliferativa da reparação tecidual (Sinno & Prakash 2013).

Ainda em relação aos vasos, durante a segunda semana após a lesão, na fase proliferativa, houve invasão de capilares ao tecido de granulação. À medida que este amadurece e o colágeno se acumula, fase de remodelamento, a densidade de vasos sanguíneos tende a diminuir (Tonnesen et al. 2000). Portanto, na análise dos vasos sanguíneos, foi observado maior quantidade no grupo controle em relação aos demais grupos, que não apresentaram diferença estatística entre si. Sugerindo, maior expressão da ocorrência de vasos sanguíneos no tecido íntegro, em relação ao cicatricial, que por sua vez, demonstrou como característica apresentar maior densidade da ocorrência das suas fibras de colágeno em substituição aos vasos, caracterizando assim o preenchimento dos espaços gerados.

CONCLUSÃO

Foi evidenciada a ausência de aderências, aumento de colágeno do tipo III e maior formação de tecido conjuntivo, no grupo quitosana quando comparado ao categute. E ausência de diferença estatística referente ao colágeno do tipo I e VEGF-A, que foram atribuídas à fase de remodelamento da cicatrização, quando da realização das biópsias, onde não ocorreu aumento da expressão destes parâmetros. A maior resposta inflamatória foi notória no grupo categute quando comparado ao quitosana, com predomínio de atividade de linfócitos, estimulando a formação de aderências. O fio de quitosana demonstrou em comparação ao categute, promover efeito preventivo no processo de formação de aderências pós-cirúrgicas das áreas de rafia e aumento da deposição de colágeno do tipo III no processo de reparação tecidual, conferindo melhor qualidade cicatricial no útero de ovelhas.

REFERÊNCIAS

Akinrinmade J.F. & Lawal, A.O. 2010. Gross and histologic evaluation of abdominal adhesions associates with chromic catgut and polypropylene sutured enteropexies in dog. *Int. J. Morphol.* 28(4):1221-1225.

- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galede G. & Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*. 3:203-230.
- Campos A.C.L., Borges-branco A. & Groth A.K. 2007. Cicatrizaçao de feridas. *ABCD: arq. bras. cir. dig.* 20(1):51-58.
- Ceci C., Cantatore C., Scioscia M., Nardelli C., Ravi M., Vimercati A. & Bettocchi S. 2012. Ultrasonographic and hysteroscopic outcomes of uterine scar healing after cesarean section: comparison of two types of single-layer suture. *J. Obstet. Gybaecol. Res.* 38 (11):707-712.
- Chou T.C., Fu E. & Shen E.C. 2003. Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res. Commun.* 308(2):403-407.
- Citgez B., Cengiz A.N., Akgun I., Uludag M., Yetkin G., Bahat N., Ozean O., Polat N., Akcakaya A. & Karatep O. 2012. Effects of chitosan on healing and strength of colonic anastomosis in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 27(10):707-712.
- Einarsson J.I., Vonnahme K.A., Sandberg E.M. & Grazul-Bilska, A.T. 2012. Barbed compared with standard suture: effects on cellular composition and proliferation of the healing wound in the ovine uterus. *Acta Obstetricia et Ginecologica Scandinavica.* 91:613-619.
- Greenberg J.A. & Clark R.M. 2009. Advances in suture material for obstetric and gynecologic surgery. *Rev. Obstet. Gynecol.* 2(3):146-158.
- Greenberg J.A., Walden S., Hammer C.M., Grazul-bilska A.T. & Vonnahme K.A. 2011. A comparison of barbed and smooth sutures for ovine cesarean delivery. *International Journal of Gynecology and obstetrics.* 113:215-217.
- Kosan M., Gonulalan U., Ozturk B., Kulacoglu S., Erguder I., Akdemir O. & Cetinkaya M. 2008. Tissue reactions of suture materials (polyglactine 910, chromed catgut and polydioxanone) on rat bladder wall and their role in bladder stone formation. *Urol. Res.* 36:43-49.
- Lucas F.A., Cattelan J.W., Castro M.B. & Valente P.P. 2001. Estudo comparativo da cicatrizaçao de enterorrafias em planos aposicional e invaginante no colon descendente de equinos. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.* 2001. 53(5):577-584.
- Martins E.A.N., Invernizzi M.S., Campos M.G.N., Teodoro P.A., Contieri M.B. & Silva L.C.L.C. 2013. Emprego de membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. *Ciência Rural.* 43(10):1824-1830.
- Murata H., Shimada N. & Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal.* 168:28-40.
- Sinno H. & Prakash S. 2013. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic Surgery International.* 2013:1-6.
- Tonnesen M.G., Feng X. & Clark R.A.F. 2000. Angiogenesis in wound healing. *The society for investigative dermatology.* 5(1):40-46.
- Ueno H., Mori T. & Fujinaga T. 2001. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 52:105-115.
- Ueno H., Yamada H., Tanaka I., Kaba N., Matsuura M., Okumura M., Kadosawa T. & Fujinaga T. 1999. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs. *Biomaterials.* 20:1407-1414.
- Young A. & McNaught C.E. 2011. The Physiology of wound healing. *Basic Science.* 29(10):475-479.
- Zhang Z.L., Xu S.W. & Zhou X.L. 2006. Preventive effects of chitosan on peritoneal adhesion in rats. *World J. Gastroenterol.* 12(28):4572-4577.