

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ADERÊNCIAS PERITONIAIS, COLÁGENO TIPO I, III E  
TOTAL NAS TELAS DE POLIPROPILENO E  
POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL  
EM RATOS.**

Mestrando: LUCAS FÉLIX ROSSI

Orientador: Prof. Dr. MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE

PORTO ALEGRE, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ADERÊNCIAS PERITONIAIS, COLÁGENO TIPO I, III E  
TOTAL NAS TELAS DE POLIPROPILENO E  
POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL  
EM RATOS.**

Mestrando: LUCAS FÉLIX ROSSI

Orientador: Prof. Dr. MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE

PORTO ALEGRE, 2013

## APRESENTAÇÃO

Tese de mestrado intitulada *ADERÊNCIAS PERITONIAIS, COLÁGENO TIPO I, III E TOTAL DAS TELAS DE POLIPROPILENO E POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS* apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas para obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este trabalho foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais que regem o uso científico de animais na experimentação (número 1100-79 CEUA/HCPA).

## AGRADECIMENTOS E DEDICATÓRIAS

*Deus*

Pela vida.

*À cirurgia*

Certamente a mais bela arte da vida e o fascínio que me proporciona a cada dia.

*À família:*

Ao patriarca e alicerce da Família, meu avô Sr. Bruno Félix Rossi (*in memoriam*). Este é integralmente dedicado a ele. Em memória de meu avô Sr. Olmiro Onzi e a Dona Orque sua legítima fiel pelo carinho desde a infância. Aos meus pais Marion Luiza Onzi Rossi e Rubens Félix Rossi pelo contínuo amparo no longo percurso da vida, bem como minha avó Dona Maria Marina. Ao benjamin, meu irmão Rafael Paolo Rossi detentor precoce da diplomação que almejo com este trabalho.

*Aos mestres:*

Ao prof. Armando José d'Acampora, ícone e exemplo de cirurgião. A pessoa que certamente guiou minha formação e que, precocemente, ensinou o caminho.

Ao prof. Manoel Roberto Maciel Trindade pela amizade e o aprendizado que me foi disponibilizado. Uma grata felicidade poder fazer parte deste convívio.

Ao Dr. José Eduardo Queiroz de Carvalho pela confiança depositada em mim e oportunidade de compartilhar ensinamentos.

Aos cirurgiões que, em determinadas épocas, foram e continuam meus exemplos de sábios com luvas: Dr. Ricardo Fantazinni Russi, Dr. Adalberto Reis Cortês, Dr. André Calandrini, Dr. Charly Genro Camargo, Dr. Fernando Farias, Dr. Jorge Bins-Ely, Dr. Leandro Cavazzola, Dr. Plínio Baú, Dr. Salvador Gullo, Dr. Eduardo Didoné, Dr. Marcelo Garcia Toneto, Dr. Jarcedy Machado Alves, Dr. Hamilton Petry de Souza, Dr. Ricardo Bregeiron, Dr. Cláudio Mottin, Dr. Eduardo Hubner, Dr. Leonardo Zavaschi.

## RESUMO

**Introdução:** A correção herniária é um tratamento realizado rotineiramente na prática cirúrgica. O aprimoramento da técnica operatória e dos materiais disponíveis trouxe sem dúvida enorme benefício na qualidade dos resultados da cirurgia. A inserção de próteses para correção herniária é bem embasada na literatura e tornou-se o padrão de tratamento quando abordamos este tipo de doença. O objetivo deste trabalho é avaliar duas próteses disponíveis: a de polipropileno e a de polipropileno revestido em modelo experimental.

**Métodos:** Foram inseridas sete próteses de cada tipo em ratos Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) na parede abdominal anterior do animal em contato direto com as vísceras. Após o seguimento de noventa dias fizemos a análise das aderências intra-abdominais, bem como avaliação por imuno-histoquímica e videomorfometria do colágeno total, tipo I e tipo III. Ainda fez-se a análise histológica com hematoxilina-eosina para avaliação dos tipos celulares presentes em cada tela.

**Resultados:** Aos noventa dias as aderências não foram diferentes entre os grupos ( $P=0,335$ ). O colágeno total igualmente não foi estatisticamente diferente ( $P=0,810$ ). O colágeno tipo III foi estatisticamente maior no grupo polipropileno revestido ( $P=0,039$ ) enquanto o colágeno tipo I não diferiu entre as próteses ( $P=0,050$ ). Os linfócitos foram estatisticamente mais presentes no grupo polipropileno ( $P=0,041$ ).

**Conclusão:** A prótese revestida não foi diferente da de polipropileno na variável aderência. O colágeno total e tipo I não foram diferentes entre os grupos enquanto que o colágeno tipo III é mais presente na tela revestida. O número de linfócitos foi maior na tela de polipropileno.

**Descritores:** Cirurgia geral. Modelos animais. Hérnia. Telas cirúrgicas. Aderências teciduais.

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>10</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>11</b>
<b>IMPLICAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>22</b>
<b>CONFLITO DE INTERESSES E FONTE DE FINANCIAMENTO.....</b>	<b>23</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A (CARTA APROVAÇÃO DO TRABALHO).....</b>	<b>37</b>
<b>ARTIGO ORIGINAL VERSÃO PORTUGÊS/INGLÊS</b>	

## INTRODUÇÃO

A correção da hérnia incisional (HI) é problema para o cirurgião desde os primórdios das cirurgias abdominais.<sup>1 2</sup> Hérnia incisional é a protusão do conteúdo abdominal através de ponto fraco da parede, constituído pela cicatriz de intervenção cirúrgica anterior. Também denominada de laparocèle ou hérnia pós-operatória<sup>3</sup>, diferenciando-se da diástase dos músculos retos pela ausência de lâmina aponeurótica entre peritônio e pele e, evidentemente, pela ausência de qualquer intervenção cirúrgica prévia.<sup>4</sup>

A síntese da parede abdominal em situações complexas como infecções graves, grandes hérnias incisionais, perda maciça de tecido, necrose, tumores é um problema de difícil solução para o cirurgião geral, especialmente quando não se dispõe de tecido autógeno suficiente para o fechamento primário adequado.<sup>5 6 7</sup> O aumento do número de laparotomias em condições ditas não favoráveis acarretou situações de fechamento abdominal difícil, quando por vezes não impossível, o que conseqüentemente aumentou a prevalência da HI. É uma causa importante morbidade nos pacientes que possuem tal tipo de hérnia<sup>8</sup> interferindo na qualidade de vida e resultados cosméticos.<sup>9</sup>

Tentativas de fechamento de grandes defeitos por diferentes procedimentos, incluindo incisões de relaxamento, freqüentemente resultam em hérnias ou a recorrência da hérnia porque o fator tênsil é desconsiderado.<sup>10</sup>

A incidência de hérnia incisional varia de 1 a 11%, aumentando muito caso o fechamento da cavidade for feito sob tensão.<sup>6</sup> Mudge publicou uma coorte com dez anos de seguimento englobando centenas de pacientes que realizaram alguma cirurgia abdominal. Do total de 337 pacientes que completaram os 10 anos do estudo 11% desenvolveram hérnias e 35% destes apresentaram tal condição cinco anos ou mais após a cirurgia de base. O mais significativo desta publicação é que a incidência de HI é parecida tanto em seguimentos curtos quanto longos. A maioria dos dados referentes na literatura indica a incidência de HI após um ano, entretanto há evidências indicando a ocorrência após cinco anos de cirurgia.<sup>11</sup> Isto evidencia que a ocorrência de HI continua a aparecer mesmo após vários anos da intervenção de base.<sup>12 13</sup>

Mittelstaedt e cols afirmam que o tipo e localização das incisões laparotômicas são de grande importância para o desenvolvimento de eventrações. Parece haver maior tendência de as incisões longitudinais evoluírem para hérnias incisionais. Verifica-se seu aparecimento

mais em pacientes que apresentam ascite severa <sup>4 14</sup>, índice de massa corpórea maior que 25, tipo de incisão e presença de complicações pós-operatórias. <sup>15</sup> Podemos citar mais algumas condições predisponentes ligadas ao paciente como obesidade, esforço abdominal exagerado, distensão abdominal pós-operatória <sup>3</sup>, anemia, repouso prolongado no leito, diabetes, obesidade, desnutrição (hipoproteïnemia), deficiência de vitamina C, infecção<sup>14</sup>, fumo <sup>15</sup>.

Sem dúvida, a presença de infecção é o principal fator etiológico local para o desenvolvimento de HI. O processo infeccioso é associado à necrose supurativa que destrói os tecidos, afrouxando os pontos de aproximação das bordas aponeuróticas e impedindo o desenvolvimento de um tecido cicatricial. <sup>4</sup> Quando há infecção da incisão, a frequência de hérnia incisional atinge cifras de 15% a 30%. <sup>3</sup>

As grandes hérnias incisionais resultam da perda do domicílio abdominal, que ocorre quando o conteúdo abdominal não mais se encontra na cavidade abdominal, ou seja, há uma desproporção entre o continente e o conteúdo. Quando existe grande defeito abdominal propõem-se inúmeras técnicas, muitas das quais com utilização de enxertos e próteses. Como enxertos são citados a fásia lata, dura-máter, pele e do próprio saco herniário conforme técnica de Alcino Lázaro da Silva. Outro tipo de técnica cirúrgica é a que faz uso de próteses sintéticas que são disponíveis em inúmeras variedades. Basicamente as próteses sintéticas podem ser de náilon, polipropileno, politetrafluoretileno, polivinil, acrilonitrilo, acetato de celulose, poliglactina 910, <sup>14</sup> polipropileno associado à poliglactina sintética. <sup>16</sup>

## *REVISÃO DA LITERATURA*

Um material sintético, para ser usado como prótese, deve seguir alguns princípios básicos: não se modificar na presença dos fluidos teciduais, ser quimicamente inerte, não produzir reação inflamatória ou do tipo corpo estranho, não ser carcinogênico, não produzir alergia, ser esterilizável, mecanicamente resistente, economicamente viável. <sup>14</sup>

O sucesso das próteses vasculares na década de cinquenta estimulou a indústria a pesquisar e fabricar novos materiais. A tela de polipropileno foi, sem dúvida, um dos grandes avanços da tecnologia médico-cirúrgica, reparando defeitos que antes não podiam ser suturados. É produzida pelo gás de etileno carregado em uma solução e submetido à reação catalítica sob baixas pressões. <sup>10</sup>



As próteses monofilamentares têm dado melhores resultados que as multifilamentares. As primeiras permitem melhor integração, rápida fixação e baixo risco de infecção, proporcionando a infiltração de fibroblastos, colágeno e macrófagos na malha sintética. A tela de polipropileno seguramente condicionou uma etapa superior na evolução dos acontecimentos tecnológicos, tendo seu uso uma aceitação universal.

Usher, em 1959, realizando experimentos em animais utilizando telas de polipropileno se tornou o pioneiro neste tipo de pesquisa. Neste estudo foram comparadas telas de polipropileno e de politetrafluoretileno, fazendo excisão de tecidos de cães e substituindo o defeito pelas referidas próteses. Os resultados mostraram-se favoráveis à tela de polipropileno no que tange a infiltração mais uniforme da malha nos tecidos vizinhos a ela, à inércia desta tela na presença de infecções, e o não aumento da espessura do tecido cicatricial. Uma das mais importantes características desta tela é ser inerte na presença de infecção, sendo comparado ao tântalo nesta propriedade. Também foi demonstrado não haver fragmentação da tela, nem diminuição da força tênsil seis semanas após sua implantação.<sup>17</sup>

Devido aos resultados satisfatórios obtidos, Usher dá continuidade à pesquisa e publica um estudo clínico utilizando tela de polipropileno em 78 casos. Foram relatados excelentes resultados sem taxas de recorrência de hérnias. O material foi considerado inerte na presença de infecção, já que três pacientes desenvolveram abscesso que foi curado apenas com drenagem a antibiótico específico, sendo que em nenhum destes casos foi necessária a retirada da tela. A palpação da ferida operatória dois a três meses após a cirurgia mostrou a parede abdominal com consistência firme. As extremidades da tela eram difíceis de ser delineadas do tecido vizinho, e não houve sinais de enrugamento e irregularidades. Como conclusão final deste estudo foi descrito que a tela de polipropileno pode ser um valioso suplemento no reparo de hérnias ou outros defeitos tóraco-abdominal.<sup>10</sup>

Trabalho subsequente mostrou haver firme aderência da tela de polipropileno aos tecidos vizinhos, e grandes hérnias incisionais foram operadas com reconstrução perfeita da parede abdominal com força e flexibilidade.<sup>7</sup>

A prótese de polipropileno é a que melhor se presta para o tratamento cirúrgico da HI.

7 10 17

No entanto a colocação intra-abdominal causa importante formação de adesões, podendo resultar em sérias complicações como obstrução intestinal e fístulas enterocutâneas.

<sup>18</sup> Com o objetivo de diminuir o índice de complicações e a possibilidade de contato da tela

diretamente com as vísceras abdominais surgiu uma tela formada por polipropileno associada a uma camada composta de celulose oxidada regenerada. Esta última objetiva diminuir a formação de aderências (Proceed® Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA). De fato, segundo o fabricante telas com barreiras biológicas são associadas a muito menos formação de aderências do que as sem esta estrutura.

A escolha da tela para o reparo das hérnias incisionais pode ser um dilema, pois atualmente vários tipos de produtos são disponíveis para o seu tratamento.<sup>19</sup> Diante disto, utilizamos uma tela com uso consagrado na ciência cirúrgica, ou seja, a de puramente polipropileno com uma nova tela disponível que tem por característica a associação de materiais em busca da diminuição de aderências intraperitoniais. A tela composta foi desenvolvida pela Ethicon® para implantação em camadas profundas do abdômen almejando a pressão intra-abdominal para mantê-la em posição e sem que para isso haja aderência de vísceras quando esta for posicionada em íntimo com elas. Excelente crescimento tecidual e resistência com baixos índices de aderências quando utilizada é verificado no seu uso.<sup>20</sup>

Deste modo o que se propõe com esta pesquisa é analisar, primariamente, as aderências com estes dois tipos de telas além do colágeno total, colágeno tipo I e tipo III. A análise da histologia será conduzida em direção das formas celulares presentes nas próteses.

## **OBJETIVO**

### **GERAL**

Comparar a aderência intraperitoneal das telas de polipropileno e polipropileno associado à celulose oxidada regenerada em modelo experimental.

### **ESPECÍFICO**

Quantificar a aderência segundo o escore de aderência para o grupo polipropileno e polipropileno revestido.

Avaliar por imuno-histoquímica o colágeno total, colágeno tipo I e III e compará-los entre as telas de polipropileno e polipropileno revestido usando a técnica de videomorfometria computadorizada.

Avaliar histologicamente com hematoxilina-eosina os tipos celulares presentes em cada prótese.

## **MÉTODOS**

### **LOCAL DE REALIZAÇÃO**

O trabalho foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) e na Unidade de Patologia Experimental (UPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **AMOSTRA**

Utilizamos um modelo experimental em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, pesando entre 303-368 gramas, aparentemente saudáveis. O cálculo estatístico foi realizado na Unidade de Bioestatística do Grupo de Pesquisa da Pós-Graduação da UFRGS com auxílio do programa GPower<sup>1</sup>. Estipulando-se no aplicativo um alfa de 0,05% com poder de 90% e diferença entre médias de dois desvio-padrão e ainda com agregação de dados referenciais de artigos previamente publicados foi encontrado um número total de quatorze animais para a realização da pesquisa. (N=14)

### **SELEÇÃO**

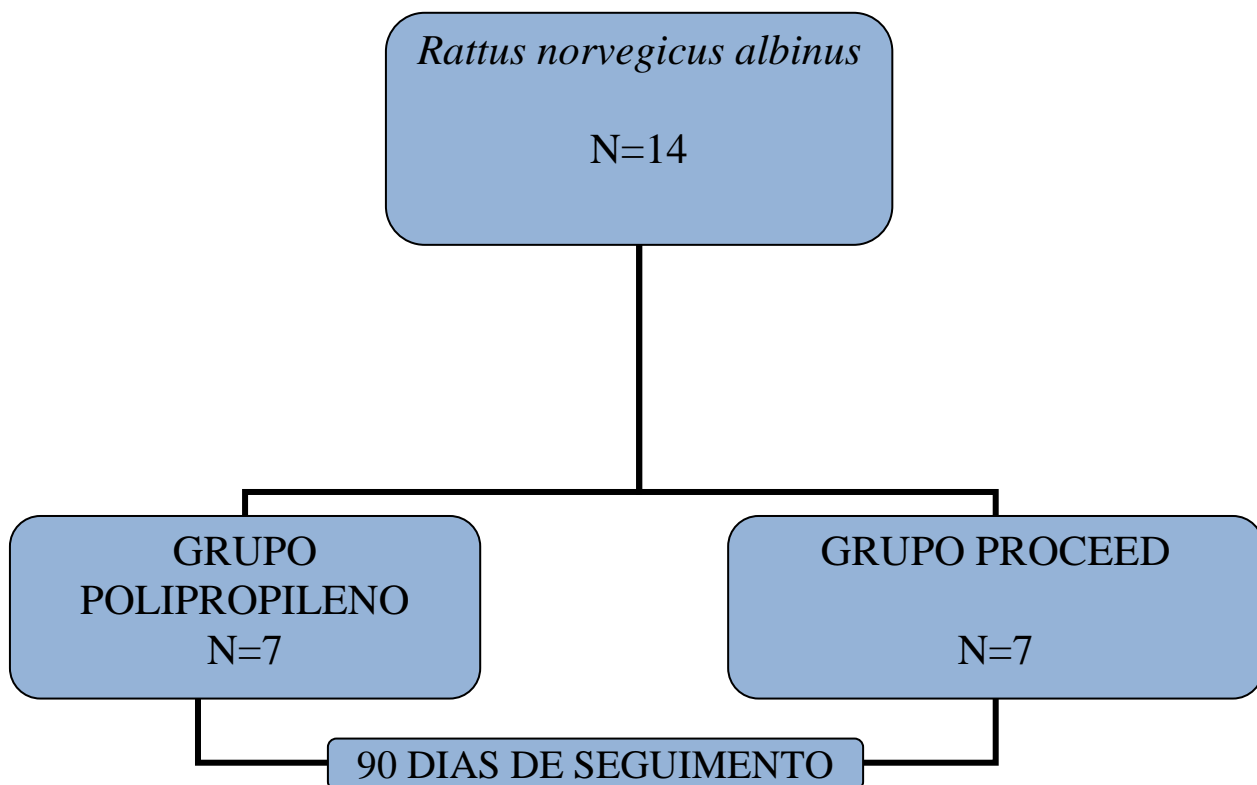
Antes da realização do experimento os animais permaneceram quatorze dias para adaptação ambiental na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisas (CP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 40 x 30 x 16 cm, cinco animais por unidade e em ambiente controlado artificialmente com temperatura adequada (22°), fluxo de ar contínuo, livre de barulho, estresse e obedecendo aos ciclos dia e noite de 12/12 horas. Durante este período receberam ração própria para pequenos roedores e água *ad libitum*.

### **GRUPOS DO ESTUDO**

Os animais segundo o objetivo da pesquisa foram alocados por randomização simples em dois grupos de sete exemplares assim dispostos:

---

<sup>1</sup> Disponível em <http://WWW.PSYCHO.UNI-DUESSELDORF.DE/ABTEILUNGEN/AAP/GPOWER3/>



**Grupo Polipropileno (GPP):** tela de polipropileno medindo 3,0 centímetros de comprimento e 2,0 centímetros de largura (6 cm<sup>2</sup>) para fechamento do defeito causado na parede abdominal.

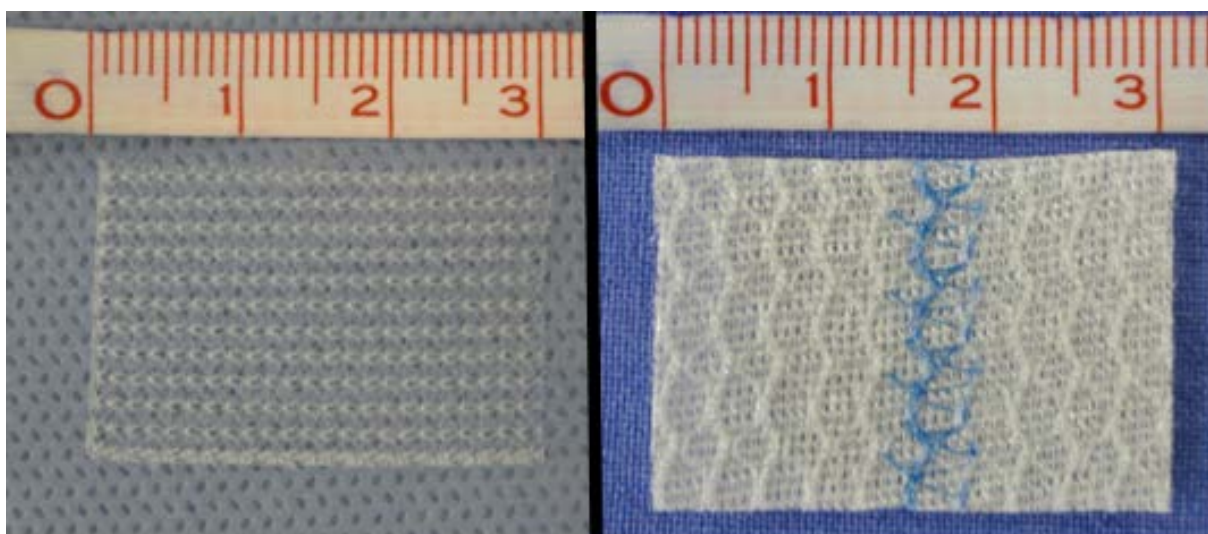
**Grupo Proceed<sup>®</sup> (GPC):** tela de polipropileno de baixa densidade associada à celulose oxidada regenerada (COR) e a polidioxonona (PDS) – Proceed<sup>2®</sup>: mesmos procedimentos adotados no grupo polipropileno utilizando a prótese referida.

As propriedades e características macroscópicas e microscópicas de cada prótese são visíveis na Tabela 1 e nas Figuras 1,2 e 3. As denominações tela de polipropileno revestido, tela separadora de tecidos, prótese composta ou ainda pelo nome comercial - Proceed<sup>®</sup> - são as denominações adotadas como sinônimos. Em momento algum houve conflito de interesse na condução da pesquisa.

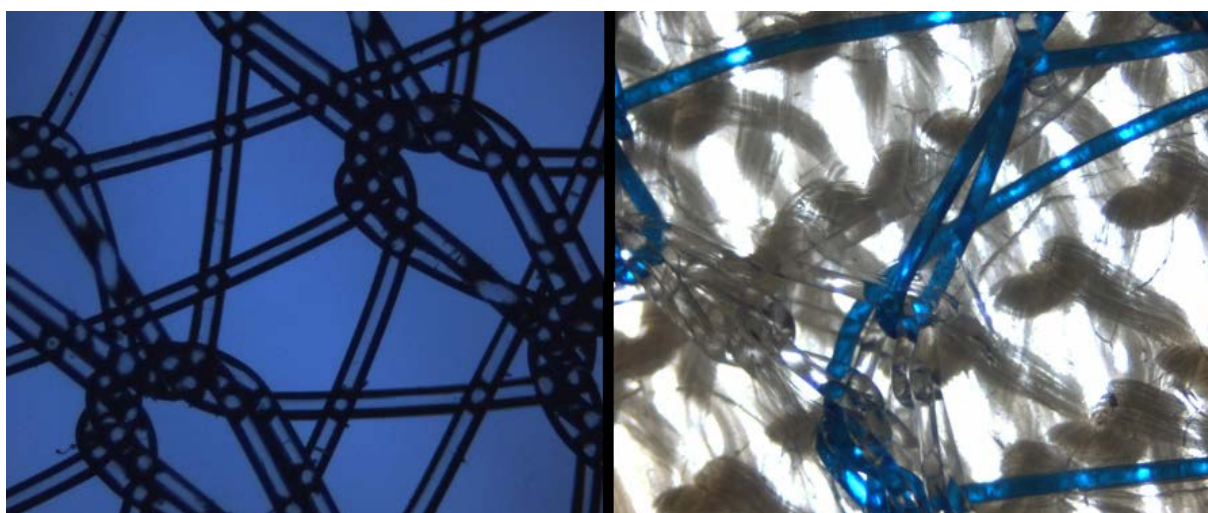
<sup>2</sup> Proceed Surgical Mesh – Ethicon – Somerville, NJ - USA

**Tabela 1-** Descrição dos componentes das telas de polipropileno e de polipropileno revestido.

Tela	Componente	Degradação	camada de barreira anti-aderência	
			Componente	Degradação
Prolene <sup>® 3</sup>	Polipropileno	não biodegradável	-----	-----
Proceed <sup>® 3</sup>	Polipropileno encapsulado por polidioxonona (PDS)	não biodegradável 180 dias	celulose oxidada regenerada (COR)	28 dias



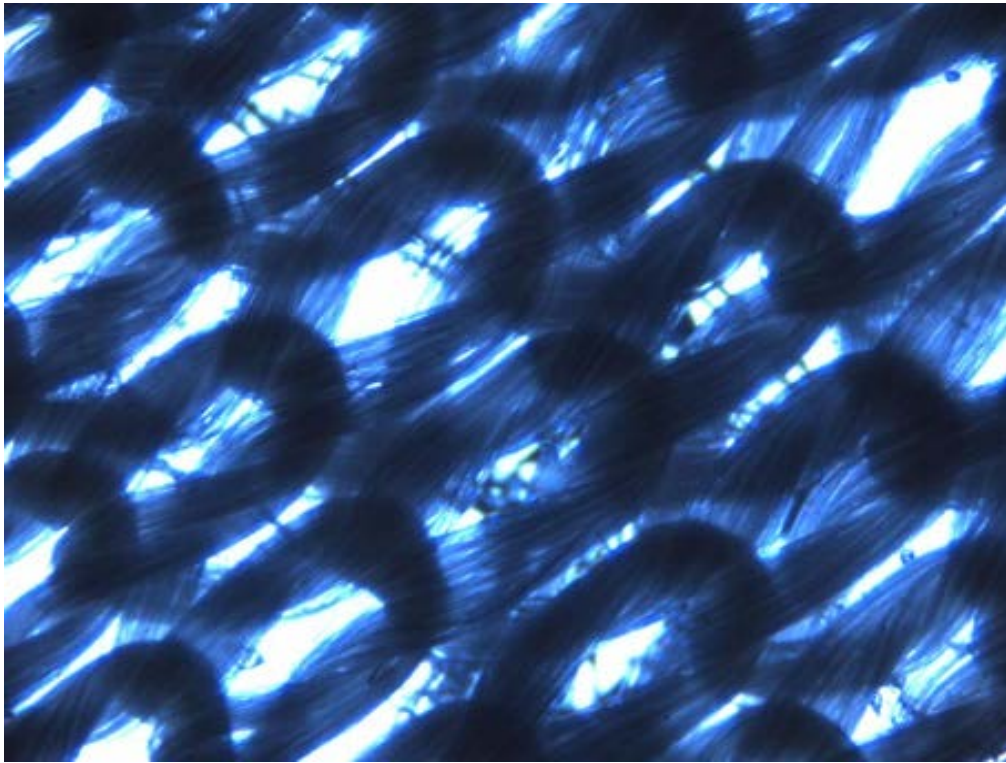
**Fig 1.** Macroscopia da tela de polipropileno (esquerda) e a de Proceed (direita) com área de seis cm<sup>2</sup>.



**Fig 2** – Tela de polipropileno à esquerda e a de Proceed<sup>®</sup> à direita. Nesta notamos ao fundo a camada de celulose oxidada regenerada e em primeiro plano fios de polidioxonona

<sup>3</sup> Trademark Ethicon – Somerville, NJ - USA

(azul) e de polipropileno (translúcido). Microcopia com aumento de 40x.

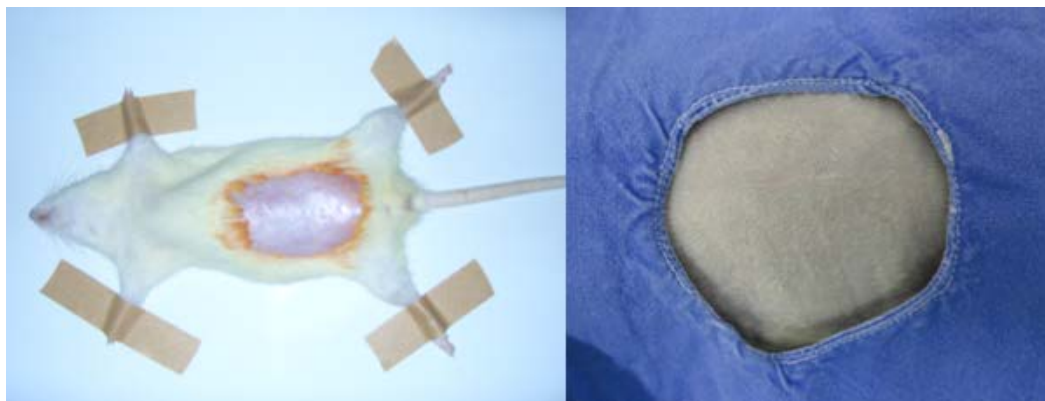


**Fig 3** – Camada de celulose oxidada regenerada que constituiu o mecanismo anti-aderência da tela revestida. Aumento 40x.

### **ANESTESIA E PREPARO PRÉ-OPERATÓRIO**

Para a anestesia geral foi adotado protocolo próprio do laboratório em conformidade com as normas éticas vigentes de pesquisa com animais. Houve acompanhamento de profissional habilitado (médico veterinário) sendo realizada injeção de solução de cloridrato de ketamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) intraperitoneal. Os animais permaneceram sob-respiração espontânea durante todo o tempo operatório e em nenhum momento do ensaio foi utilizado antibiótico.

Depois de constatada a anestesia geral (ausência de reação motora e do reflexo córneo-palpebral) foram posicionados e fixados com fita adesiva em decúbito dorsal horizontal em prancha adequado para cirurgia de pequenos animais. Em seguida, tricotomizados com dispositivo elétrico, antissepsia na parede ântero-lateral do abdome com solução de polivinilpirrolidona iodo (PVPI 10%) e colocação de campo fenestrado sobre a área a ser abordada. (Fig. 2)

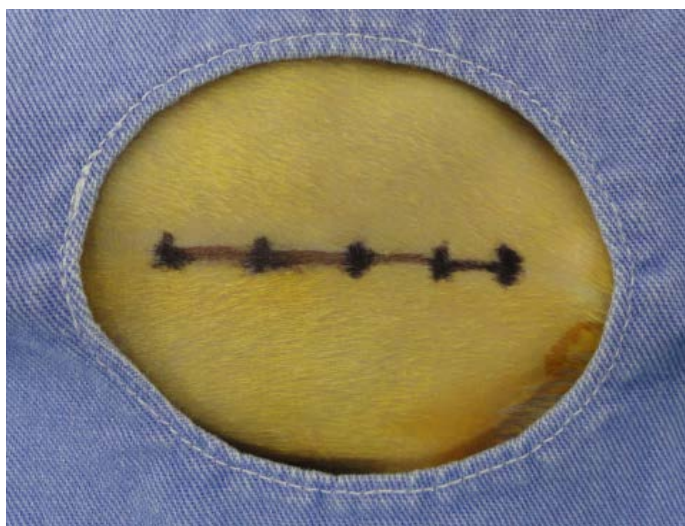


**Fig. 2** – Fotografia do posicionamento do animal (esquerda) e campo fenestrado (direita) na parede abdominal anterior.

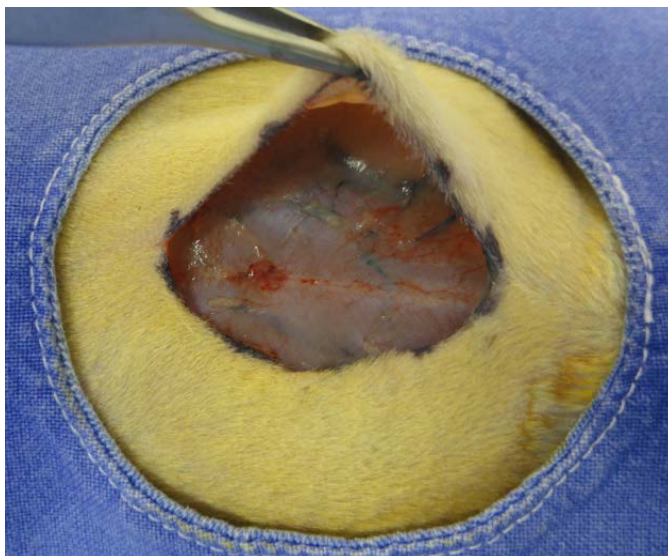
### **TÉCNICA OPERATÓRIA**

O procedimento cirúrgico realizado foi incisão longitudinal mediana um centímetro abaixo do xifóide com bisturi frio lâmina nº 15 na parede abdominal anterior medindo quatro centímetros de comprimento. (Fig. 3)

Dissecção da hipoderme com tesoura de Metzmbaun buscando a exposição da parede abdominal anterior possibilitando a criação do modelo de hérnia incisional. (Fig. 4)

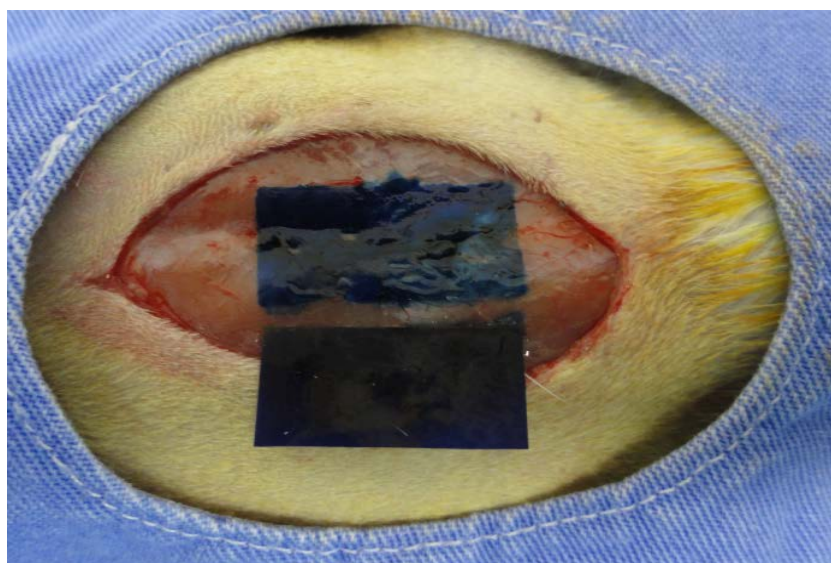


**Fig. 3** - Fotografia da parede abdominal anterior demarcada para incisão.



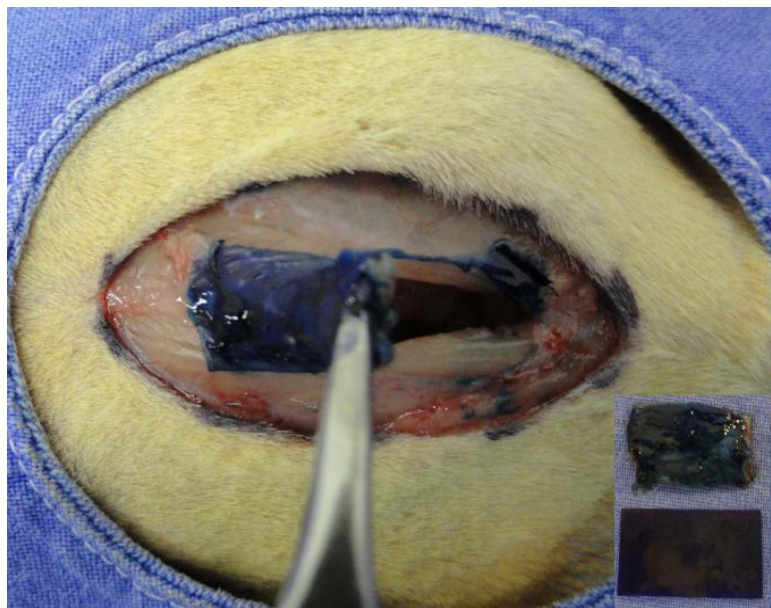
**Fig. 4** - Fotografia da dissecação da pele expondo a musculatura da parede abdominal anterior.

A metodologia do modelo de hérnia incisional seguiu modelo já descrito na literatura<sup>21</sup> Em vistas a uma padronização precisa na secção da musculatura abdominal foi utilizado um molde constituído de um segmento de plástico maleável medindo dois centímetros de largura por três centímetros de comprimento e tingido com azul de metileno. A demarcação pode ser vista na Figura 5 sendo, após, realizada a secção e exérese da área demarcada totalizando 6,0 cm<sup>2</sup> atingindo a camada muscular e o peritônio. Dessa forma um defeito na parede anterior do abdome foi criado e preenchido na sequência com as próteses em estudo. (Fig. 6)



**Fig. 5** - Demarcação da área de 6 cm<sup>2</sup> com molde plástico tingido com azul de metileno.

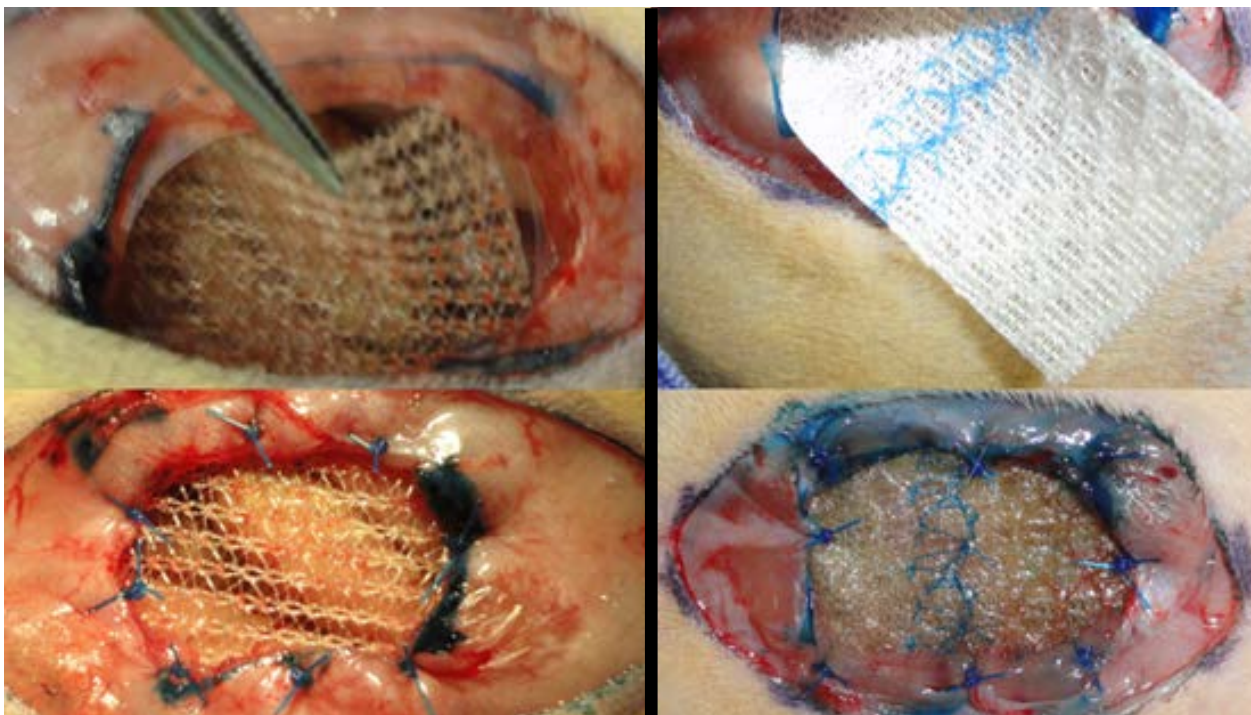




**Fig. 6** - Exérese de fragmento da musculatura (detalhe à direita do segmento e o molde plástico).

Os implantes foram alocados em posição intraperitoneal em forma de ponte e com contato direto com as vísceras. As bordas foram fixadas na musculatura da parede abdominal anterior com fio de polipropileno 4-0 montados em agulhas atraumáticas utilizando-se pontos simples em plano único, separados, intercalados por espaços de 1,5 cm no comprimento e 1,0 cm na largura com distância equivalente de 0,5 cm da tela e das margens da incisão. Ainda atados com cinco semi-nós verdadeiros como preconizado pelas características físico-dinâmicas do fio.

Na figura 7 visualizamos a implantação, à esquerda, da tela de polipropileno e, à direita, a Proceed. Esta última é constituída de superfícies diferentes sendo fundamental o seu posicionamento correto. A face que, em tese, diminui as aderências é composta por celulose oxidada regenerada e logicamente foi posicionada em contato com o conteúdo visceral do animal. A síntese da pele foi feita com fio de náilon 3-0 e sutura do tipo borda grega.



**Fig. 7** - Inserção das próteses, à esquerda a tela de polipropileno e sua fixação com fio de polipropileno 4-0. À direita, tela separadora de tecidos fixada com a mesma sutura.

## **CONDUÇÃO, PÓS-OPERATÓRIO E SEGUIMENTO**

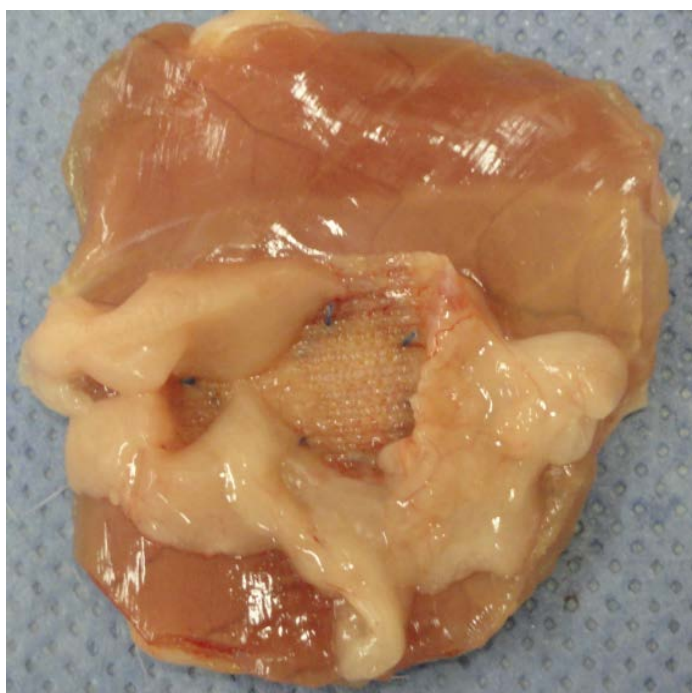
Logo após o procedimento os animais permaneceram em incubadora dotadas de aquecimento e distribuídos em gaiolas tão logo estivessem recuperados da anestesia. Após a recuperação anestésica ficaram na unidade experimental mantidos em ambiente controlado artificialmente com as mesmas características do período de adaptação. Dispostos em caixas plásticas de polipropileno numeradas, em prateleiras com iluminação artificial, um animal por gaiola com ração e água *ad libitum*. Como analgesia foi usado cloridrato de tramadol intramuscular na dose de 10 mg/kg no pós-operatório imediato, e a alimentação do tipo ração era própria para alimentação de pequenos roedores.

O protocolo de acompanhamento do pós-operatório foi diário analisando possíveis perdas e intercorrências. O tempo de seguimento estipulado foi de 90 dias para ambos os grupos.

## ÓBITO E RESSECÇÃO DO MATERIAL

Após o tempo de seguimento de 90 dias foi realizada a morte por câmara de CO<sup>2</sup> em conformidade com a Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária tendo as implicações éticas discutidas, julgadas e aprovadas pelo CEUA/HCPA. A descrição pormenorizada no que tange a ética em pesquisa é abordada na sequência no parágrafo IMPLICAÇÕES ÉTICAS.

Depois de constatado o óbito fez-se epilação e fixação do animal em decúbito dorsal horizontal com fitas adesivas em prancha para cirurgia de pequenos roedores. Com bisturi frio fez-se uma incisão em U invertido na pele e parede abdominal anterior finalizando superiormente a ressecção de maneira transversa. Assim, ressecamos a parede abdominal anterior interessando a pele, aponeurose dos músculos abdominais com a prótese implantada. (Fig. 8) Neste tempo conduzimos a análise macroscópica das aderências utilizando um escore próprio e descrito na Tabela 2. Após as peças foram acondicionadas em recipientes com solução de formalina tamponada a 10% e identificadas individualmente conforme o grupo em vistas da posterior análise microscópica e imuno-histoquímica.



**Fig. 8** – Fotografia da parede abdominal anterior ressecada com a prótese implantada - grupo polipropileno.

## ANÁLISE DAS VARIÁVEIS

### MACROSCÓPICA

A quantidade e a qualidade da formação de aderências foram avaliadas macroscopicamente logo após o óbito do animal. Aplicamos um escore de avaliação das aderências descrito na Tabela 2.

**Tabela 2** – Escore de avaliação das aderências.

Parâmetro	Escore				
	0	1	2	3	4
% Aderências em cada retalho da tela	Ausente	1-25% área da tela com adesão	26-50% área da tela com adesão	51-75% área da tela com adesão	76-100% área da tela com adesão
Espessura da Aderência	Ausente	< 5mm	5-10 mm	11-15 mm	15mm
Resistência da aderência	Ausente	Separação espontânea da aderência	Aderência separada por tração	Aderência separada por dissecação	----

Valores são reportados como as somas das aderências e a intensidade variando de 0 a 11.

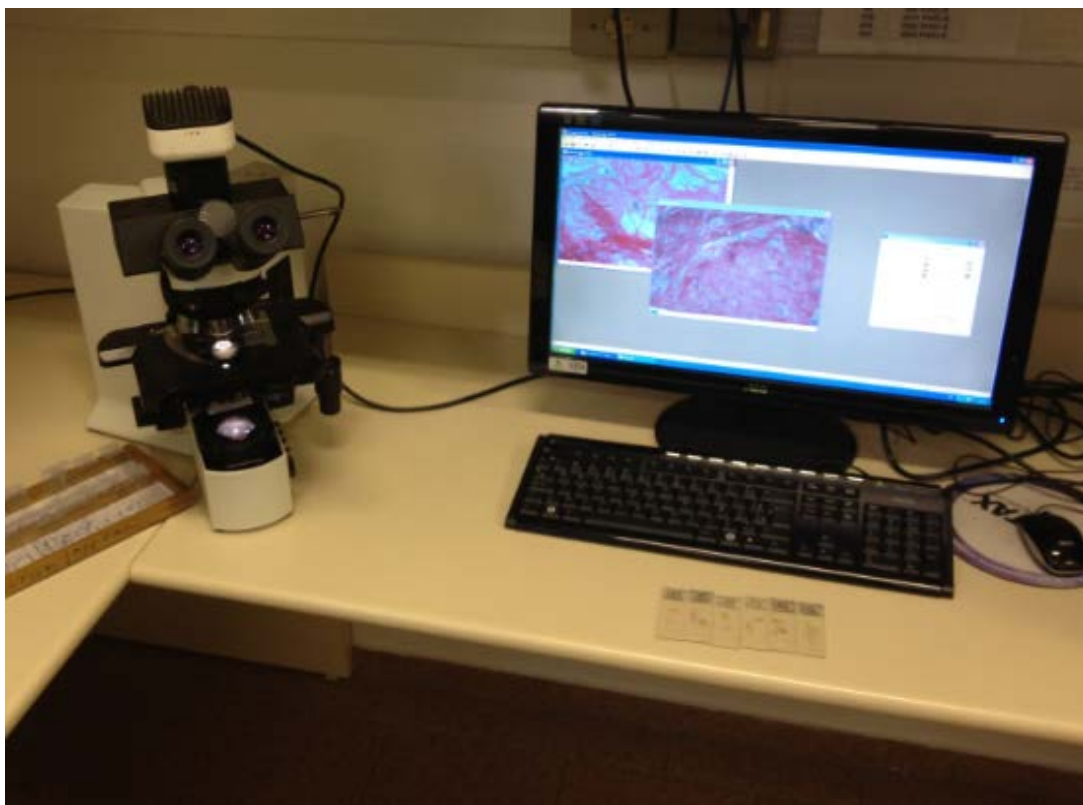
### MICROSCÓPICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

O estudo histológico foi feito no Laboratório de Patologia Experimental com a peça processada em parafina, cortadas com 4 µm e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A análise do colágeno qualitativamente e quantitativamente foi feita por técnica de imunohistoquímica com aplicação de anticorpo monoclonal anticolágeno tipo I e III. A avaliação quantitativa do colágeno total foi feita utilizando-se a técnica de picrossírius. A patologista que avaliou a microscopia não tinha conhecimento de qual grupo pertencia cada lâmina assim, portanto um ensaio cego. Ainda a profissional apresentava ampla expertise na análise deste tipo de material.

Na avaliação das lâminas de HE foi quantificado o número de neutrófilos, linfócitos, células gigantes (gigantócitos) e as voltas de macrófagos ao redor de cada filamento da tela. A

contagem destes tipos celulares foi em 10 campos amostrais para cada lâmina com aumento 200x sendo após realizada a média dos valores para fins estatísticos.

A técnica de videomorfometria ótica assistido por computador foi utilizado na quantificação do colágeno total e colágenos tipo I e III. O equipamento captava imagem das lâminas com auxílio de um microscópio Olympus <sup>4</sup> assistido a videocâmera tendo o sinal digitalizado em um computador Pentium de 133 megahertz (MHz). (Fig. 9) Cada lâmina teve capturada e digitalizada quatro imagens de campos diferentes, com aumento 200x, todas no mesmo dia e com as mesmas condições de luz. O número de pixels foi aferido digitalmente com auxílio do programa Image Pro Plus <sup>5</sup> versão 6.0.0.260. (Fig. 10) Esta tecnologia permitiu obter a média do número de pixels das imagens digitalizadas fornecendo os dados para o estudo estatístico.

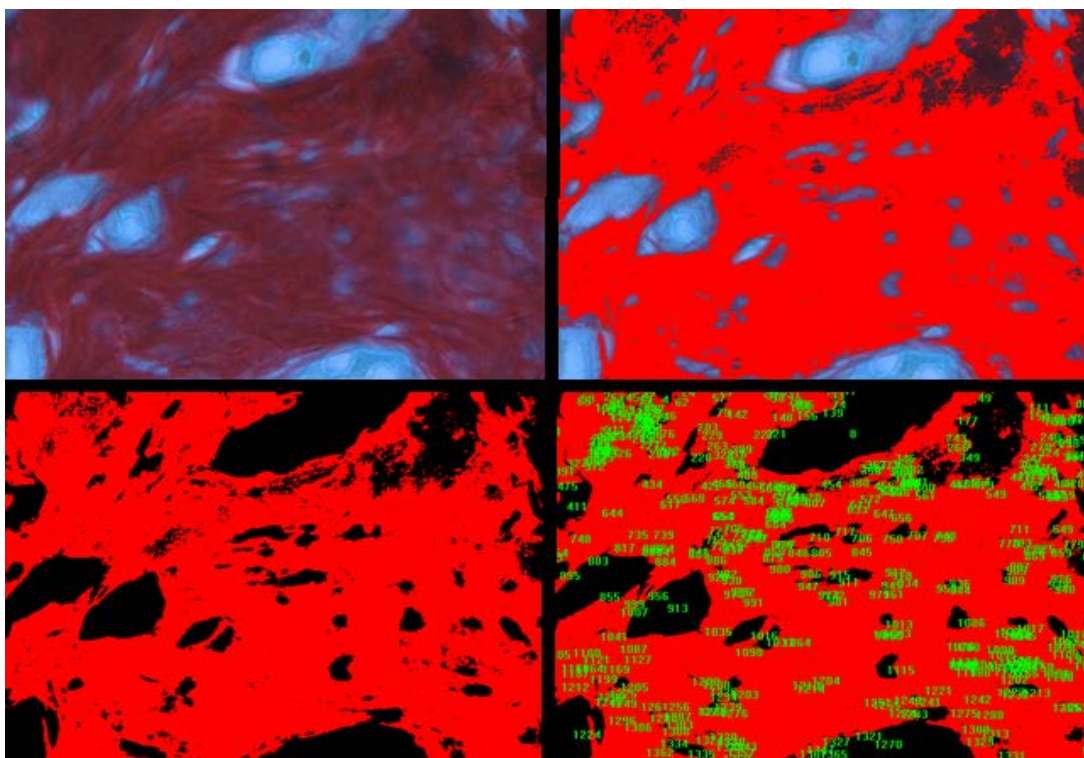


**Fig. 9** – Microscópio acoplado a computador utilizado na videomorfometria.

---

<sup>4</sup> Olympus Co,U.S.A.

<sup>5</sup> Media Cybernetics,Silverspring,U.S.A.



**Fig. 10** – Processo de análise videomorfométrica. Colágeno total corado com picrossírius e quantitativamente avaliado pelo número de pixels na imagem digitalizada.

## PROCESSAMENTO DOS DADOS

A análise estatística foi feita no Serviço de Bioestatística da Gerência do Programa de Pós-Graduação do HCPA. Utilizamos o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0. Os dados com distribuição normal foram analisados usando o teste t de student no nível de 95% de confiança ( $p < 0.05$ ), usando-se média e desvio-padrão. A diferença das médias (tamanho do efeito – E/S) foi uma análise estatística requintada que gerou conclusões mais elaboradas. A variável preditora do estudo foi o uso dois tipos de telas cirúrgicas e a variável desfecho a quantificação das aderências, o peso, os tipos celulares, o colágeno total, tipo I e III.

## IMPLICAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos adotados neste trabalho obedeceram aos critérios, às normas técnicas e os direitos internacionais de pesquisa com animais preconizados por normativas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA – <http://www.cobea.org.br/etica.htm#8>) e está em concordância com a legislação vigente.

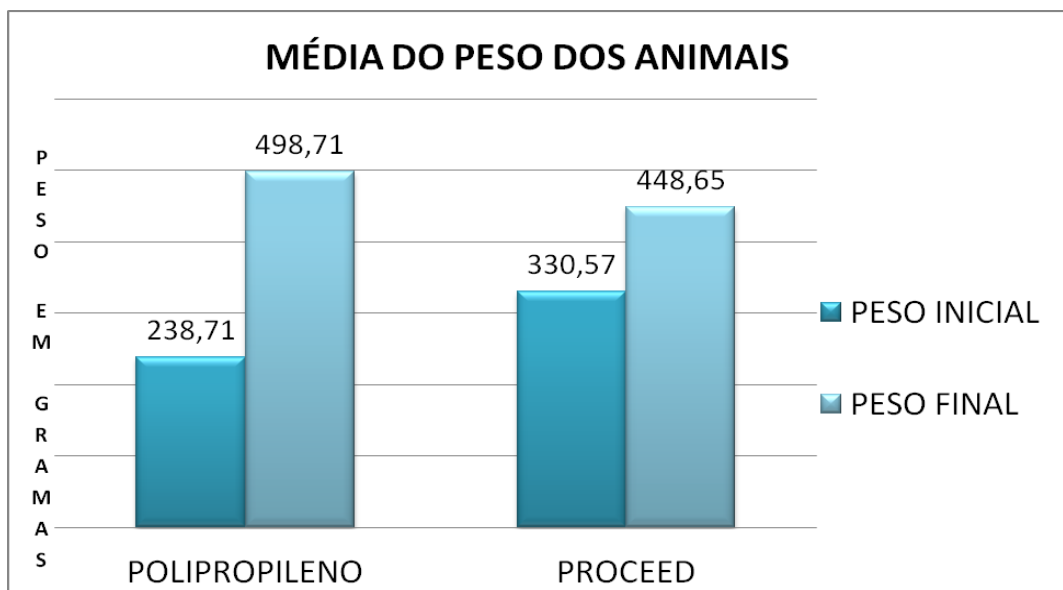
A pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) vinculado ao Grupo de Pesquisa de Pós-Graduação, e ligado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). O trabalho foi aprovado nos seus aspectos éticos e metodológicos sob o número *110079* e a carta de aceite é visível no Anexo A.

## **CONFLITO DE INTERESSES E FONTE DE FINANCIAMENTO**

Não há conflito de interesses e seguiram-se as normas para apoio financeiro a projetos de pesquisas do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## RESULTADOS

A média do peso entre os grupos é vista na Figura 11. O peso basal dos animais não foi significativamente diferente entre os grupos. (P=0,965) Igualmente a diferença de peso no nonagésimo dia entre os grupos polipropileno e Proceed não foi estatisticamente diferente. (P=0,241). (E/S -0,02 entre os grupos no início do trabalho e E/S 0,76 entre eles no fim do trabalho)

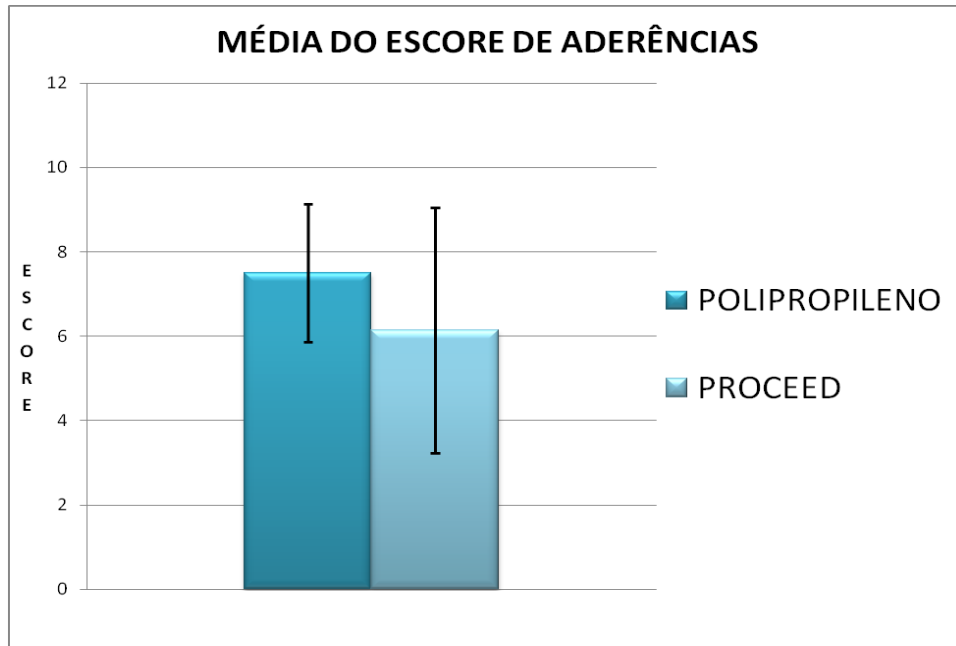


**Fig. 11** – Gráfico da média do peso em gramas dos grupos durante o estudo.

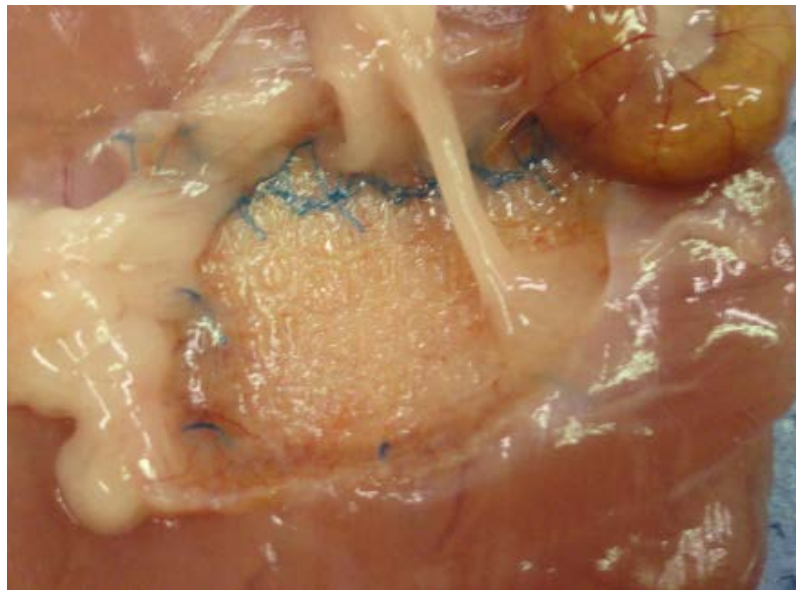
## ANÁLISE MACROSCÓPICA

A análise quantitativa revelou a média do escore de aderências do GP foi 7,5 (DP=1,65) e do GPC foi 6,14 (DP=2,91) (Fig. 12). Qualitativamente todos os animais do grupo polipropileno apresentaram aderência de epíplon à tela. No grupo Proceed um animal apresentou aderência de cólon (Fig. 13), um de intestino delgado e três de epíplon. Não houve significância estatística entre os grupos na variável aderência medida pelo escore próprio e o tamanho de efeito em favor do grupo polipropileno foi moderado. (P=0,335 e E/S=0,56 respectivamente)





**Fig. 12** – Gráfico demonstrando a média do escore de aderências. Valor mínimo 0 e máximo 11.

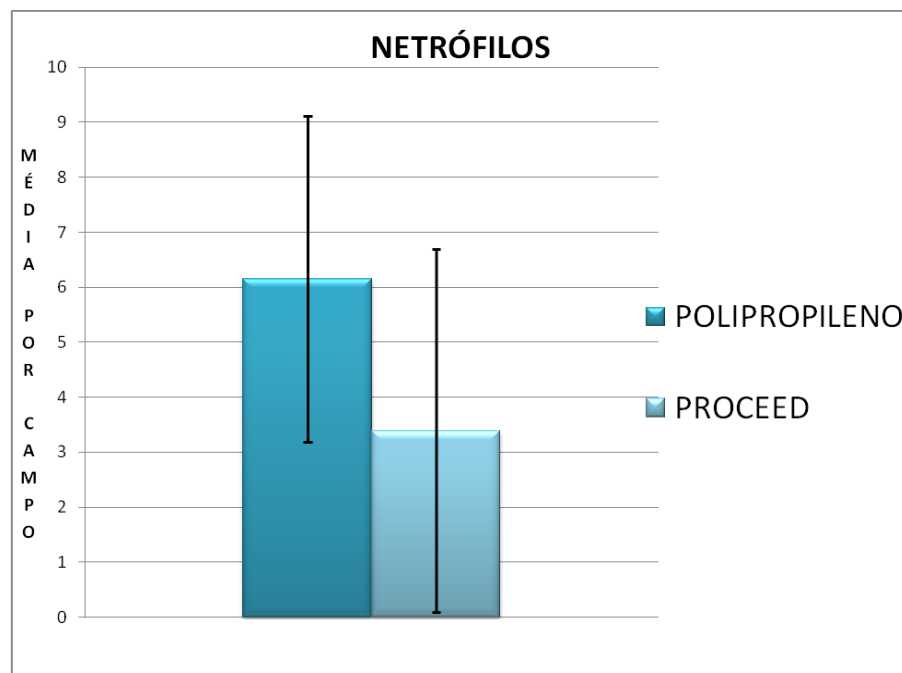


**Fig. 13** – Aderência de cólon e epíplon no grupo Proceed. Notadamente mais localizada na inserção da tela à parede.

## ANÁLISE MICROSCÓPICA

### NEUTRÓFILOS

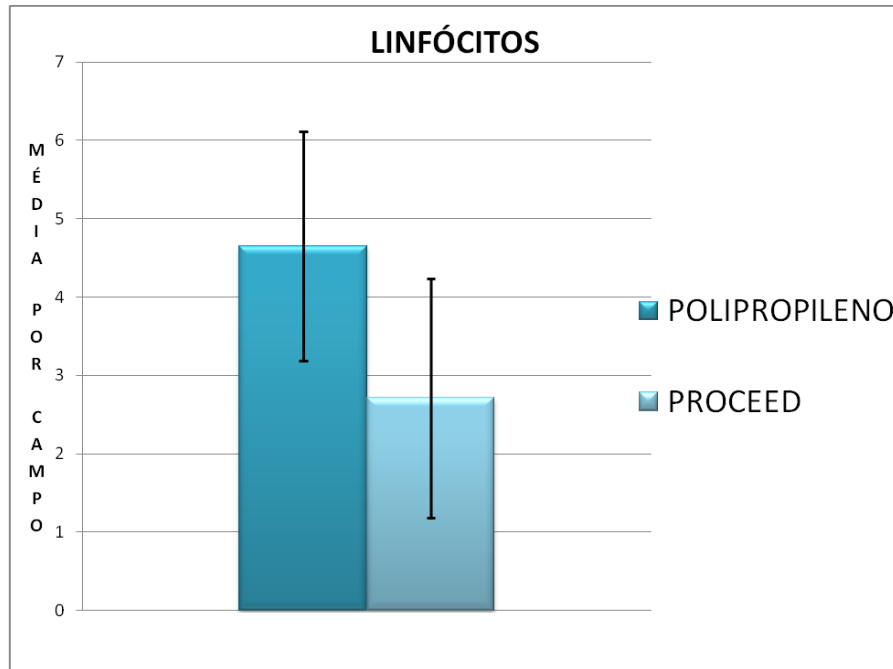
A média do número de neutrófilos do GP foi 6,15 por campo (DP=2,96) e de 3,39 por campo no GPC (DP= 3,30) sem diferença significativa entre eles. (P=0,142)



**Fig. 14** – Gráfico demonstrando a média do número de neutrófilos.

### LINFÓCITOS

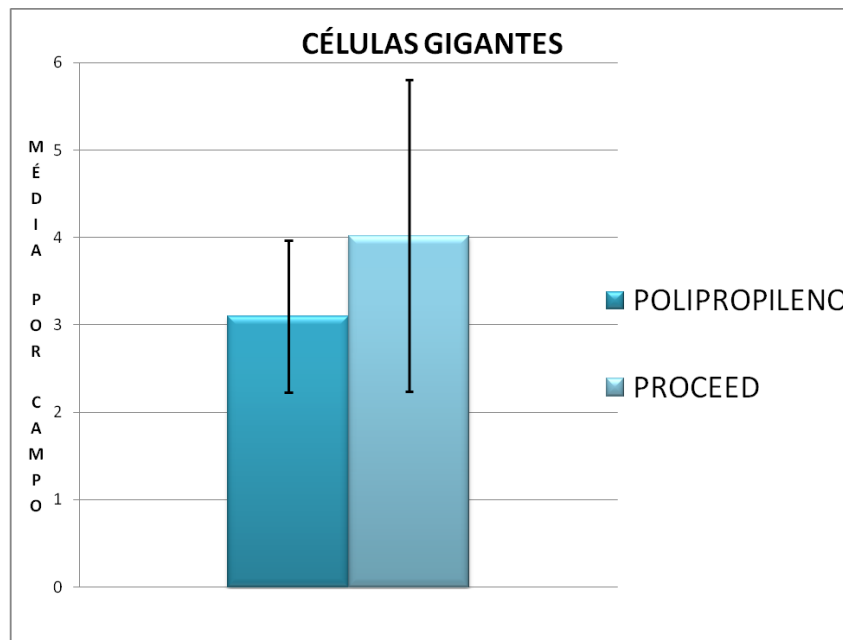
A média de linfócitos do GP foi 4,65 (DP=1,46) e do GPC foi 2,71 (DP=1,53). Houve significância estatística nesta variável (P=0,041).



**Fig. 15** – Gráfico demonstrando a média do número de linfócitos.

### CÉLULAS GIGANTES

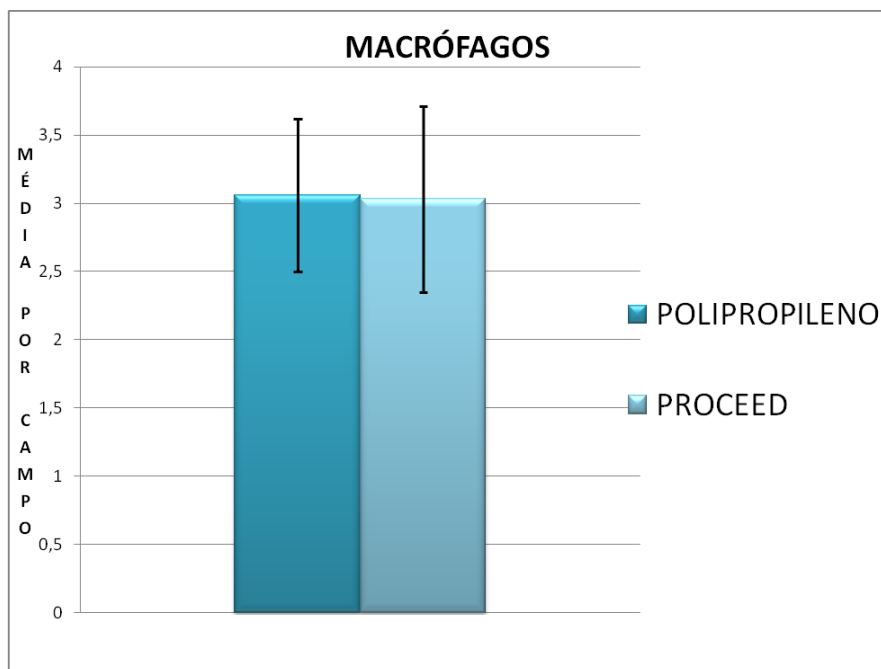
As células gigantes tiveram como média no GP 3,1 (DP=0,87) e no GPC 4,02 (DP=1,78). Não houve diferença nesta variável. (P=0,260)



**Fig. 16** – Gráfico demonstrando a média do número de células gigantes.

## MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram avaliados pelo número de voltas que apresentavam ao redor de cada filamento da tela. O GP teve 3,06 (DP=0,56) e GPC foi 3,03 (DP=0,68) voltas de macrófagos. Não houve diferença estatística. (P=0,940)



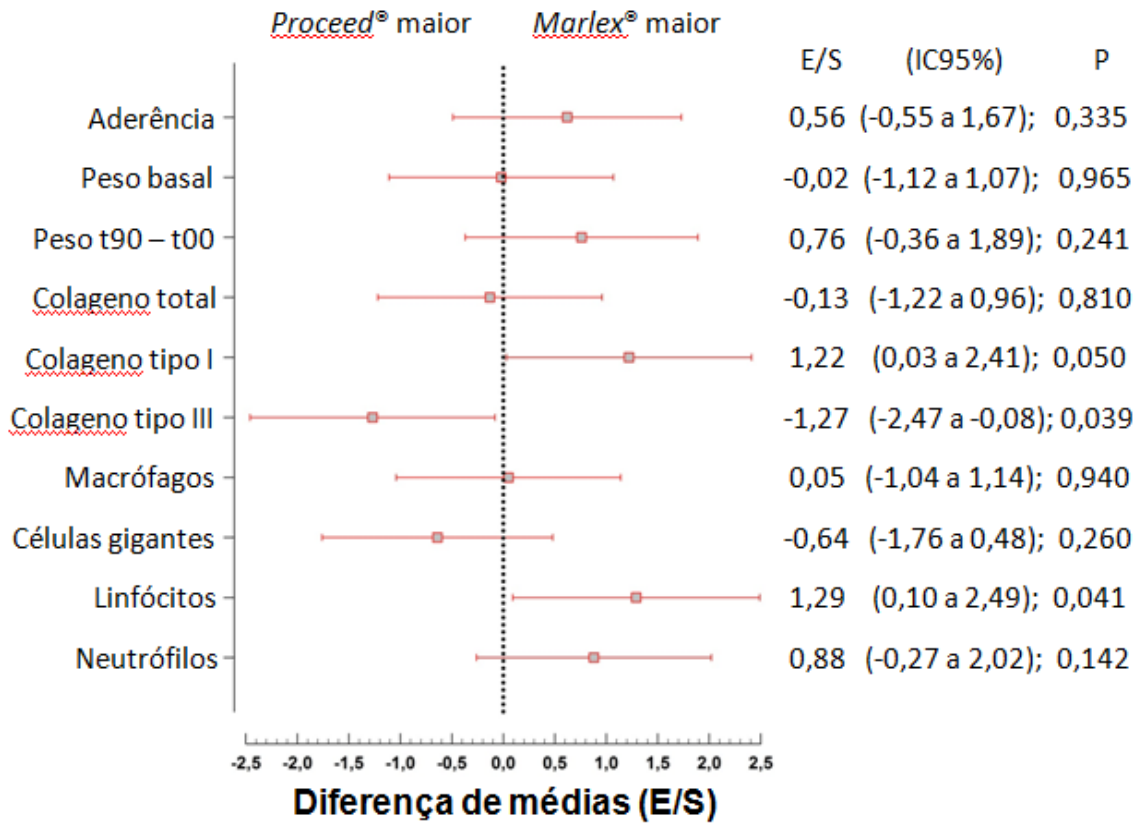
**Fig. 17** – Gráfico demonstrando a média do número de macrófagos.

## ANÁLISE VIDEOMORFOMÉTRICA

### COLÁGENO TOTAL, TIPO I e TIPO III

A média em pixels, para o grupo polipropileno, feita automaticamente por software específico foi para o colágeno total, tipo I e tipo III respectivamente 1777,68 (DP=586,62); 321,68 (DP=121,80); 241,51 (DP=586,52). O grupo Proceed teve 1889,77 (DP=1016,80); 201,91 (DP=72,55); 441,88 (DP=190,6) para a mesma sequência de variáveis citadas. Houve diferença estatística para a variável colágeno tipo III (P=0,039), não havendo para o colágeno tipo I (P=0,050). O colágeno total também não teve diferença estatística entre os grupos (P=0,810). Em relação ao tamanho do efeito, notamos que o colágeno tipo III tem grande tamanho de efeito no grupo Proceed, demonstrando com isso intensa expressão deste tipo naquele grupo.

O tamanho do efeito (*effect size - E/S*) de cada variável do estudo pode ser visto na Figura 18. O gráfico de floresta é um diagrama que ilustra a diferença de médias para cada uma das variáveis selecionadas.



**Fig. 18** – Gráfico de floresta representando as diferenças de médias padronizadas (E/S) entre as variáveis selecionadas para os grupos tratados com a Proceed e de polipropileno.

## DISCUSSÃO

A prótese de polipropileno, experimentalmente descrita no fim da década de 50 por Usher, foi considerada desde então de grande importância no reparo de defeitos herniários em humanos.<sup>17</sup> A literatura é rica em pesquisa com este tipo de prótese e seu uso é suportado amplamente. A prótese ideal não pode ser alterada em fluídos orgânicos, produzir baixa reação de corpo estranho, ser quimicamente inerte, não alergênica, capaz de suportar tensões mecânicas, propiciar adequada síntese de tecido conjuntivo e deposição de colágeno e ser passível de processo de esterilização sem perder suas características.<sup>22</sup> A prótese de polipropileno consegue atender boa parte destas características. Por se tratar de uma tela de alto peso, a quantidade maior de material presente, bem como o tamanho dos poros pode gerar aderências<sup>23</sup> de forma mais intensa.

O tema que se impõe é o desenvolvimento de aderências intra-abdominais quando se faz uso deste tipo de tela. Aderências pós-operatórias têm sido relatadas entre 56-100% com taxas de complicações também não desprezíveis variando desde 20-50% para dor pélvica crônica até 74% para obstrução intestinal. O uso de materiais de barreira buscando reduzir as aderências têm sido constantemente pesquisado, entretanto algumas vezes os resultados são contraditórios.<sup>6 7 10 24</sup>

A comparação primordial deste trabalho foi analisar uma tela de uso consagrado na clínica cirúrgica (polipropileno) com uma prótese revestida. O tempo de seguimento da pesquisa, noventa dias, foi estabelecido em virtude de não haver na literatura artigos com seguimento prolongado. A prótese revestida por se tratar de uma nova terapêutica no tratamento da hérnia estudos em humanos são escassos, portanto o modelo de estudo animal é adequado aos objetivos da pesquisa. Comparações diretas em humanos de materiais inabsorvíveis com bioabsorvíveis são escassos sendo incerto as complicações à longo prazo.<sup>23</sup>

Informações técnicas disponibilizadas pelo fabricante da prótese revestida referem como sendo constituída de polipropileno, polidioxonona e de um composto de barreira anti-aderência bioabsorvível chamado celulose oxidada regenerada (Surgicel®). Esta última camada tem sido empregada na prevenção de aderências intra-abdominais e como barreira hemostática.<sup>25</sup> A camada de polímero de polidioxonona encapsula a camada de polipropileno à de celulose oxidada regenerada juntando-as. A camada de polipropileno é uma malha de

baixo peso flexível e que permite o crescimento tecidual por entre seus poros sendo responsável pela adesão da prótese.

O modelo de criação da hérnia incisional demonstrou ser eficaz e condizente com os objetivos da pesquisa, assim como previamente estudado.<sup>24</sup> A fixação da tela em íntimo contato com as vísceras foi primordial e se demonstrou adequada à análise das aderências. A totalidade dos animais teve uma satisfatória síntese das bordas da prótese à parede abdominal anterior.

A análise dos dados demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os pesos dos animais no início do trabalho e um tamanho do efeito desprezível mostrando, portanto a equanimidade na seleção dos grupos. Igualmente o peso ao fim dos noventa dias não foi estatisticamente diferente entre os grupos tratados. Todos os treze animais tiveram aumento de peso no tempo de seguimento de noventa dias tendo um aumento maior, avaliado pelo tamanho do efeito, no grupo polipropileno ao fim do trabalho.

Idealmente planejado com sete animais em cada grupo e com um tempo de seguimento que poderia propiciar perdas ao longo do estudo; no entanto ao término tivemos apenas um óbito e o restante dos animais completaram o estudo sem complicações relacionadas à inserção das próteses. O óbito ocorreu em um animal do grupo polipropileno provavelmente decorrente de infecção respiratória no primeiro mês de seguimento. Esta perda não impactou negativamente na análise estatística global do trabalho na medida em que utilizamos um recurso estatístico chamado tamanho de efeito (effect size – E/S). O uso do tamanho de efeito agrega informações ao conceito de significância estatística. Cada vez mais este tipo de abordagem vem sendo estimulada, e até exigida pelas publicações da área científica. Portanto esta análise estatística é um importante complemento ao teste de significância da hipótese nula.<sup>26</sup> O tamanho do efeito permitiu conclusões mais apuradas de quanto uma tela é superior à outra para as mesmas variáveis estudadas. Isto, de fato, agrega conhecimentos que não seriam gerados com o “simples” teste de significância da hipótese nula.

No gráfico de floresta da Figura 18 notamos todos os tamanhos do efeito fornecendo a dimensão da diferença entre as próteses para cada uma das variáveis do trabalho. Este gráfico, diferença de médias, explica os resultados da pesquisa na sua totalidade sendo, portanto um painel dos achados da pesquisa.

A pesquisa das aderências pelo escore e a análise de materiais de barreira tem sido constante na literatura cirúrgica.<sup>24 27 28</sup> Nesta variável, aderência, não houve diferença

estatística entre as telas e o tamanho do efeito foi pequeno. O entendimento do conceito do tamanho do efeito é primordial, pois com ele podemos ver a diferença real entre os grupos mesmo com a hipótese nula não refutada para algumas variáveis. Valores do tamanho do efeito de até 0,20 são considerados pequenos, entre 0,20 e 0,50 médios e maiores que 0,80 grandes.<sup>29</sup> A magnitude do efeito na variável aderência é pequena entre as duas próteses, e, isto gera o entendimento de que a tela revestida não diminui as aderências até o nonagésimo dia pós-operatório. A prótese revestida é composta por polipropileno, polidioxonona e celulose oxidada regenerada. Esta última é um composto bioabsorvível que é absorvido em vinte e oito dias. Portanto ao término do trabalho, aos noventa dias, este material foi completamente absorvido e não era notado macroscopicamente.

O que podemos formular é que a absorção da celulose oxidada regenerada expõe a camada de polipropileno ao conteúdo visceral abdominal e que por consequência ocasionou as aderências encontradas. Outro trabalho experimental demonstrou que a celulose oxidada regenerada gerou aderência em quase metade dos animais do estudo.<sup>25</sup>

A distribuição das aderências no grupo revestido deu-se de maneira irregular, mais intensamente nas bordas da prótese que estavam em contato com a parede abdominal. O uso de fio de polipropileno na sutura de fixação da tela à parede pode explicar as aderências mais localizadas na periferia da tela (Figura 13). No grupo polipropileno as aderências se fizeram de forma mais distribuídas em toda a área da tela semelhante a outros estudos.<sup>27 28</sup> Todos os animais do grupo polipropileno tiveram aderências de epíplon, mas também intestino delgado e cólon. Este achado é bem descrito por inúmeros trabalhos disponíveis.<sup>16 17 24 25 27 28</sup> As aderências podiam ser facilmente destacadas da tela em ambos os grupos. Adesões das telas inabsorvíveis são conhecidas e diversos graus de aderências podem estar presentes ocorrendo formação de reação de corpo estranho quando este tipo de prótese é utilizada. O processo de formação das aderências é complexo sendo basicamente iniciado pelo processo de injúria tecidual que rompe o balanço entre coagulação e fibrinólise. A deposição de fibrina resulta em uma matriz onde os fibroblastos produzem matriz extra-celular. O término do processo gera diversos graus de aderências.<sup>23</sup> As tentativas de inibição, ou minimização desta reação são inúmeras visto a morbidade relacionada às aderências. As biopróteses buscam reparação tecidual nativa com menos atividade inflamatória e formação de corpo estranho.<sup>23</sup> Estudo experimental em coelhos demonstrou que até 40% das telas estruturadas com polipropileno mesmo revestidas com materiais bioabsorvíveis causam aderências em modelo animal.<sup>30</sup>



A análise do colágeno foi realizada com auxílio de imuno-histoquímica agregado com a tecnologia de videomorfometria computadorizada o que permitiu uma caracterização quantitativa da variável colágeno (total, tipo I e tipo III). O número de pixels de cada foto forneceu dados quantitativos, pois se sabe que este tipo de dado é melhor que o qualitativo na estatística. Para tal fizemos a média do número de pixels de quatro campos em cada lâmina. Pixel é a aglutinação de *Picture* e *Element* sendo o menor elemento num dispositivo de exibição. De maneira prática é o menor ponto que forma uma imagem. Assim após a confecção das lâminas de imuno-histoquímica, as imagens foram digitalizadas e apenas os segmentos com tonalidade acastanhada foram aferidos em pixels. Este tipo de técnica é bem estruturado no grupo de pesquisa e publicações utilizaram esta metodologia. A pesquisa do colágeno com utilização da metodologia imuno-histoquímica torna o trabalho confiável sendo sua utilização fundamental na identificação dos colágenos I e III.<sup>31 32</sup>

O colágeno tipo I não foi estatisticamente significativo entre os grupos com um tamanho de efeito grande (1,22) em favor do grupo polipropileno. A argumentação disto é de que o colágeno tipo I foi encontrado mais no grupo polipropileno do que no grupo Proceed mesmo não havendo significância estatística.

O colágeno tipo III foi estatisticamente significativo entre os grupos sendo o tamanho do efeito grande (-1,27) em favor ao grupo revestido. O significado é de que o colágeno tipo III foi expresso com uma dimensão muito grande no grupo revestido. As alterações do metabolismo do colágeno e do tecido conjuntivo contribuem para formação de hérnia. Estudos demonstraram que pacientes com hérnia apresentam grande quantidade de colágeno tipo III. Este tipo de colágeno é considerado imaturo, fraco e que propicia fibras frágeis e de qualidade não ideal sendo encontrado nas fases iniciais de cicatrização.<sup>33</sup> No presente trabalho o colágeno tipo III foi expresso mais no grupo revestido e com base no resultado da pesquisa isto poderia aumentar a formação de hérnias. Não somente a expressão do colágeno tipo III se faz mais intensamente em pacientes com hérnia mas também a própria redução da síntese de colágeno pelos fibroblastos.<sup>32</sup> Por se tratar de uma prótese relativamente nova não há dados de pesquisas *in vivo* com tempo de seguimento razoável para podermos associar estes resultados à clínica cirúrgica diária.

Assim também o colágeno total não foi estatisticamente significativo entre os grupos com uma força de associação extremamente pequena (-0,13). Entretanto a análise do colágeno tipo I e III foi fundamental para a análise crítica das próteses. Sabe se que o colágeno tipo I é

encontrado em tecidos cicatriciais maduros e a diminuição da relação colágeno I:III é associada a formação de hérnias.<sup>33</sup> A incidência de hérnia incisional e sua recidiva estão relacionadas ao metabolismo do colágeno tendo causas metabólicas envolvidas, assim como tabagismo, hormônios e uso de drogas. A formação herniária é influenciada por alterações na matriz extracelular e estudos epidemiológicos demonstram um defeito na biologia do tecido de cicatrização.<sup>34</sup>

A histologia das próteses não se notou diferença nos macrófagos, células gigantes e neutrófilos, sendo, portanto não significativas. Somente os linfócitos apresentaram diferença estatisticamente significativa. Como a análise foi em um único tempo aos noventa dias não podemos fazer inferências sobre o comportamento celular em mais de um tempo como relatado por outros.<sup>35</sup> Sabemos que os linfócitos foram o único tipo celular que mostrou diferença significativa. Estes estão envolvidos na resposta inflamatória inespecífica, recrutam macrófagos e influenciam diretamente a atividade fagocitária.<sup>35</sup>

Evidências do uso de próteses são fortes e amplamente suportadas pela literatura, entretanto a seleção do tipo de prótese que poderá ser utilizada não nos parece uma decisão simples. Características particulares da prótese e do paciente devem ser sempre analisadas em conjunto para uma adequada a escolha. Escassos estudos clínicos são disponíveis com a prótese revestida. Um dos poucos disponíveis mostra que em cirurgia videolaparoscópica de correção de hérnia ventral é uma prótese adequada e com baixos índices de complicações.<sup>36</sup>

O que apresentamos com este trabalho foi que, em modelo experimental, o uso da tela com mecanismo de barreira não exclui a possibilidade de ocorrência de aderências. Por conseguinte todas as complicações inerentes ao processo de formação de aderências como obstrução intestinal, fístulas, granulomas poderão por ventura ser constatadas com o uso deste tipo de prótese. De fato como mencionado não se dispõe de dados de ensaios clínicos com seguimento em longo prazo com a utilização da tela revestida. Inúmeros tipos de materiais são rotineiramente pesquisados em busca da mais adequada barreira para evitar aderências. Esta pesquisa trouxe mais alguns dados, que em conjunto, podem formular uma linha de pensamento e de conduta para a condução de pacientes portadores de hérnia. Por fim, estudos clínicos ulteriores deverão trazer a tona, com um grau de evidência superior, informações sobre o comportamento dos indivíduos que foram tratados com este tipo de tela.

## **CONCLUSÕES**

1. A quantidade de aderências não foi diferente para as telas de polipropileno e polipropileno revestido.
2. O colágeno tipo I é mais presente na tela de polipropileno (E/S).
3. O colágeno tipo III é mais presente na de polipropileno revestido (E/S)
4. A quantidade de colágeno total não apresentou diferença entre as telas.
5. O número de linfócitos é maior no grupo polipropileno revestido. (E/S)

## ANEXO A



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110079

**Data da Versão do Projeto:** 18/04/2011

**Pesquisadores:**

LUCAS FÉLIX ROSSI

MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE

**Título:** COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA PERITONIAL DAS TELAS DE POLIPROPILENO E POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 18 de julho de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA

## REFERÊNCIAS

1. Skinner, H.L. and J.L. Elliott, *Incisional hernia*. N Y State J Med, 1951. **51**(11): p. 1424-6.
2. Andreollo, N.A., et al., *Hérnias incisionais: avaliação do tratamento cirúrgico*. Revista Paulista de Medicina, 1984. **102**(1): p. 23-6.
3. Acquaroni, D., *Hérnia Incisional*, in *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto*, E.J. Zerbini, Editor 1974, Sarvier: São Paulo. p. 100-7.
4. Mittelstaedt, W.E.M., et al., *Hérnias incisionais: revisão de 228 casos operados no hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo*. Revista Paulista de Medicina, 1986. **104**: p. 117-27.
5. Jenkins, S.D., et al., *A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects*. Surgery, 1983. **94**(2): p. 392-8.
6. Liakakos, T., et al., *Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia*. Br J Surg, 1994. **81**(2): p. 248-9.
7. Usher, F.C., *A new technique for repairing large abdominal wall defects*. . AMA Arch Surg, 1961. **82**: p. 108-15.
8. Cassar, K. and A. Munro, *Surgical treatment of incisional hernia*. Br J Surg, 2002. **89**(5): p. 534-45.
9. Chan, G. and C.K. Chan, *A review of incisional hernia repairs: preoperative weight loss and selective use of the mesh repair*. Hernia, 2005. **9**(1): p. 37-41.
10. Usher, F.C., et al., *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. II. Clinical studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 138-45.
11. Mudge, M. and L.E. Hughes, *Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes*. Br J Surg, 1985. **72**(1): p. 70-1.
12. Ellis, H., H. Gajraj, and C.D. George, *Incisional hernias: when do they occur?* Br J Surg, 1983. **70**(5): p. 290-1.
13. Piazzese, E., et al., *Incidence, predisposing factors, and results of surgical treatment of incisional hernia after orthotopic liver transplantation*. Transplant Proc, 2004. **36**(10): p. 3097-8.
14. Neto, J.M.K., *Hérnia Incisional*, in *Hérnias da Parede Abdominal*, Á.L.d. Silva, Editor 1997, Atheneu: Rio de Janeiro.
15. Garland, J.G., *Incisional hernia*. Wis Med J, 1952. **51**(11): p. 1079-80.
16. Goldenberg, A., et al., *Comparative study of inflammatory response and adhesions formation after fixation of different meshes for inguinal hernia repair in rabbits*. Acta Cirurgica Brasileira, 2005. **20**: p. 347-352.
17. Usher, F.C. and J.P. Gannon, *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. I. Experimental studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 131-7.
18. Dilege, E., et al., *Prevention of adhesion to prosthetic mesh in incisional ventral hernias: comparison of different barriers in an experimental model*. Eur Surg Res, 2006. **38**(3): p. 358-64.
19. Gaertner, W.B., M.E. Bonsack, and J.P. Delaney, *Visceral adhesions to hernia prostheses*. Hernia, 2010. **14**(4): p. 375-81.
20. Hutchinson, R.W., M. Chadon, and L.T. Divilio *Pre-clinical abdominal adhesion studies with proceed surgical mesh*. Global Surgery, 2004.

21. Amid, P.K., *Polypropylene prostheses*, in *Abdominal Wall Hernias: Principles and management*, R. Bendavid, J. Abrahamson, and M.E. Arregui, Editors. 2001, Springer-Verlag: New York. p. 272-77.
22. Turza, K.C. and C.E. Butler, *Adhesions and meshes: synthetic versus bioprosthetic*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. **130**(5 Suppl 2): p. 206S-13S.
23. d'Acampora, A.J., et al., *Experimental study comparing the tensile strength of different surgical meshes following aponeurotic-muscle deformity synthesis on Wistar rats*. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2007. **22**: p. 47-52.
24. Balbinotto, R.P., et al., *Barrier methods used to prevent pelvic adhesions in videolaparoscopy: experimental study in female rabbits*. *Surg Endosc*, 2011. **25**(8): p. 2637-42.
25. Lindenau, J.D.R. and L.S.P. Guimarães, *Calculando o tamanho de efeito no SPSS*. *Rev HCPA*, 2012. **32**(3).
26. Lontra, M.B., et al., *Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de polipropileno na formação de aderências intraperitoneal: um modelo experimental em ratos*. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2010. **37**: p. 364-369.
27. Costa, R.G.d., et al., *Polylactic acid film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats*. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2009. **24**: p. 128-135.
28. Loureiro, L.M.J. and M.G.H. Gameiro, *Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística*. *Revista de enfermagem referência*, 2011. **3**: p. 152-62.
29. Novistky, Y.W., et al., *Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit*. *J Surg Res*, 2007. **1**(140): p. 6-11.
30. Fachinelli, A., M.R. Trindade, and F.A. Fachinelli, *Elastic fibers in the anterior abdominal wall*. *Hernia*, 2011. **15**(4): p. 409-15.
31. Gonçalves, R.O., et al., *Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal*. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2003. **30**: p. 286-292.
32. Henriksen, N.A., et al., *Connective tissue alteration in abdominal wall hernia*. *Br J Surg*, 2011. **98**(2): p. 210-9.
33. Rosch, R., et al., *Hernia - A Collagen Disease?* *Eur. Surg.*, 2003. **35**(1): p. 11-5.
34. Zogbi, L., et al., *Retraction and fibroplasia in a polypropylene prosthesis: experimental study in rats*. *Hernia*, 2010. **14**(3): p. 291-8.
35. Rosenberg, J. and J. Burcharth, *Feasibility and outcome after laparoscopic ventral hernia repair using Proceed mesh*. *Hernia*, 2008. **12**(5): p. 453-6.

**FEDERAL UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL  
MEDICAL SCHOOL  
GRADUATE PROGRAM IN MEDICINE; SURGICAL SCIENCES**

**MASTER'S THESIS**

**PERITONEAL ADHESION, TYPE I, III AND TOTAL  
COLLAGEN ON POLYPROPYLENE AND COATED  
POLYPROPYLENE MESHES: EXPERIMENTAL STUDY IN  
RATS**

M.Sc student: LUCAS FÉLIX ROSSI

Advisor: Prof. Dr. MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE

PORTO ALEGRE, 2013

## **PRESENTATION**

M.Sc thesis entitled *PERITONEAL ADHESIONS, TYPE I, III AND TOTAL COLLAGEN ON POLYPROPYLENE AND COATED POLYPROPYLENE MESHES: EXPERIMENTAL STUDY IN RATS*, presented to the Graduate Program in Medicine: Surgical Sciences to obtain the Master's Degree from the Federal University of Rio Grande do Sul. The ethical and methodological aspects of this work were approved according to the National and International Guidelines and Standards that govern the scientific use of animals in experiments ( number 1100-79 CEUA/HCPA).



## ABSTRACT

**Introduction:** Hernia correction is a routinely performed treatment in surgical practice. The improvement of the operative technique and of the available materials has greatly benefited the quality of surgery results. The insertion of prostheses for hernia correction is well-founded in the literature, and has become the standard of treatment for this type of disease. The purpose of this study is to evaluate two available prostheses: the polypropylene and polypropylene coated ones in an experimental model.

**Methods:** Seven prostheses of each kind were inserted into Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus*) in the anterior abdominal wall of the animal in direct contact with the viscerae. After a ninety-day follow up we analyzed the intra-abdominal adhesions, and also performed an immunohistochemical evaluation and videomorphometry of the total, type I and type III collagen. Histological analysis was also performed with hematoxylin-eosin to evaluate cell types present in each mesh.

**Results:** At ninety-days the adhesions were not different among the groups ( $P=0.335$ ). Likewise, total collagen was not statistically different ( $P=0.810$ ). Type III collagen was statistically greater in the coated polypropylene group ( $P=0.039$ ) while type I collagen was not different among the prostheses ( $P=0.050$ ). The lymphocytes were statistically more present in the polypropylene group ( $P=0.041$ ).

**Conclusion:** The coated prosthesis was not different from the polypropylene one regarding the adhesion variable. Total and type I collagen were not different among the groups, while type III collagen is found more on the coated mesh. There was a greater number of lymphocytes on the polypropylene mesh.

**Key words:** Surgery. Animal model. Hernia. Surgical meshes. Tissue adhesions.

## **SUMMARY**

<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>INTRODUCTION</b> .....	44
<b>OBJECTIVE</b> .....	47
<b>METHODS</b> .....	48
<b>ETHICAL IMPLICATIONS</b> .....	59
<b>CONFLICT OF INTEREST AND SOURCE OF FUNDING</b> .....	60
<b>RESULTS</b> .....	61
<b>DISCUSSION</b> .....	66
<b>CONCLUSIONS</b> .....	72
<b>REFERENCES</b> .....	74
<b>ANNEX (LETTER OF APPROVAL FOR THE STUDY</b> .....	73
<b>ORIGINAL ARTICLE VERSION IN PORTUGUESE/ENGLISH</b>	

## INTRODUCTION

Incisional hernia repair has been a problem for surgeons ever since the beginning of abdominal surgery.<sup>1 2</sup> Incisional hernia is the protrusion of the abdominal content through a weak point in the wall, constituted by the scar from the previous surgery. It is also called laparocoele or postoperative hernia<sup>3</sup>, and is different from the diastasis of the rectus muscles due to the absence of the aponeurotic lamina between the peritoneum and the skin, and obviously, by the absence of any previous surgery.<sup>4</sup>

The synthesis of the abdominal wall in complex situations such as severe infections, large incisional hernias, massive loss of tissue, necrosis and tumors is a difficult problem for the general surgeon to solve, especially when they do not have sufficient autogenous tissue available for adequate primary closure.<sup>5 6 7</sup> The increased number of laparotomies under conditions considered unfavorable led to situations of difficult, sometimes even impossible abdominal closure, which, consequently increased the prevalence of IH. It is a major cause of morbidity in the patients who have this kind of hernia<sup>8</sup> interfering in the quality of life and cosmetic results.<sup>9</sup>

Attempts at closing large defects by different procedures, including relaxing incisions, often result in hernias or hernia recurrence, because the tensile factor is not taken into account.<sup>10</sup>

The incidence of incisional hernia varies from 1 to 11%, increasing greatly if the cavity is closed under tension.<sup>6</sup> Mudge published a cohort with ten years of follow-up, including hundreds of patients who underwent some abdominal surgery. Out of the total of 337 patients who completed the 10 years of the study, 11% developed hernias and 35% of them presented this condition five or more years after the base surgery. The most significant aspect of this publication is that the incidence of IH is similar both in short and long follow-ups. Most of the data on this in the literature indicate the incidence of IH after one year, but there is evidence indicating occurrence five years after surgery.<sup>11</sup> This shows that IH continues to appear even several years after the base intervention.<sup>12,13</sup>

Mittelstaedt et cols say that the type and location of laparotomic incisions are very important for the development of eventrations. There appears to be a greater tendency for longitudinal incisions to evolve to incisional hernias. Their onset is more often found in patients who present severe ascitis<sup>4 14</sup>, a body mass index greater than 25, type of incision

and presence of postoperative complications.<sup>15</sup> We can cite a few other predisposing conditions related to the patient, such as obesity, excessive abdominal effort, postoperative abdominal distension<sup>3</sup>, anemia, prolonged bed rest, diabetes, malnutrition (hypoproteinemia), vitamin C deficiency, infection<sup>14</sup>, smoking<sup>15</sup>.

Certainly, the presence of infection is the main local etiological factor for the development of IH. The infection process is associated with suppurative necrosis that destroys the tissues, loosening the sutures that approach the aponeurotic borders and preventing the development of scar tissue.<sup>4</sup> When infection of the incision occurs, the frequency of incisional hernia can reach 15% to 30%.<sup>3</sup>

The large incisional hernias result from the loss of the abdominal domicile, which occurs when the abdominal content no longer is in the abdominal cavity, i.e., there is a lack of proportion between the container and the content. When there is a large abdominal hernia, many techniques are proposed, a great number of them using grafts and prostheses. The grafts mentioned are fascia lata, dura-mater, skin and the hernial sac itself, according to a technique by Alcino Lázaro da Silva. Another type of surgical technique is the one that uses synthetic prostheses that are available in many different varieties. Basically, synthetic prostheses may be of nylon, polypropylene, polytetrafluorethylene, polyvinyl, acrylonitrile, cellulose acetate, polyglactin 910,<sup>14</sup> polypropylene associated with synthetic polyglactine.<sup>16</sup>

## *LITERATURE REVIEW*

A synthetic material to be used as a prosthesis must obey a few basic principles: it must not be modifiable in the presence of tissue fluids, it must be chemically inert, not produce an inflammatory or foreign body type reaction, not be carcinogenic, it can not produce an allergy, it must be sterilizable, mechanically resistant and economically feasible.<sup>14</sup>

The success of vascular prostheses in the 1950s encouraged the industry to research and manufacture new materials. The polypropylene mesh was definitely one of the great advances of medical-surgical technology, repairing defects that could not previously be sutured. It is produced by the ethylene gas entrained in a solution and submitted to catalytic reaction at low pressures.<sup>10</sup>

The monofilamentary prostheses have produced better results than the multifilamentary ones. The former allow better integration, rapid fixation and low risk of

infection, with the infiltration of fibroblasts, collagen and macrophages in the synthetic mesh. The polypropylene mesh definitely led to a higher stage in the evolution of technological events, and its use is universally accepted.

Usher, in 1959, performing animal experiments using polypropylene meshes, became the pioneer in this kind of research. In this study, polypropylene and polytetrafluoroethylene meshes were compared, excising tissue from dogs and replacing the defect by the aforementioned prostheses. The results were favorable to the polypropylene mesh as regards the more uniform infiltration of the mesh into the neighboring tissues, the inertia of this mesh when infections occur, and the non-increase of scar tissue thickness. One of the most important characteristics of this mesh is that it is inert in the presence of infection, comparable to tantalum as to this property. It was also shown that there was no fragmentation of the mesh, nor diminished tensile force six weeks after its implantation.<sup>17</sup>

Due to the satisfactory results achieved, Usher continued research and published a clinical trial using polypropylene mesh in 78 cases. Excellent results were reported, without hernia recurrence rates. The material was considered inert in the presence of infection, since three patients developed an abscess that was cured with drainage and a specific antibiotic alone, and in none of the cases was it necessary to remove the mesh. Palpation of the surgical wound two to three months after surgery showed a firm consistency of the abdominal wall. The ends of the mesh were difficult to distinguish from the neighboring tissue and there were no signs of wrinkling and irregularities. As a final conclusion of this study it was described that polypropylene mesh can be a valuable supplement for the repair of hernias or other thoraco-abdominal defects.<sup>10</sup>

Subsequent work showed that the polypropylene mesh adhered firmly to the neighboring tissues, and large incisional hernias were operated on with perfect reconstruction of the abdominal wall with strength and flexibility.<sup>7</sup>

The polypropylene prosthesis is best for surgical treatment of IH.<sup>7 10 17</sup>

However, intra-abdominal placement causes a major formation of adhesions, and may result in serious complications such as intestinal obstruction and enterocutaneous fistulae.<sup>18</sup> In order to diminish the rate of complications and the possibility of direct contact between the mesh and the abdominal viscerae a mesh was developed, formed by polypropylene associated with a layer composed of regenerated oxidized cellulose. The purpose of the latter is to reduce adhesion formation (Proceed® Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA). Actually, according to the

manufacturer, meshes with biological barriers are associated with much less adhesion formation than those without this structure.

The choice of a mesh to repair incisional hernias may be a dilemma, since currently several types of products are available to treat them.<sup>19</sup> Therefore, we employed a mesh that is well-known for its use in surgical science, i.e., purely of polypropylene, with a new mesh available whose characteristic is the association of materials seeking to diminish intraperitoneal adhesions. The compound mesh was developed by Ethicon® for implantation in deep layers of the abdomen, aiming at intraabdominal pressure to keep it in position, and without visceral adhesion for this purpose when it is positioned in close contact with them. There is excellent tissue growth and resistance, with low rates of adhesions when it is used.<sup>20</sup>

Thus, this research study proposes to analyze primarily the adhesions with these two types of mesh, besides total, type I and type III collagen. Histology will analyze the cellular forms present in the prostheses.

## **OBJECTIVE**

### **GENERAL**

To compare the intraperitoneal adhesion of polypropylene and polypropylene meshes associated with regenerated oxidized cellulose in an experimental model.

### **SPECIFIC**

To quantify adhesion according to the score of adhesion for the polypropylene and coated polypropylene group.

To evaluate total, type I and III collagen by immunohistochemistry and compare them among the polypropylene and coated polypropylene meshes, using the computed videomorphometry technique.

To evaluate histologically, with hematoxylin-eosin, the cell types present in each prosthesis.

## **METHODS**

### **VENUE OF STUDY**

The study was conducted at the Unit of Animal Experimentation (UEA-Unidade de Experimentação Animal) and at the Unit of Experimental Pathology (UPE- Unidade de Patologia Experimental) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

## **SAMPLE**

We used an experimental model in apparently healthy male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing 303-368 grams. The statistical calculation was performed at the Biostatistics Unit of the Research Group of the Graduate Program at UFRGS, with the help of the Gpower program <sup>6</sup>. A total number of fourteen animals was found to perform the study, stipulating an alpha of 0.05% in the application, with a power of 90% and difference of two standard deviations between the means, and also with the aggregation of reference data of previously published articles.

## **SELECTION**

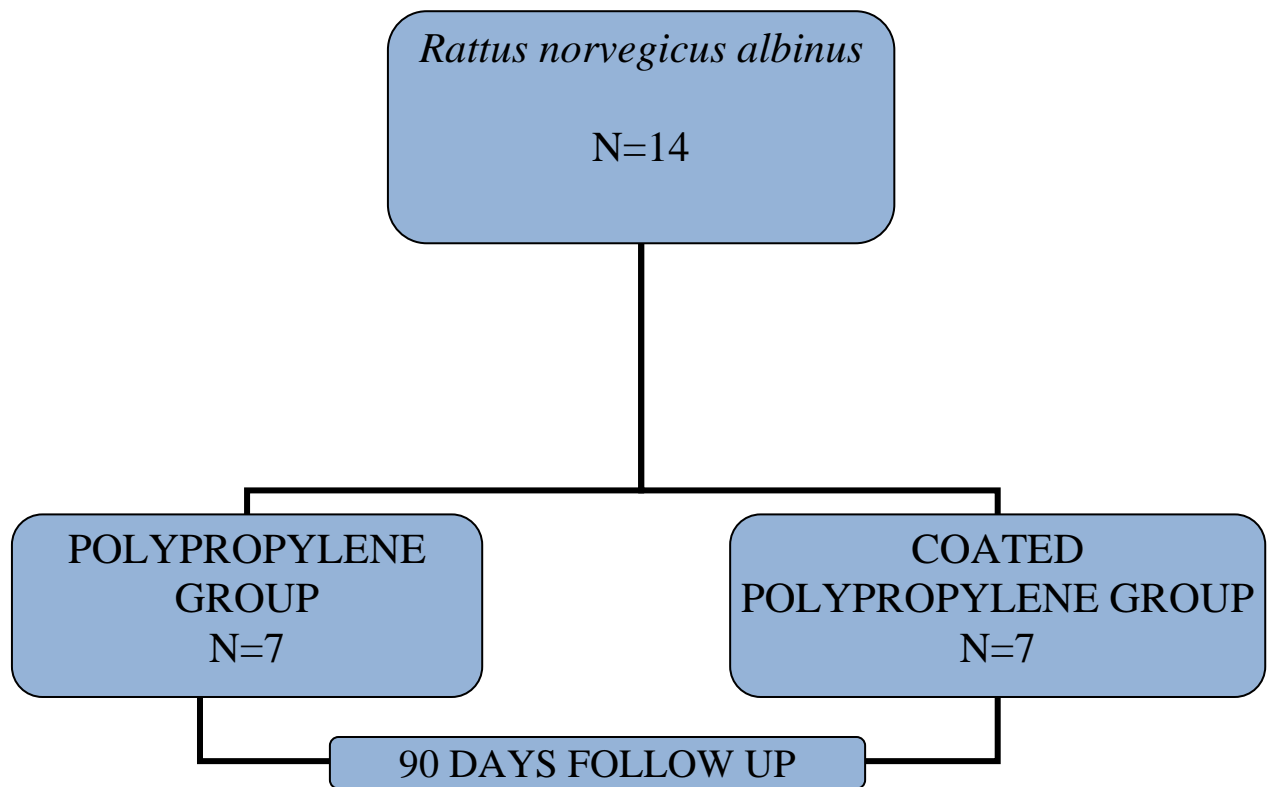
Before the experiment was performed, the animals remained fourteen days for environmental adaptation at the Unit of Animal Experimentation of the Research Center (CP) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. They were kept in polypropylene cages, 40x30x16 cm large, five animals per unit and in an artificially controlled environment with an adequate temperature (22°), continuous air flow, free of noise and stress, and obeying the 12/12 hour day and night cycles. During this period they received specific chow for small rodents and water *ad libitum*.

## **STUDY GROUPS**

---

<sup>6</sup> Available at <http://WWW.PSYCHO.UNI-DUESSELDORF.DE/ABTEILUNGEN/AAP/GPOWER3/>

According to the objective of the research study, the animals were allocated by simple randomization into two groups of seven exemplars, as follows:



***Polypropylene Group (GPP):*** polypropylene mesh measuring 3.0 centimeters long and 2.0 centimeters wide (6 cm<sup>2</sup>) to close the defect created on the abdominal wall.

***Coated Polypropylene Group (GPC):*** low density polypropylene mesh associated with regenerated oxidized cellulose (COR) and with polydioxone (PDS) – Proceed<sup>7®</sup>: the same procedures adopted in the polypropylene group using the aforementioned prosthesis.

The macroscopic and microscopic properties and characteristics of each prosthesis are clearly shown in Table 1 and Figures 1, 2 and 3. The names, coated polypropylene mesh, tissue separating mesh, compound prosthesis, or else the commercial name - Proceed<sup>®</sup> - are synonymous. At no time was there a conflict of interests in carrying out the research study.

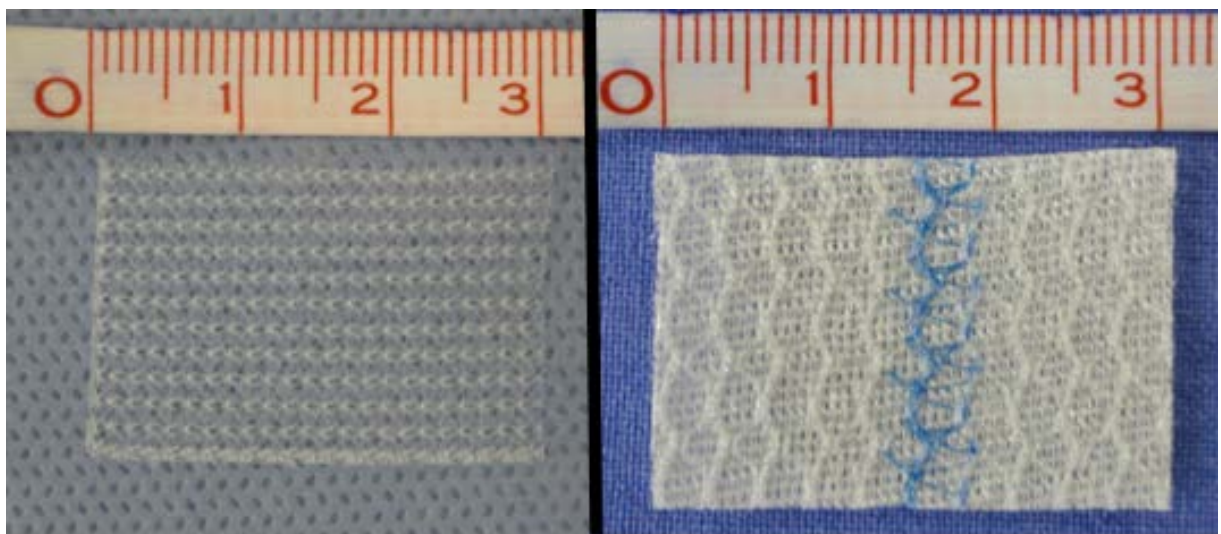
---

<sup>7</sup> Proceed Surgical Mesh – Ethicon – Somerville, NJ - USA



**Table 1-** Description of the components of the polypropylene and coated polypropylene meshes.

Mesh	Component	Degradation	anti-adhesion barrier layer	
			Component	Degradation
Prolene <sup>® 8</sup> --	Polypropylene	non biodegradable	-----	-----
Proceed <sup>® 3</sup> (PDS)	Polypropylene encapsulated by polydioxone	non biodegradable 180 days	Regenerated oxidized cellulose (COR)	28 days

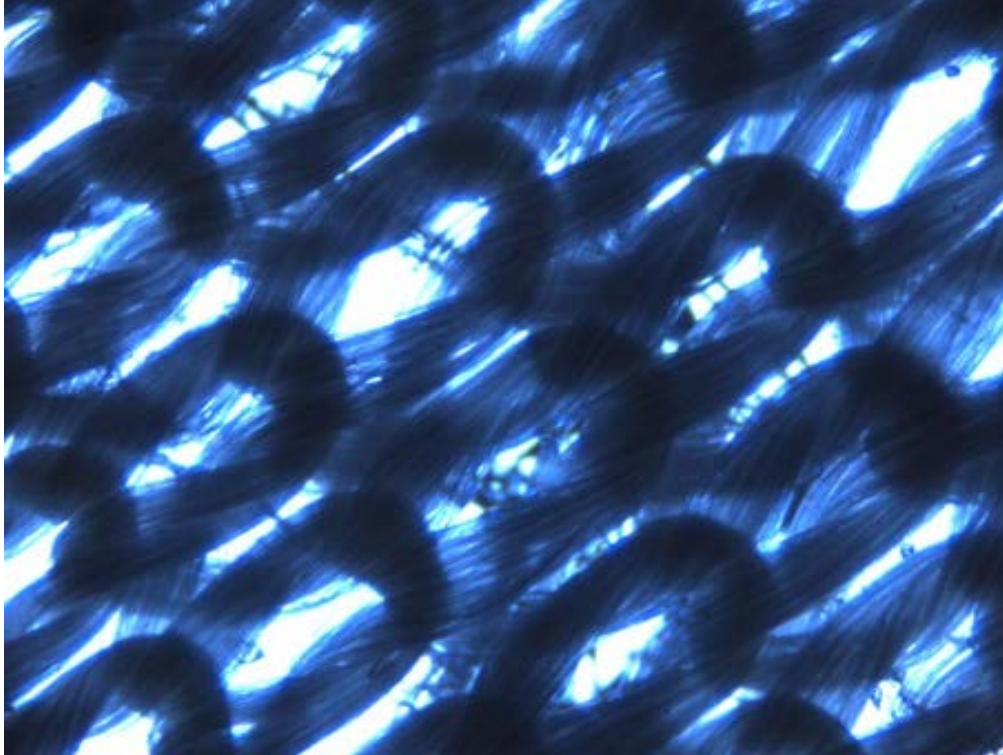


**Fig 1.** Macroscopy of the polypropylene mesh (left) and the coated polypropylene mesh (right) with a six cm<sup>2</sup> area.



<sup>8</sup> Trademark Ethicon – Somerville, NJ - USA

**Fig 2** – Polypropylene mesh on the left and Proceed<sup>®</sup> on the right. In the background we see the layer of regenerated oxidized cellulose, and in the foreground, threads of polydioxone (blue) and of polypropylene (translucid). Microscopy with a 40x magnification.



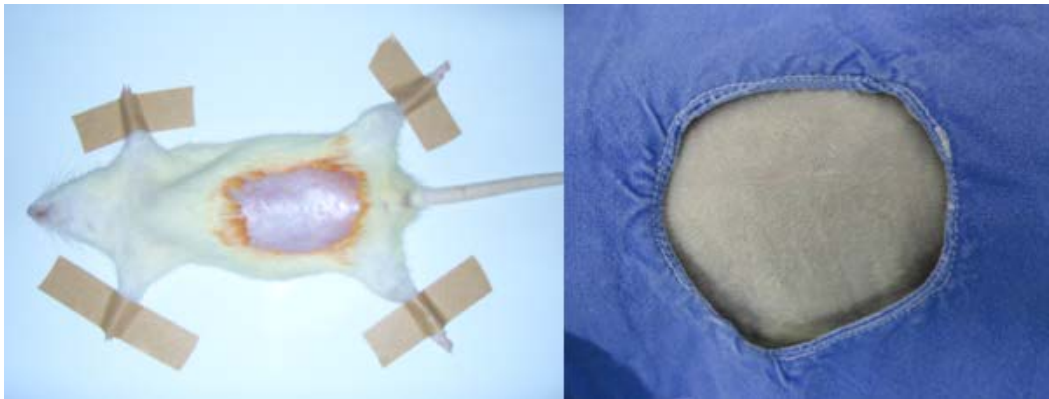
**Fig 3** – Regenerated oxidized cellulose layer that was the anti-adhesion mechanism of the coated mesh. 40x magnification.

## **ANESTHESIA AND PREOPERATIVE PREPARATION**

A protocol of the laboratory was adopted for general anesthesia according to the ethical standards prevailing for research using animals. There was a follow-up by a trained professional (veterinarian) and ketamine chloridrate (hydrochloride) (100 mg/kg) and 2% xylazine chloridrate(hydrochloride) (10 mg/kg) at a 2:1 dilution were injected intraperitoneally. The animals remained under spontaneous respiration throughout surgery and no antibiotic was used at any time in the trial.

After general anesthesia was confirmed (absence of motor reaction and of corneal-palpebral reflex), they were positioned and fixated with adhesive tape in horizontal dorsal decubitus on a board appropriate for surgery on small animals. Then they were shaved with an electric device, antisepsis was performed on the antero-lateral wall of the abdomen, with a

solution of iodine polyvinylpyrrolidone (10% PVPI) and a fenestrated closed drape was placed on the area to be approached. (Fig. 2)

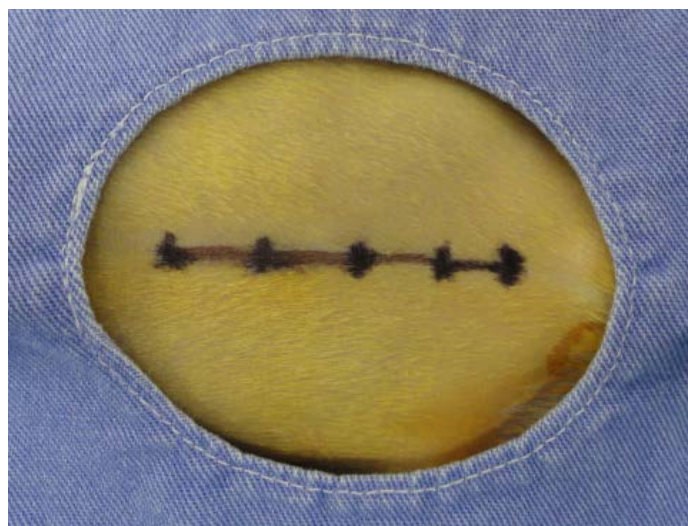


**Fig. 2** – Positioning and fenestrated drape on the anterior abdominal wall.

### **OPERATIVE TECHNIQUE**

The surgical procedure performed was a median longitudinal incision one centimeter below the xyphoid using a cold scalpel with a n° 15 blade on the anterior abdominal wall measuring four centimeters long. (Fig. 3)

Dissection of the hypodermis with metzenbaum scissors seeking to expose the anterior abdominal wall, making it possible to create the incisional hernia model. (Fig. 4)

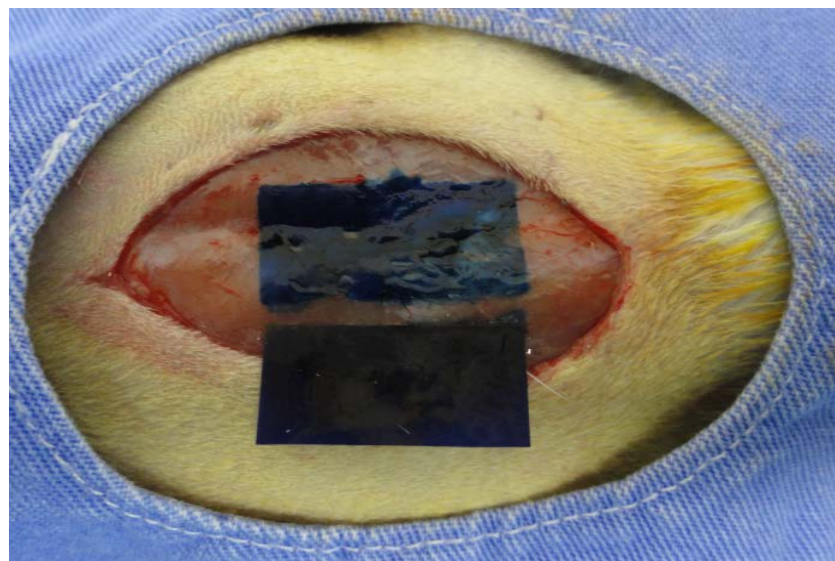


**Fig. 3** – Photograph of anterior abdominal wall demarcated for incision

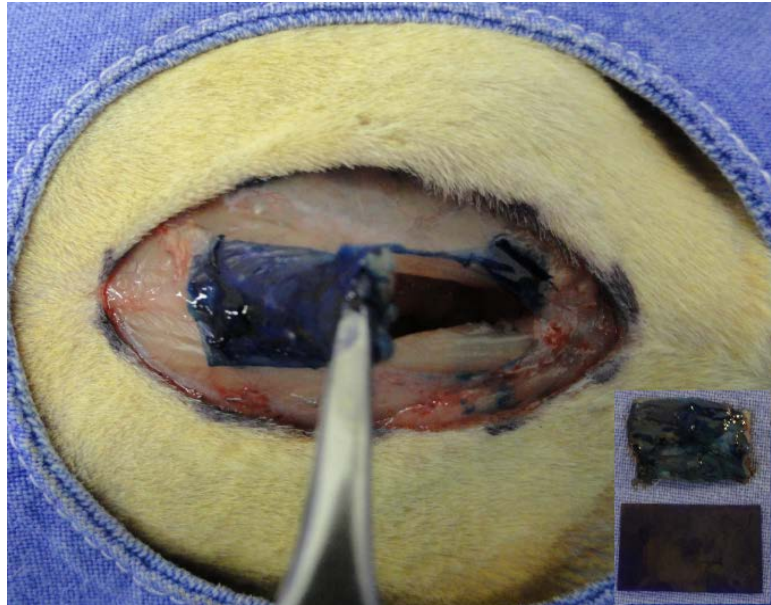


**Fig. 4** – Photograph of skin dissection exposing the muscles of the anterior abdominal wall.

The methodology of the incisional hernia model was studied in previous publications and improved in the present one. For a precise standardization of the abdominal muscle sectioning, a mold was used, made of a segment of malleable plastic measuring two centimeters wide by three centimeters long and dyed with methylene blue. The demarcation can be seen in Figure 5, and the demarcated area is sectioned and excised, a total of  $6.0 \text{ cm}^2$  reaching the muscle layer and the peritoneum. In this way a defect was created in the anterior wall of the abdomen and then filled with the prostheses that were being studied. (Fig. 6)



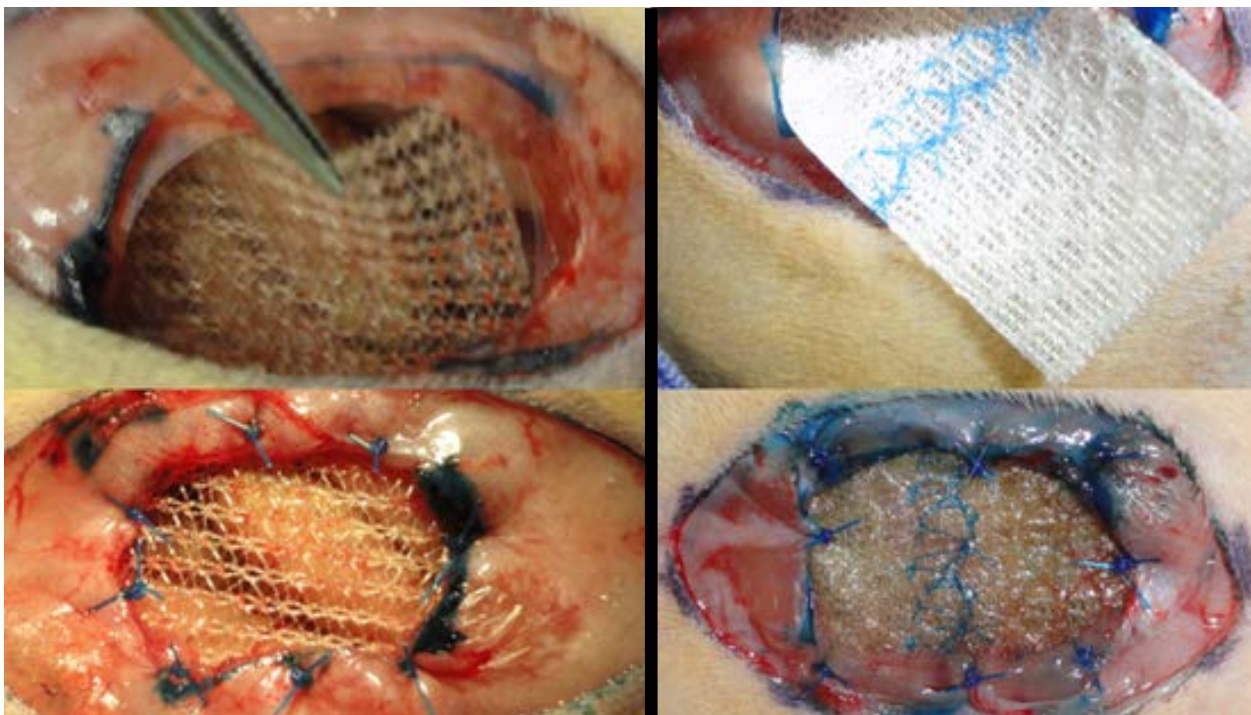
**Fig. 5** – Demarcation of the  $6 \text{ cm}^2$  area with a plastic mold dyed with methylene blue.



**Fig. 6** – Excision of muscle fragment (detail on the right side of the segment and plastic mold).

The implants were placed in an intraperitoneal position, bridge-shaped and in direct contact with the viscerae. The borders were fixated to the muscles of the anterior abdominal wall with polypropylene 4-0 suture, mounted on non-traumatic needles, using simple stitches on a single plane, separated, intercalated by spaces 1.5 cm long and 1.0 cm wide, with a distance equivalent to 0.5 cm of the mesh and from the incision margins. They are also tied with five real semi-knots as recommended by the physical-dynamic characteristics of the thread.

In figure 7 we see the implantation, on the left, of the polypropylene mesh, and on the right, the coated one. The latter is constituted by different surfaces and it is essential that it is correctly positioned. The surface that theoretically diminishes the adhesions is composed of regenerated oxidized cellulose and, logically, it was positioned in contact with the visceral content of the animal. The synthesis of the skin was performed with 3-0 nylon thread and Greek border type sutures.



**Fig. 7** – Insertion of prostheses, on the left the polypropylene mesh and its fixation with 4-0 polypropylene thread. On the right the mesh that separates tissues, fixated with the same suture.

## **MANAGEMENT, POSTOPERATIVE PERIOD AND FOLLOW-UP**

Immediately after the procedure, the animals remained in a heated incubator and were distributed into cages as soon as they recovered from anesthesia. After recovery from anesthesia, they remained in the experimental unit, kept in an artificially controlled environment with the same characteristics as the adaptation period, placed in plastic polypropylene boxes, numbered, on shelves with artificial light, one animal per cage, with chow and water *ad libitum*. The analgesic used was intramuscular tramadol hydrochloride, at a 10 mg/kg dose immediately postoperatively, and the rats were fed the type of chow appropriate for small rodents.

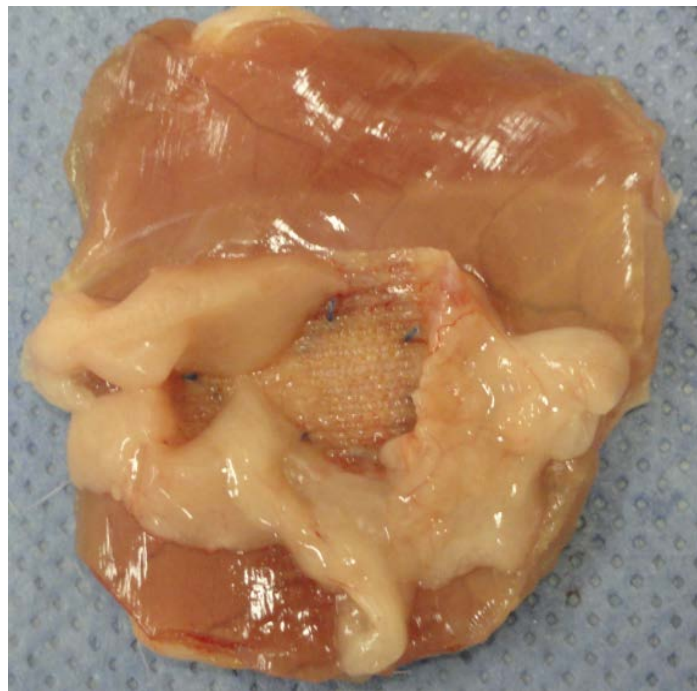
The postoperative follow-up protocol was performed daily, analyzing possible losses and incidents. The stipulated follow-up time was 90 days for both groups.

## **DEATH AND RESECTION OF THE MATERIAL**

After the 90 days follow-up, the rats were put to death in a CO<sup>2</sup> chamber, as per Resolution 714 of the Federal Council of Veterinary Medicine, the ethical implications having

been discussed, judged and approved by CEUA/HCPA. The detailed description concerning research ethics is discussed below in the paragraph on ETHICAL IMPLICATIONS.

After death was confirmed, the animal was epilated and fixated in horizontal dorsal decubitus, using adhesive tape on a board for small rodent surgery. With a cold scalpel an inverted U incision was made on the skin and anterior abdominal wall, finalizing the resection superiorly and transversally. Thus we resected the anterior abdominal wall, involving the skin, and aponeurosis of the abdominal muscles with the implanted prosthesis (Fig. 8). We then performed the macroscopic analysis of the adhesions using a score specifically for this purpose, which was described in Table 2. After this the specimens were placed in containers with a solution of 10% buffered formalin and identified individually according to their group , for later microscopic and immunohistochemical analysis.



**Fig. 8** – Photograph of the anterior abdominal wall, resected with the implanted prosthesis – polypropylene group.

## **ANALYSIS OF THE VARIABLES**

### **MACROSCOPIC**

The quantity and quality of adhesion formation were evaluated macroscopically immediately after the death of the animal. We applied an adhesion evaluation score described in Table 2.

**Table 2** – Adhesion evaluation score.

Parameter	Score				
	0	1	2	3	4
% Adhesions in each part of the mesh	Absent	1-25% area of the mesh with adhesion	26-50% area of the mesh with adhesion	51-75% area of the mesh with adhesion	76-100% area of the mesh with adhesion
Thickness of adhesion	Absent	< 5mm	5-10 mm	11-15 mm	15mm
Resistance of adhesion	Absent	Spontaneous separation of adhesion	Adhesion separated by traction	Adhesion separated by dissection	----

Values are reported as the sums of adhesions and intensity varying from 0 to 12.

## MICROSCOPIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL

The histological study was performed at the Laboratory of Experimental Pathology with the specimen processed in paraffins, cut at 4  $\mu$ m and stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The qualitative and quantitative analysis of collagen was done using a immunohistochemical technique applying an anticollagen monoclonal antibody type I and III. The quantitative evaluation of total collagen was done using the picrosirius technique. The pathologist who evaluated the microscopy did not know to which group each slide belonged, and it was thus a blind trial. She was also an expert at analyzing this type of material.

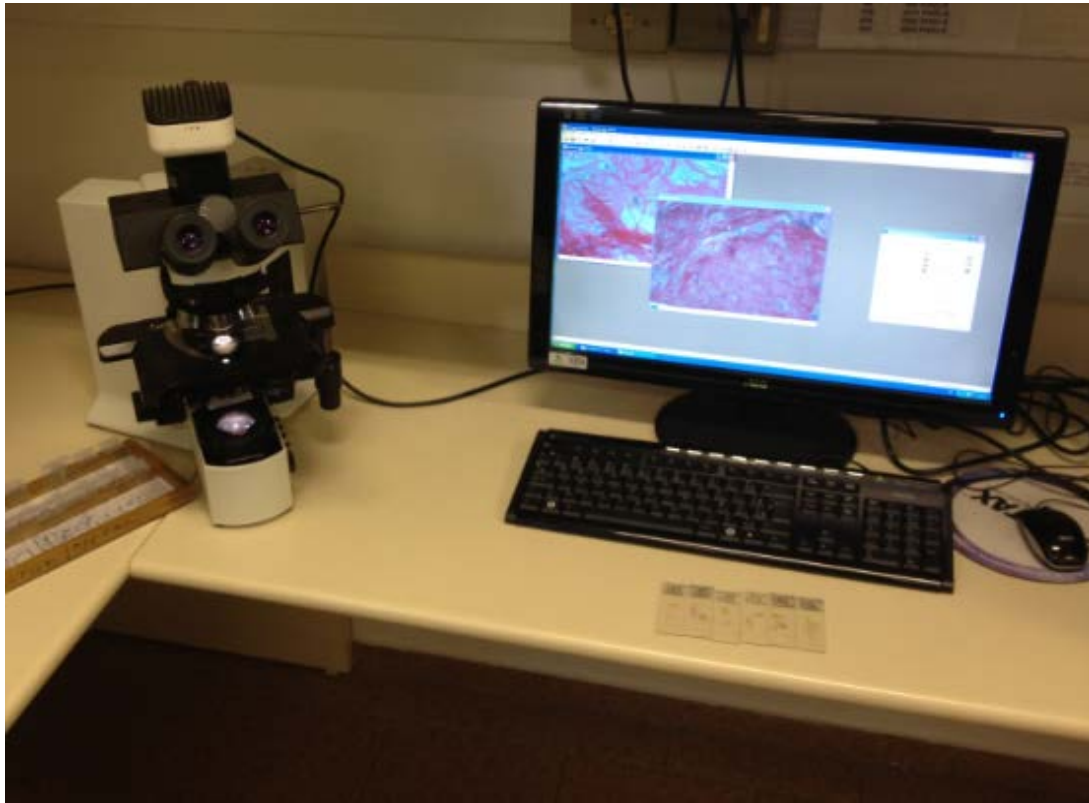
In the evaluation of the HE slides, the number of neutrophils, lymphocytes, giant cells and number of times the macrophage was wrapped around each filament of the mesh were quantified. These cell types were counted on 10 sampling fields for each slide with a 200x magnification, and then the mean of the values was calculated for statistical purposes.

The computer assisted optical videomorphometry technique was used to quantify total, type I and type III collagens. The equipment picked up the image of the slides using an Olympus microscope<sup>9</sup> with a videocamera. The signal was digitized in a Pentium computer with 133 megahertz (MHz). (Fig. 9). Four images of different fields were captured and

<sup>9</sup> Olympus Co,U.S.A.



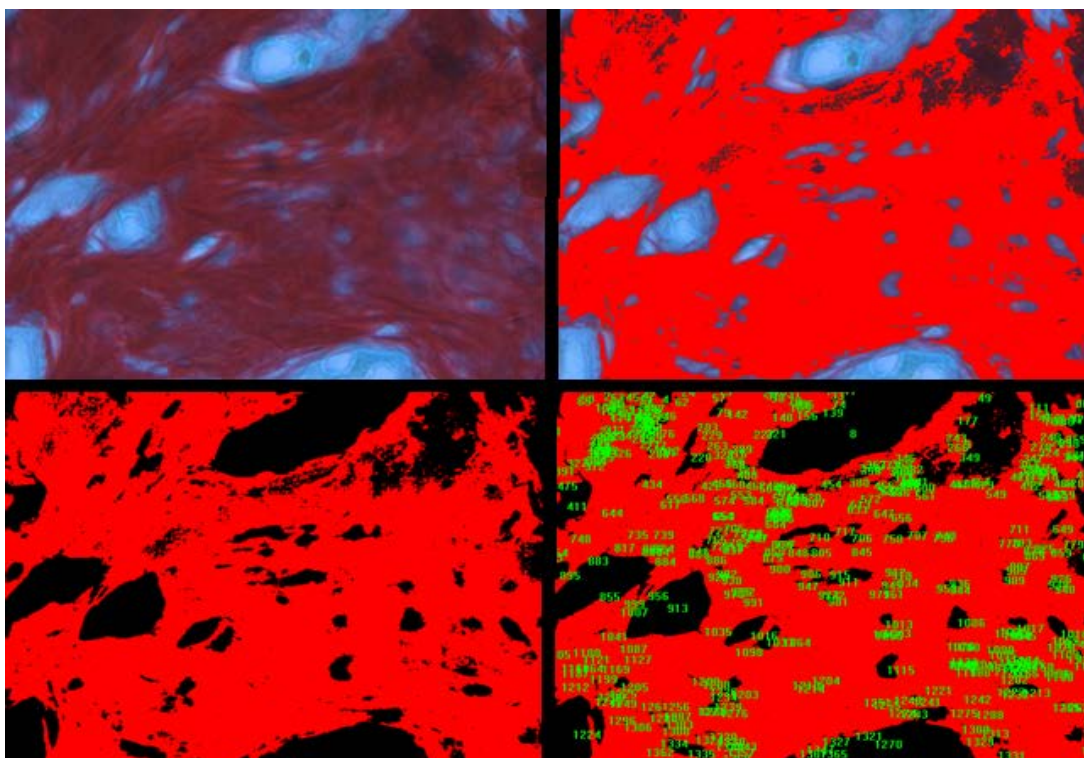
digitized for each slide, with a 200x magnification, all on the same day and under the same light conditions. The number of pixels was measured digitally, with the help of the Image Pro Plus Program<sup>10</sup> version 6.0.0.260. (Fig. 10) This technology enabled obtaining the mean number of pixels of the digitized images, supplying the data for the statistical study.



**Fig. 9** – Microscope coupled to a computer used in the videomorphometry.

---

<sup>10</sup> Media Cybernetics, Silver Spring, U.S.A.



**Fig. 10** – Videomorphometric analysis process. Total collagen stained with picrosirius and quantitatively evaluated by the number of pixels in the digitized image.

## DATA PROCESSING

Statistical analysis was performed in the Biostatistics Service of the Graduate Program Administration at HCPA. We used the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 13.0 program. The normally distributed data were analyzed using the Student t test at a 95% confidence level ( $p < 0.05$ ), using mean and standard deviation. The difference in the means (effect size – E/S) was a refined statistical analysis that generated more elaborate conclusions. The predictive variable of the study was the use of two types of surgical meshes and the outcome variable was the quantification of adhesions, weight, cellular types, total, type I and III collagen.

## ETHICAL IMPLICATIONS

All the procedures adopted in this study obeyed the criteria, technical standards and international laws on research with animals recommended by the rules of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – <http://www.cobea.org.br/etica.htm#8>), and agree with the current legislation.

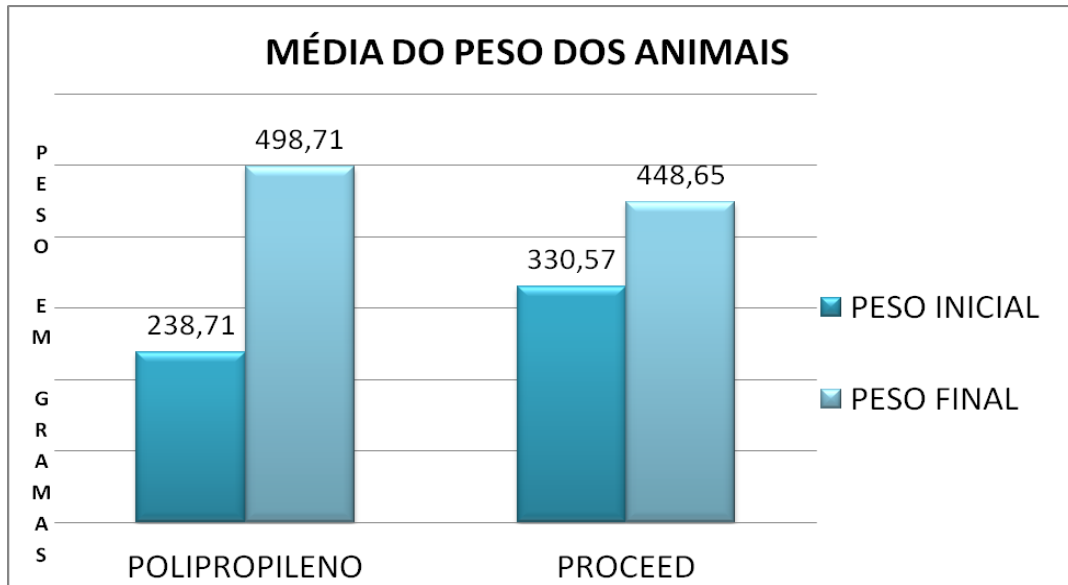
The study was submitted to the Committee of Ethics for Animal Use (CEUA/HCPA) connected to the Graduate Research Group and connected to the Committee of Research Ethics (CEP- Comitê de Ética em Pesquisa) and to the National Committee of Research Ethics (CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). The study was approved as to ethical and methodological aspects under number *110079* and the letter of acceptance is shown in Annex A.

## **CONFLICT OF INTERESTS AND SOURCE OF FUNDING**

There is no conflict of interests and the rules for financial support to research projects in the Fund of Incentive to Research and Events (FIPE- Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were followed.

## RESULTS

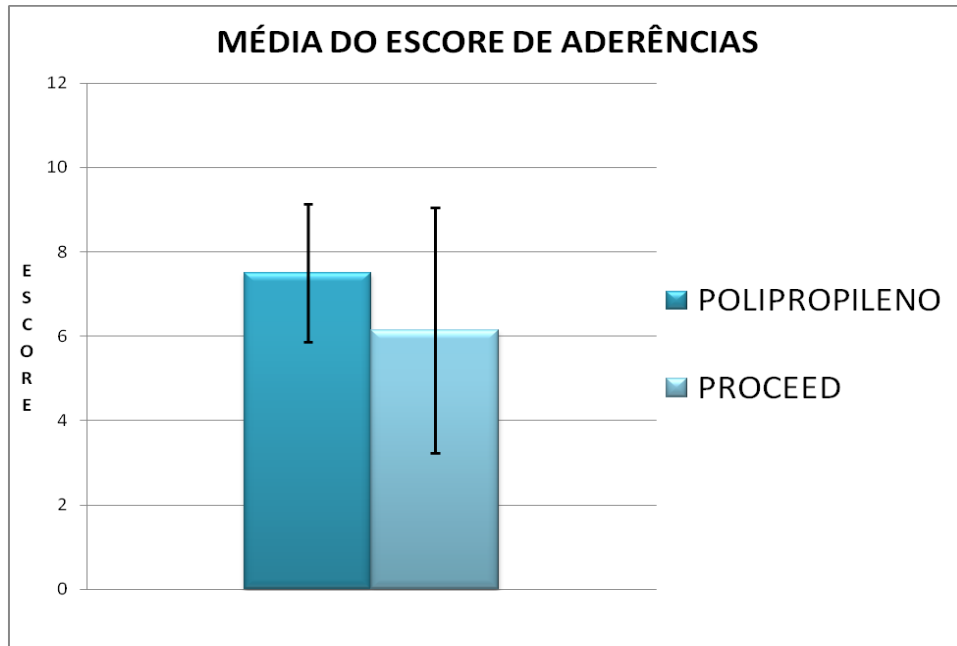
The mean weight among groups is seen in Figure 11. The baseline weight of the animals was not significantly different among the groups ( $P=0.965$ ) Likewise, the difference in weight on the ninetieth day among the polypropylene and coated polypropylene groups was not statistically different ( $P=0.241$ ). (E/S -0.02 among the groups at the beginning of the study and E/S 0.76 among them at the end of the study)



**Fig. 11** – Graph of the mean weight in grams of groups during the study.

## MACROSCOPIC ANALYSIS

The quantitative analysis showed that the mean score of adhesions in the GP was 7.5 (SD=1.65) and in the GPC 6.14 (SP=2.91) (Fig. 12). Qualitatively, all the animals in the polypropylene group presented adhesion of the epiploon to the mesh. In the coated group, one animal presented adhesion of the colon (Fig. 13), one of the small intestine and three of the epiploon. There was no statistical significance among the groups in the adhesion variable, measured by the own score, and the effect size in favor of the polypropylene group was moderate ( $P=0.335$  and E/S=0.56 respectively)



**Fig. 12** – Graph showing the mean score of adhesions. Minimum value 0 and maximum value 12.

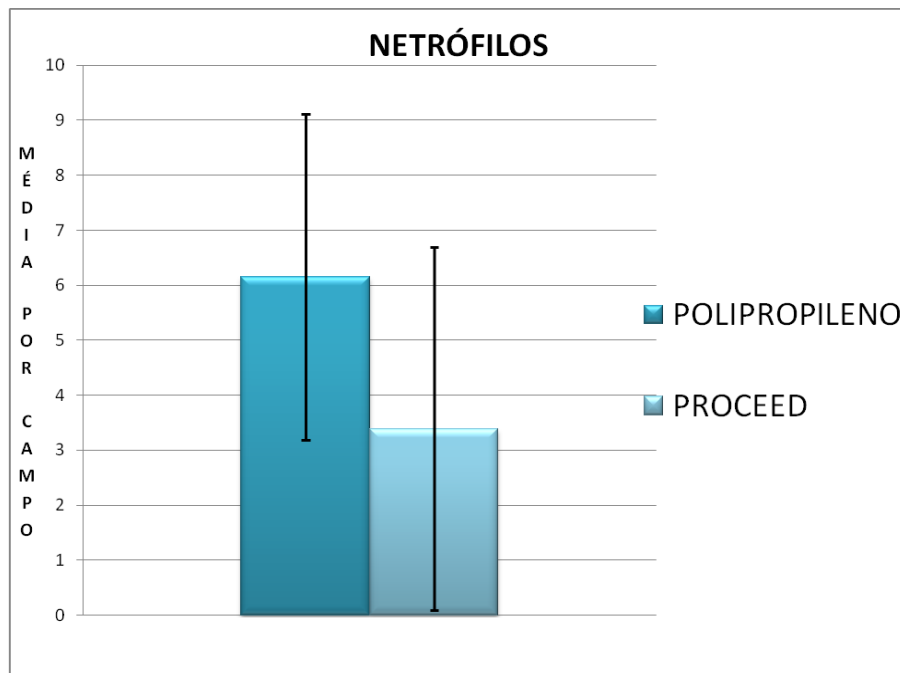


**Fig. 13** – Adhesion of the colon and epiploon in the Proceed group. Notably more located at the mesh insertion to the wall.

## MICROSCOPIC ANALYSIS

### NEUTROPHILS

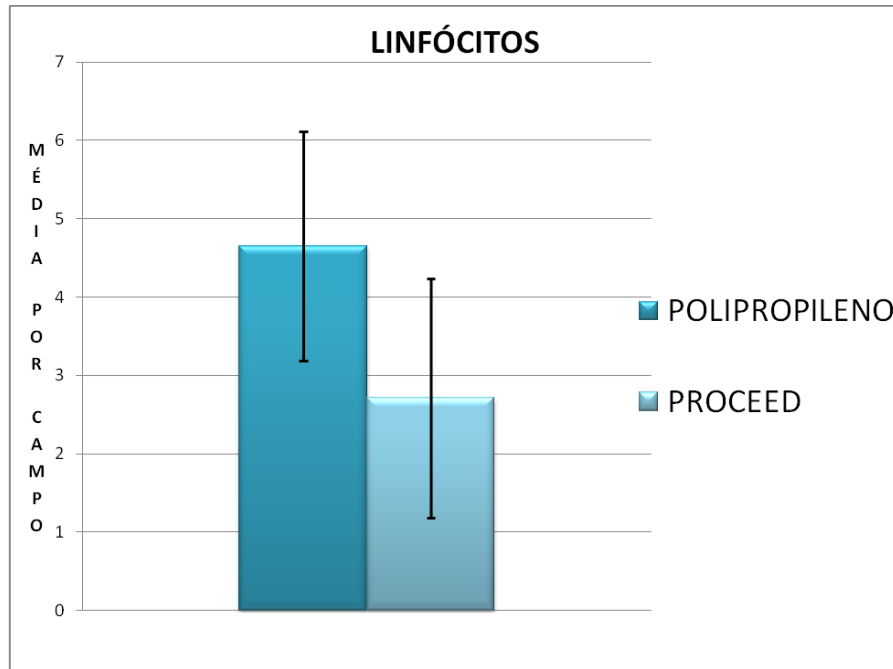
The mean number of neutrophils in the GP was 6.15 per field (SD =2.96) and 3.39 per field in the GPC (SD = 3.30) without a significant difference among them. (P=0.142)



**Fig. 14** – Graph showing the mean number of neutrophils.

### LYMPHOCYTES

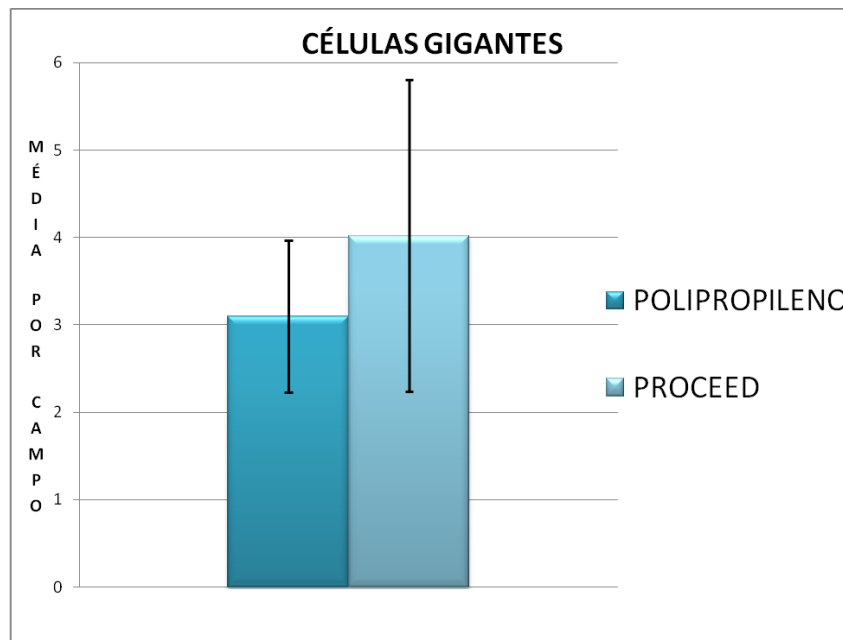
The mean number of lymphocytes in the GP was 4.65 (SD=1.46) and in the GPC , 2.71 (SD=1.53). This variable was statistically significant (P=0.041).



**Fig. 15** – Graph showing the mean number of lymphocytes.

### GIANT CELLS

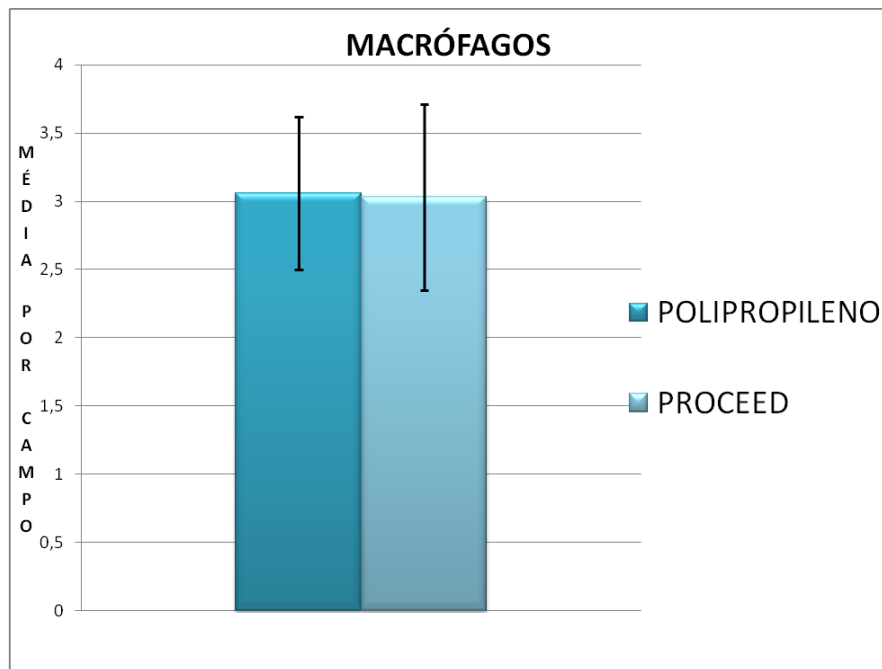
The mean of the giant cells was 3.1 in the GP (SD=0.87) and in the GPC 4.02 (SD=1.78). There was no difference in this variable. (P=0.260)



**Fig. 16** – Graph showing the mean number of giant cells

## MACROPHAGES

The macrophages were evaluated according to the number of times they wrapped around each filament of the mesh. The GP had 3.06 (SD=0.56) and GPC was 3.03 (SD=0.68) times. There was no statistical difference (P=0.940)



**Fig. 17** – Graph showing the mean number of macrophages.

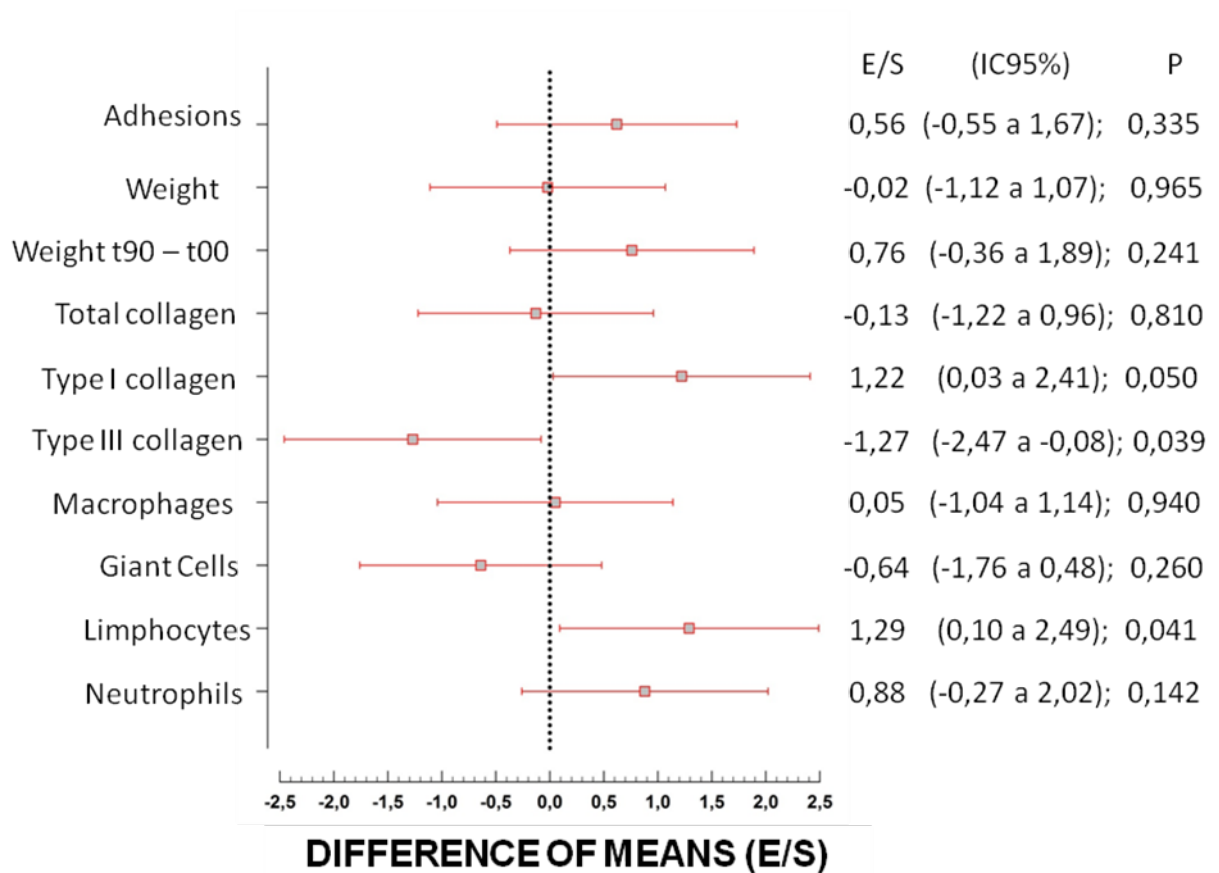
## VIDEOMORPHOMETRIC ANALYSIS

### TOTAL, TYPE I and TYPE III COLLAGEN

The mean number of pixels, for the polypropylene group, calculated automatically by specific software was, for total, type I and type III collagen, respectively, 1777.68 (SD=586.62); 321.68 (SD=121.80); 241.51 (SD=586.52). The coated group had 1889.77 (SD=1016.80); 201.91 (SD=72.55); 441.88 (SD=190.6) for the same sequence of variables mentioned. There was a statistical difference for the Type III collagen variable (P=0.039), but not for type I collagen (P=0.050). Total collagen also did not show any statistical difference among the groups (P=0.810). As to effect size, we noted that type III collagen has a larger effect size in the coated group, thus showing intense expression of this type in that group.

The effect size (effect size - E/S) of each study variable can be seen in Figure 18. The forest graph is a diagram that shows the difference in means for each of the variables selected.





**Fig. 18** – Forest graph showing the differences in standardized means (E/S) among the variables selected for the groups treated with the coated prosthesis and the polypropylene one.

## DISCUSSION

The polypropylene prosthesis, experimentally described at the end of the 1950s by Usher, has since then been considered very important to repair hernia defects in human beings.<sup>17</sup> The literature shows a great wealth of research studies on this type of prosthesis, and its use is widely supported. The ideal prosthesis cannot be altered in organic fluids, produce low reaction to foreign bodies, be chemically inert, non-allergenic, able to support mechanical tensions, provide adequate synthesis of the connective tissue and collagen deposition and it must be sterilizable without losing its characteristics.<sup>22</sup> The polypropylene prosthesis can fulfill most of these characteristics. Since it is a high weight mesh, the greater amount of material present, and also the size of the pores may lead to more intensive adhesions.<sup>23</sup>

The topic which must be discussed is the development of intra-abdominal adhesion when this type of mesh is used. Postoperative adhesions have been reported between 56-100% with complication rates that are also not negligible, varying from 20-50% for chronic pelvic pain to 74% for bowel obstruction. The use of barrier materials seeking to reduce the adhesions has been constantly researched, but sometimes the results are contradictory.<sup>6 7 10 24</sup>

The main comparison of this work was the analysis of a mesh that is well-known in surgical practice (polypropylene) with a coated prosthesis. The follow-up time of the study, ninety days, was established because there were no articles with a lengthy follow-up in the literature. Since the coated prosthesis is a new treatment for hernia there are few studies in human beings, therefore the animal model study is appropriate for the purposes of the study. Direct comparisons between unabsorbable and bioabsorbable materials in human beings are scarce and long-term complications are not well known.<sup>23</sup>

According to technical information provided by the coated prosthesis manufacturer it is constituted by polypropylene, polydioxane and a compound of bioabsorbable anti-adhesion barrier called regenerated oxidized cellulose (Surgicel<sup>®</sup>). The latter layer has been used to prevent intra-abdominal adhesions and as a hemostatic barrier.<sup>25</sup> The polydioxane polymer layer encapsulates the polypropylene layer to that of regenerated oxidized cellulose, joining them together. The polypropylene layer is a low weight flexible mesh that allows tissue growth through its pores and is responsible for prosthesis adhesion.

The model of incisional hernia creation proved effective and appropriate to the purposes of the research, as studied previously.<sup>24</sup> Fixation of the mesh in close contact with the viscerae was essential and proved adequate to the analysis of adhesions. All the animals had a satisfactory synthesis of the borders of the prosthesis to the anterior abdominal wall.

Analysis of the data showed that there was no statistically significant difference between the weight of the animals at the beginning of the study and a negligible effect size thus showing equanimity in selecting the groups. Likewise, the weight at the end of the ninety days was not statistically different among the groups treated. All thirteen animals gained weight during the ninety-day follow-up and there was a larger gain evaluated by effect size in the polypropylene group at the end of the study.

The research was ideally planned with seven animals in each group and with a follow-up time that could favor losses throughout the study; however, ultimately we had only a single death and the remainder of the animals completed the study without complications involving

prosthesis insertion. The death occurred in an animal of the polypropylene group probably as a result of respiratory infection in the first month of follow-up . This loss did not have a negative impact on the overall statistical analysis of the study, because we used a statistical resource called effect size – E/S). The use of effect size adds information to the concept of statistical significance. Increasingly this type of approach has been encouraged and even required by scientific publications. Therefore, this statistical analysis is an important complement to the test of significance of the null hypothesis.<sup>26</sup> The effect size allowed more precise conclusions regarding when one mesh is superior to another for the same variables studied. This, in fact, adds knowledge that would not be generated with the “simple” test of significance of the null hypothesis.

In the forest graph shown in Figure 18, we note all effect sizes supplying the dimension of the difference between the prosthesis for each of the work variables. This graph, difference of means, explains the results of the research as a whole, and is therefore a panel of the research findings.

Research of adhesions by score and analysis of barrier materials has occurred constantly in surgical literature.<sup>24 27 28</sup> In this variable, adhesion, there was no statistical difference between the meshes and the effect size was small. It is essential to understand the concept of effect size because with this we can see the real difference between the groups even if the null hypothesis has not been refuted for some variables. Effect size values up to 0.20 are considered small, between 0.20 and 0.50 medium and greater than 0.80 large.<sup>29</sup> The magnitude of effect in the adhesion variable is small between the two prostheses, and this generates the understanding that the coated mesh does not diminish the adhesions up to the ninetieth day postoperatively. The coated prosthesis is composed of polypropylene, polydioxane and regenerated oxidized cellulose. The latter is a bioabsorbable compound that is absorbed in twenty-eight days. Therefore, at the end of the study, at ninety days, this material had been completely absorbed and was not noted macroscopically.

What we can say is that the absorption of regenerated oxidized cellulose exposes the polypropylene layer to the abdominal visceral content and, consequently, caused the adhesions found. Another experimental study showed that regenerated oxidized cellulose generated adhesions in almost half the animals in the study.<sup>25</sup>

The distribution of adhesions in the coated group was irregular, more intensely on the borders of the prosthesis that were in contact with the abdominal wall. The use of

polypropylene thread in the suture fixating the mesh to the wall can explain the adhesions that were located more towards the periphery of the mesh (Figure 13). In the polypropylene group the adhesions were more distributed throughout the area of the mesh similarly to other studies.<sup>27 28</sup> All the animals in the polypropylene group had epiploon adhesions, but also small intestine and colon. This finding is well described by many available studies.<sup>16 17 24 25 27 28</sup> The adhesions could be easily detached from the mesh in both groups. Adhesions of the unadsorbable meshes are known and several degrees of adhesions may be present, and a form of foreign body reaction occurs when this type of prosthesis is used. The process of adhesion formation is more complex and it is basically started by the tissue injury process that breaks down the balance between coagulation and fibrinolysis. The fibrin deposition results in a matrix where the fibroblasts produce extra-cellular matrix. The end of the process generates various degrees of adhesion.<sup>23</sup> There are many attempts at inhibition or minimization of this reaction, because of the morbidity related to adhesions. The bioprostheses seek native tissue repair with less inflammatory activity and foreign body formation.<sup>23</sup> An experimental study in rabbits showed that up to 40% of the meshes structured with polypropylene, even when coated with bioabsorbable materials, cause adhesions in an animal model.<sup>30</sup>

Collagen analysis was performed using immunohistochemistry aggregated to the computed videomorphometry technology, which allowed a quantitative characterization of the collagen variable (total, type I and type III). The number of pixels of each photo supplied quantitative data, since it is known that this type of data is better than the qualitative one in statistics. For this purpose we took the mean of the number of pixels of four fields in each slide. A pixel is the agglutination of *Picture* and *Element*, and it is the smallest element in an exhibition device. Practically speaking, it is the smallest point that forms an image. Thus, after making the immunohistochemistry slides, the images were digitized and only the segments with a brownish tone were measured in pixels. This type of technique is well structured in the research group and publications have used this methodology. The research on collagen using the immunohistochemical methodology makes the study reliable, and its use is essential to identify collagens I and III.<sup>31 32</sup>

Type I collagen was not statistically significant among the groups with a large effect size (1.22) in favor of the polypropylene group. According to the argumentation, type I collagen was found more often in the polypropylene group than in the Proceed group, even though no statistical significance was found.

Type III collagen was statistically significant among the groups and the effect size was large (-1.27) in favor of the coated group. This means that type III collagen was expressed with a very large dimension in the coated group. The alterations of the collagen metabolism and the connective tissue contribute to hernia formation. Studies have shown that patients with hernia present a large amount of type III collagen. This type of collagen is considered immature, weak, and favors fragile fibers with a quality that is not ideal, which are found in the initial phases of scar formation.<sup>33</sup> In the present study the type III collagen was more expressed in the coated group and based on the result of the research, and this could increase hernia formation. It is not only the type III collagen that is expressed more intensely in hernia patients, but also the reduction, itself, of collagen synthesis by the fibroblasts.<sup>32</sup> Since it is a relatively new prosthesis, there are no in vivo research data with a reasonable follow-up time to be able to associate these results with everyday surgical practice.

Thus also total collagen was not statistically significant among the groups with an extremely small strength of association (-0,13). However, the analysis of type I and III collagen was essential for the critical analysis of the prostheses. It is known that type I collagen is found in mature scar tissue and the reduction of the I:III collagen ratio is associated with hernia formation.<sup>33</sup> The incidence of incisional hernia and its recurrence are related to the collagen metabolism. There are metabolic causes involved, as well as smoking, hormones and drug use. Hernia formation is influenced by alterations in the extracellular matrix and epidemiological studies show a defect in the biology of the scar tissue formation.

34

The histology of the prostheses did not show a difference in the macrophages, giant cells and neutrophils, thus they are non-significant. Only the lymphocytes presented a statistically significant difference. Since the analysis was performed in a single step at ninety days, we cannot infer anything about cellular behavior in more than one time step as reported by others.<sup>35</sup> We know that the lymphocytes were the only cell type that showed a significant difference. They are involved in the non-specific inflammatory response, they recruit macrophages and directly influence phagocytic activity.<sup>35</sup>

Evidence of the use of meshes is strong and broadly supported by the literature, but, to us, the choice of type of prosthesis that can be used does not appear to be a simple decision. Specific characteristics of the prosthesis and of the patients must always be jointly analyzed for an appropriate choice. There are few clinical studies available with the coated prosthesis.

One of the few studies available shows that in videolaparoscopic surgery to correct ventral hernia, it is an appropriate prosthesis with a low rate of complications.<sup>36</sup>

In this paper what we showed was that, in an experimental model, the use of a mesh with a barrier mechanism does not prevent the possibility that adhesions may occur. Consequently, all complications inherent to the adhesion formation process, such as bowel obstruction, fistulae, granulomas may possibly be found using this type of prosthesis. In fact, as mentioned, there are no data on clinical trials with long term follow-up using coated mesh. Many types of materials are routinely researched seeking the most adequate barrier to prevent adhesions. This study provided some more data that, together, can formulate a line of thinking and conduct to manage hernia patients. Finally, later studies will show, with a superior degree of evidence, information about the behavior of individuals who were treated with this kind of mesh.

## **CONCLUSIONS**

1. The quantity of adhesions was not different for the polypropylene and coated polypropylene meshes.
2. Type I collagen is more prominent on the polypropylene mesh (E/S).
3. Type III collagen is more often found on the coated polypropylene mesh.
4. The quantity of total collagen did not show any difference between the meshes.
5. The number of lymphocytes is greater in the coated polypropylene group..



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110079

**Data da Versão do Projeto:** 18/04/2011

**Pesquisadores:**

LUCAS FÉLIX ROSSI

MANOEL ROBERTO MACIEL TRINDADE

**Título:** COMPARAÇÃO DA ADERÊNCIA PERITONIAL DAS TELAS DE POLIPROPILENO E POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 18 de julho de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA



## REFERENCES

1. Skinner, H.L. and J.L. Elliott, *Incisional hernia*. N Y State J Med, 1951. **51**(11): p. 1424-6.
2. Andreollo, N.A., et al., *Hérnias incisionais: avaliação do tratamento cirúrgico*. Revista Paulista de Medicina, 1984. **102**(1): p. 23-6.
3. Acquaroni, D., *Hérnia Incisional*, in *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto*, E.J. Zerbini, Editor 1974, Sarvier: São Paulo. p. 100-7.
4. Mittelstaedt, W.E.M., et al., *Hérnias incisionais: revisão de 228 casos operados no hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo*. Revista Paulista de Medicina, 1986. **104**: p. 117-27.
5. Jenkins, S.D., et al., *A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects*. Surgery, 1983. **94**(2): p. 392-8.
6. Liakakos, T., et al., *Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia*. Br J Surg, 1994. **81**(2): p. 248-9.
7. Usher, F.C., *A new technique for repairing large abdominal wall defects*. . AMA Arch Surg, 1961. **82**: p. 108-15.
8. Cassar, K. and A. Munro, *Surgical treatment of incisional hernia*. Br J Surg, 2002. **89**(5): p. 534-45.
9. Chan, G. and C.K. Chan, *A review of incisional hernia repairs: preoperative weight loss and selective use of the mesh repair*. Hernia, 2005. **9**(1): p. 37-41.
10. Usher, F.C., et al., *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. II. Clinical studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 138-45.
11. Mudge, M. and L.E. Hughes, *Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes*. Br J Surg, 1985. **72**(1): p. 70-1.
12. Ellis, H., H. Gajraj, and C.D. George, *Incisional hernias: when do they occur?* Br J Surg, 1983. **70**(5): p. 290-1.
13. Piazzese, E., et al., *Incidence, predisposing factors, and results of surgical treatment of incisional hernia after orthotopic liver transplantation*. Transplant Proc, 2004. **36**(10): p. 3097-8.
14. Neto, J.M.K., *Hérnia Incisional*, in *Hérnias da Parede Abdominal*, Á.L.d. Silva, Editor 1997, Atheneu: Rio de Janeiro.
15. Garland, J.G., *Incisional hernia*. Wis Med J, 1952. **51**(11): p. 1079-80.
16. Goldenberg, A., et al., *Comparative study of inflammatory response and adhesions formation after fixation of different meshes for inguinal hernia repair in rabbits*. Acta Cirurgica Brasileira, 2005. **20**: p. 347-352.
17. Usher, F.C. and J.P. Gannon, *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. I. Experimental studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 131-7.
18. Dilege, E., et al., *Prevention of adhesion to prosthetic mesh in incisional ventral hernias: comparison of different barriers in an experimental model*. Eur Surg Res, 2006. **38**(3): p. 358-64.
19. Gaertner, W.B., M.E. Bonsack, and J.P. Delaney, *Visceral adhesions to hernia prostheses*. Hernia, 2010. **14**(4): p. 375-81.
20. Hutchinson, R.W., M. Chadon, and L.T. Divilio *Pre-clinical abdominal adhesion studies with proceed surgical mesh*. Global Surgery, 2004.

21. Amid, P.K., *Polypropylene prostheses*, in *Abdominal Wall Hernias: Principles and management*, R. Bendavid, J. Abrahamson, and M.E. Arregui, Editors. 2001, Springer-Verlag: New York. p. 272-77.
22. Turza, K.C. and C.E. Butler, *Adhesions and meshes: synthetic versus bioprosthetic*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. **130**(5 Suppl 2): p. 206S-13S.
23. d'Acampora, A.J., et al., *Experimental study comparing the tensile strength of different surgical meshes following aponeurotic-muscle deformity synthesis on Wistar rats*. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2007. **22**: p. 47-52.
24. Balbinotto, R.P., et al., *Barrier methods used to prevent pelvic adhesions in videolaparoscopy: experimental study in female rabbits*. *Surg Endosc*, 2011. **25**(8): p. 2637-42.
25. Lindenau, J.D.R. and L.S.P. Guimarães, *Calculando o tamanho de efeito no SPSS*. *Rev HCPA*, 2012. **32**(3).
26. Lontra, M.B., et al., *Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de polipropileno na formação de aderências intraperitoneal: um modelo experimental em ratos*. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2010. **37**: p. 364-369.
27. Costa, R.G.d., et al., *Polylactic acid film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats*. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2009. **24**: p. 128-135.
28. Loureiro, L.M.J. and M.G.H. Gameiro, *Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística*. *Revista de enfermagem referência*, 2011. **3**: p. 152-62.
29. Novistky, Y.W., et al., *Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit*. *J Surg Res*, 2007. **1**(140): p. 6-11.
30. Fachinelli, A., M.R. Trindade, and F.A. Fachinelli, *Elastic fibers in the anterior abdominal wall*. *Hernia*, 2011. **15**(4): p. 409-15.
31. Gonçalves, R.O., et al., *Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal*. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 2003. **30**: p. 286-292.
32. Henriksen, N.A., et al., *Connective tissue alteration in abdominal wall hernia*. *Br J Surg*, 2011. **98**(2): p. 210-9.
33. Rosch, R., et al., *Hernia - A Collagen Disease?* *Eur. Surg.*, 2003. **35**(1): p. 11-5.
34. Zogbi, L., et al., *Retraction and fibroplasia in a polypropylene prosthesis: experimental study in rats*. *Hernia*, 2010. **14**(3): p. 291-8.
35. Rosenberg, J. and J. Burcharth, *Feasibility and outcome after laparoscopic ventral hernia repair using Proceed mesh*. *Hernia*, 2008. **12**(5): p. 453-6.

## ADERÊNCIAS PERITONIAIS, COLÁGENO TIPO I, III E TOTAL NAS TELAS DE POLIPROPILENO E POLIPROPILENO REVESTIDO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS <sup>11</sup>

Lucas Félix Rossi <sup>12</sup>, Manoel Roberto Maciel Trindade <sup>13</sup>, Armando José d`Acampora <sup>14</sup>, Luise Meurer <sup>15</sup>

### RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A correção herniária é um tratamento realizado rotineiramente na prática cirúrgica. O aprimoramento da técnica operatória e dos materiais disponíveis trouxe sem dúvida enorme benefício na qualidade dos resultados da cirurgia. A inserção de próteses para correção herniária é bem embasada na literatura e tornou-se o padrão de tratamento quando abordamos este tipo de doença. O objetivo deste trabalho é avaliar duas próteses disponíveis: a de polipropileno e a de polipropileno revestido em modelo experimental. **MÉTODOS:** Foram inseridas sete próteses de cada tipo em ratos Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) na parede abdominal anterior do animal em contato direto com as vísceras. Após o seguimento de noventa dias fizemos a análise das aderências intra-abdominais, bem como avaliação por imuno-histoquímica e videomorfometria do colágeno total, tipo I e tipo III. Ainda fez-se a análise histológica com hematoxilina-eosina para avaliação dos tipos celulares presentes em cada tela. **RESULTADOS:** Aos noventa dias as aderências não foram diferentes entre os grupos (P=0,335). O colágeno total igualmente não foi estatisticamente diferente (P=0,810). O colágeno tipo III foi estatisticamente maior no grupo polipropileno revestido (P=0,039) enquanto o colágeno tipo I não diferiu entre as próteses (P=0,050). Os linfócitos foram estatisticamente mais presentes no grupo polipropileno (P=0,041). **CONCLUSÃO:** A prótese revestida não foi diferente da de polipropileno na variável aderência. O colágeno total e tipo I não foram diferentes entre os grupos enquanto que o colágeno tipo III é mais presente na tela revestida. O número de linfócitos foi maior na tela de polipropileno.

**Descritores:** Cirurgia. Modelos animais. Hérnia. Telas cirúrgicas. Aderências teciduais.

---

<sup>11</sup> Pesquisa realizada no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brasil.

<sup>12</sup> Cirurgião do Aparelho digestivo – Pontifícia Universidade Católica PUCRS. Porto Alegre – Brasil.

<sup>13</sup> PhD, Chefe do Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brasil.

<sup>14</sup> PhD, Professor de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade do Sul de Santa Catarina. Chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Florianópolis. Florianópolis – Brasil.

<sup>15</sup> PhD, Professora do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brasil.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Hernia correction is a routinely performed treatment in surgical practice. The improvement of the operative technique and available materials certainly has been a great benefit to the quality of surgical results. The insertion of prostheses for hernia correction is well-founded in the literature, and has become the standard of treatment when this type of disease is discussed. The purpose of this study is to evaluate two available prostheses: the polypropylene and polypropylene coated ones in an experimental model. **METHODS:** Seven prostheses of each kind were inserted into Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus*) in the anterior abdominal wall of the animal in direct contact with the viscerae. After a ninety-day follow-up we analyzed the intra-abdominal adhesions, and also performed a immunohistochemical evaluation and videomorphometry of the total, type I and type III collagen. Histological analysis was also performed with hematoxylin-eosin to evaluate cell types present in each mesh. **RESULTS:** At ninety days the adhesions were not different among the groups (P=0.335). Total collagen likewise was not statistically different (P=0.810). Statistically there was more type III collagen in the coated polypropylene group (P=0.039) while type I collagen was not different among the prostheses (P=0.050). The lymphocytes were statistically more present in the polypropylene group (P=0.041). **CONCLUSION:** The coated prosthesis was not different from the polypropylene one regarding the adhesion variable. Total and type I collagen were not different among the groups, while type III collagen is more present on the coated mesh. There was a greater number of lymphocytes on the polypropylene mesh.

**Key words:** Surgery. Animal model. Hernia. Surgical mesh. Tissue adhesions.

## INTRODUÇÃO

A correção da hérnia incisional é problema para o cirurgião desde os primórdios das cirurgias abdominais.<sup>1 2</sup> Hérnia incisional é a protusão do conteúdo abdominal através de ponto fraco da parede, constituído pela cicatriz de intervenção cirúrgica anterior. A síntese da parede abdominal em situações complexas como infecções graves, grandes hérnias incisionais, perda maciça de tecido, necrose, tumores é um problema de difícil solução para o cirurgião geral, especialmente quando não se dispõe de tecido autógeno suficiente para o fechamento primário adequado.<sup>5 6 7</sup> O aumento do número de laparotomias em condições ditas não favoráveis acarretou situações de fechamento abdominal difícil, quando por vezes não impossível, o que conseqüentemente aumentou a prevalência da HI. É uma causa importante morbidade nos pacientes que possuem tal tipo de hérnia<sup>8</sup> interferindo na qualidade de vida e resultados cosméticos.<sup>9</sup>

A incidência de hérnia incisional varia de 1 a 11%, aumentando muito caso o fechamento da cavidade for feito sob tensão.<sup>6</sup> A ocorrência de HI continua a aparecer mesmo após vários anos da intervenção de base.<sup>12 14</sup>

Um material sintético, para ser usado como prótese, deve seguir alguns princípios básicos: não se modificar na presença dos fluidos teciduais, ser quimicamente inerte, não produzir reação inflamatória ou do tipo corpo estranho, não ser carcinogênico, não produzir alergia, ser esterilizável, mecanicamente resistente, economicamente viável.<sup>14</sup>

A prótese de polipropileno é a que melhor se presta para o tratamento cirúrgico da HI.<sup>7 10 17</sup> No entanto a colocação intra-abdominal causa importante formação de adesões, podendo resultar em sérias complicações como obstrução intestinal e fístulas enterocutâneas.<sup>18</sup> Com o objetivo de diminuir o índice de complicações e a possibilidade de contato da tela diretamente com as vísceras abdominais surgiu uma tela formada por polipropileno associada a uma camada composta de celulose oxidada regenerada. Esta última objetiva diminuir a formação de aderências (Proceed® Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA). De fato, segundo o fabricante telas com barreiras biológicas são associadas a muito menos formação de aderências do que as sem esta estrutura.

A escolha da tela para o reparo das hérnias incisionais pode ser um dilema, pois atualmente vários tipos de produtos são disponíveis para o seu tratamento.<sup>19</sup> Diante disto, utilizamos uma tela com uso consagrado na ciência cirúrgica, ou seja, a de puramente

polipropileno com uma nova tela disponível que tem por característica a associação de materiais em busca da diminuição de aderências intraperitoniais. A tela composta foi desenvolvida pela Ethicon® para implantação em camadas profundas do abdômen almejando a pressão intra-abdominal para mantê-la em posição e sem que para isso haja aderência de vísceras quando esta for posicionada em íntimo com elas. Excelente crescimento tecidual e resistência com baixos índices de aderências quando utilizada é verificado no seu uso.<sup>20</sup>

Deste modo o que se propõe com esta pesquisa é analisar, primariamente, as aderências com estes dois tipos de telas além do colágeno total, colágeno tipo I e tipo III. A análise da histologia será conduzida em direção das formas celulares presentes nas próteses.

## METHODS

### LOCAL DO ESTUDO

O trabalho foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal (UEA) e na Unidade de Patologia Experimental (UPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pesquisa financiada pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) e aprovado sob os aspectos bioéticos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) sob o número 110079.

### AMOSTRA

Utilizamos um modelo experimental em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, pesando entre 303-368 gramas, com aproximadamente três meses de vida e aparentemente saudáveis. Durante todo o trabalho foram mantidos em condições ambientais adequadas segundo as normas bioéticas de pesquisa com animais. Os animais segundo o objetivo da pesquisa foram alocados por randomização simples em dois grupos de sete exemplares assim dispostos: **Grupo Polipropileno (GPP)**: tela de polipropileno medindo 3,0 centímetros de comprimento e 2,0 centímetros de largura (6 cm<sup>2</sup>) para fechamento do defeito causado na parede abdominal. **Grupo Polipropileno Revestido (GPC)**: tela de polipropileno de baixa densidade associada à celulose oxidada regenerada (COR) e a polidioxonona (PDS) – Proceed<sup>16®</sup>: mesmos procedimentos adotados no grupo polipropileno utilizando a prótese referida.

---

<sup>16</sup> Proceed Surgical Mesh – Ethicon – Somerville, NJ - USA

## **PRÓTESES**

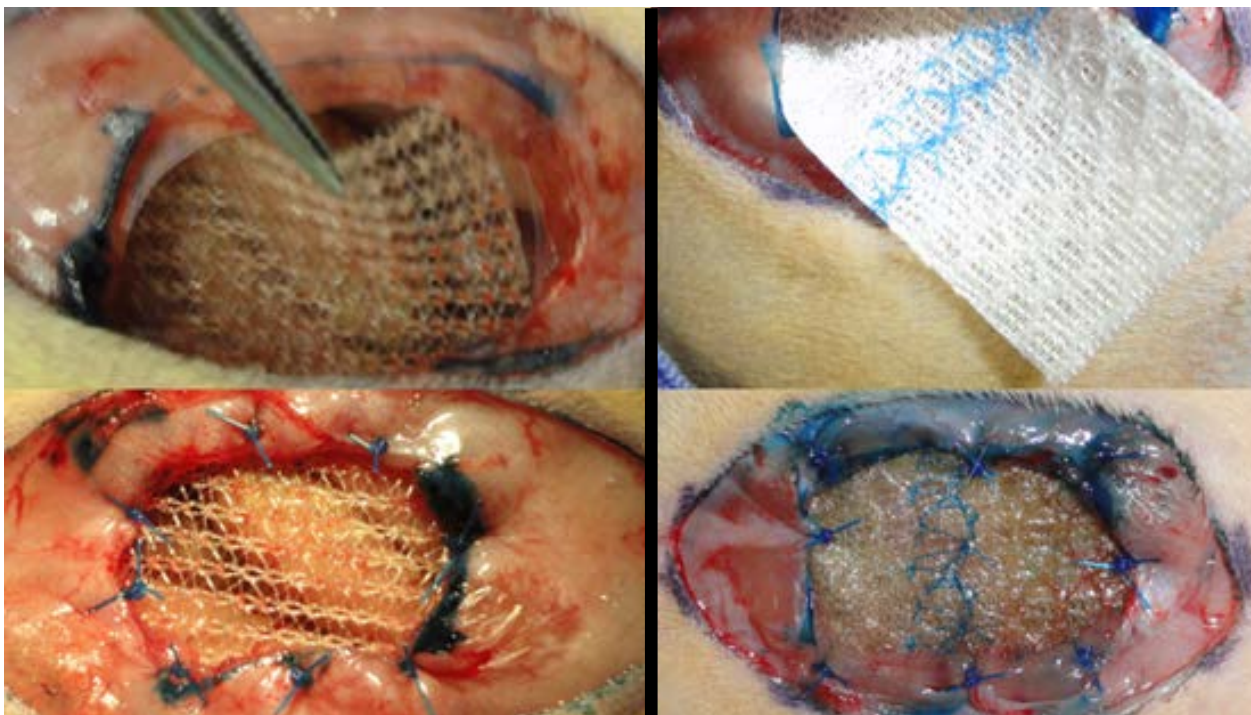
Prótese de alta densidade de polipropileno (Marlex<sup>®</sup> - Bard, UK) e prótese revestida de baixa densidade (Proceed<sup>®</sup> - Ethicon, USA)

## **TÉCNICA CIRÚRGICA**

A Anestesia foi conduzida com injeção de solução de cloridrato de ketamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) na diluição 2:1 via intraperitoneal. Todos os princípios de antisepsia foram seguidos e em nenhum momento do ensaio foi utilizado antibiótico. Os animais permaneceram sob respiração espontânea durante todo o período operatório. Foi realizado uma incisão longitudinal mediana medindo quatro centímetros de comprimento na parede abdominal anterior. Dissecção da hipoderme buscando a exposição da parede abdominal anterior possibilitando a criação do modelo de hérnia incisional. Um molde constituído de um segmento de plástico maleável medindo dois centímetros de largura por três centímetros de comprimento e tingido com azul de metileno foi utilizado para demarcação da ressecção. Dessa forma um defeito na parede anterior do abdome foi criado e preenchido na sequência com as próteses em estudo.

Os implantes foram alocados em posição intraperitoneal em forma de ponte e com contato direto com as vísceras. As bordas foram fixadas na musculatura da parede abdominal anterior com fio de polipropileno 4-0.

Na figura 1 visualizamos a implantação, à esquerda, da tela de polipropileno e, à direita, a revestida. Esta última é constituída de superfícies diferentes sendo fundamental o seu posicionamento correto. A face que, em tese, diminui as aderências é composta por celulose oxidada regenerada e foi posicionada em contato com o conteúdo visceral do animal. A síntese da pele foi feita com fio de náilon 3-0.



**Fig. 1** - Inserção das próteses, à esquerda a tela de polipropileno e sua fixação com fio de polipropileno 4-0. À direita, tela separadora de tecidos fixada com a mesma sutura.

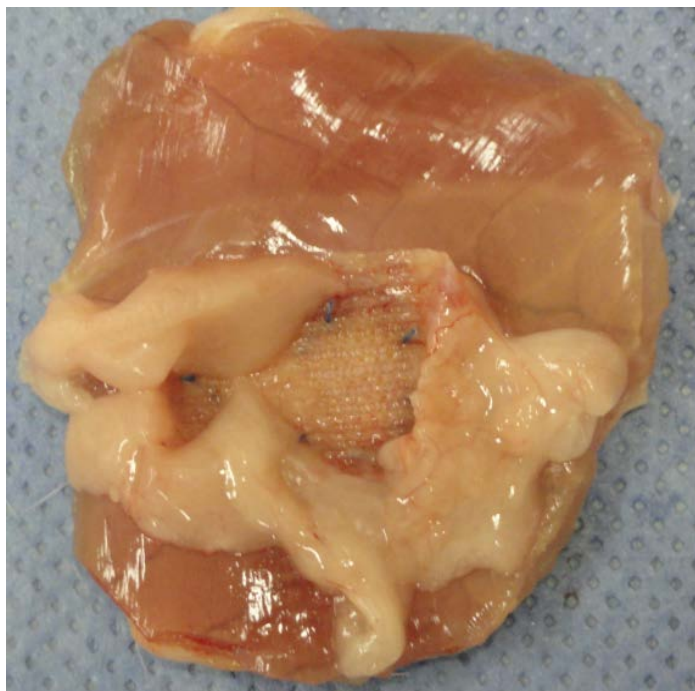
## **PERÍODO DE OBSERVAÇÃO**

Logo após o procedimento os animais permaneceram em incubadora dotadas de aquecimento e distribuídos em gaiolas individuais. O tempo de seguimento estipulado foi de 90 dias.

## **MORTE e ANÁLISE VARIÁVEIS**

Após o tempo de seguimento foi realizada a morte por câmara de CO<sup>2</sup>. Foi ressecado toda a parede abdominal anterior com a prótese implantada (Fig. 2). As aderências foram graduadas utilizando um escore próprio (Tabela 1). Após as peças foram acondicionadas em recipientes com solução de formalina tamponada a 10% e identificadas individualmente conforme o grupo em vistas da posterior análise microscópica e imuno-histoquímica.





**Fig. 2** – Fotografia da parede abdominal anterior ressecada com a prótese implantada - grupo polipropileno.

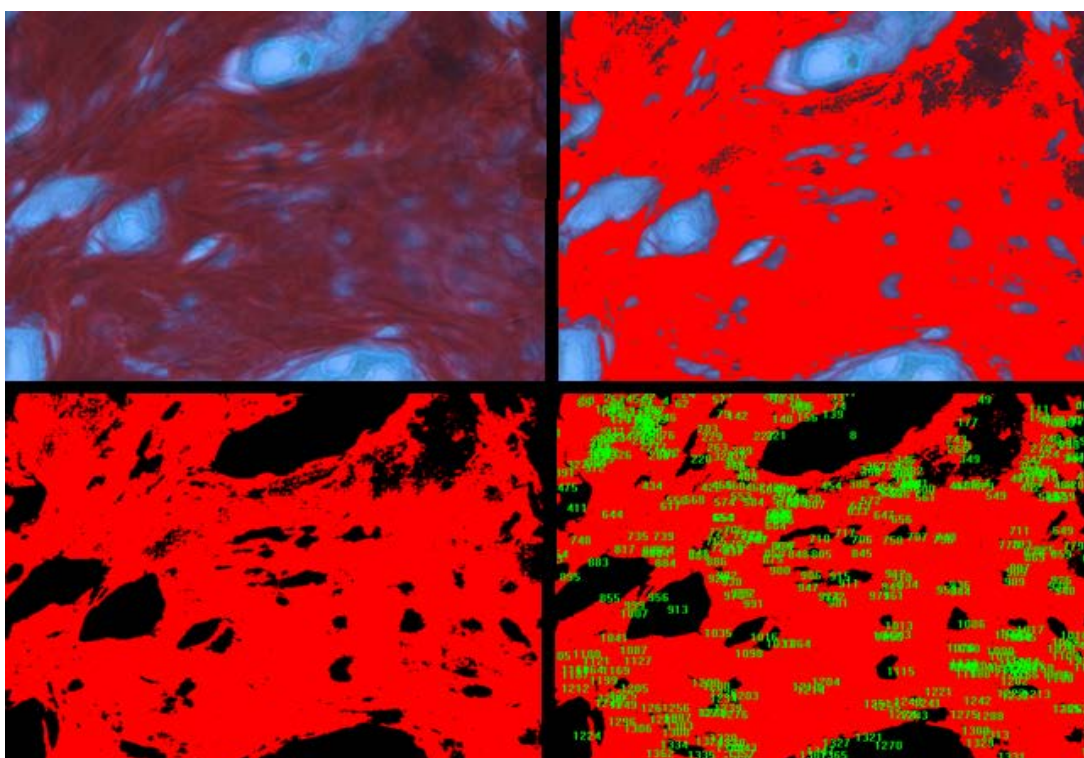
**Tabela 1** – Escore de avaliação das aderências.

Parâmetro	Escore				
	0	1	2	3	4
% Aderências em cada retalho da tela	Ausente	1-25% área da tela com adesão	26-50% área da tela com adesão	51-75% área da tela com adesão	76-100% área da tela com adesão
Espessura da Aderência	Ausente	< 5mm	5-10 mm	11-15 mm	15mm
Resistência da aderência	Ausente	Separação espontânea da aderência	Aderência separada por tração	Aderência separada por dissecação	----

Valores são reportados como as somas das aderências e a intensidade variando de 0 a 12.

## MICROSCÓPICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

O processamento do material foi o usual do Laboratório de Patologia Experimental com a peça processada em parafina, cortadas com 4  $\mu\text{m}$  e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). A análise do colágeno qualitativamente e quantitativamente foi feita por técnica de imuno-histoquímica com aplicação de anticorpo monoclonal anticolágeno tipo I e III. A avaliação quantitativa do colágeno total foi feita utilizando-se a técnica de picrossírius. A análise de todos os tipos de colágeno foi feita com videomorfometria ótica computadorizada. (Fig. 3) A patologista que avaliou a microscopia não tinha conhecimento de qual grupo pertencia cada lâmina assim, portanto um ensaio cego. Ainda a profissional apresentava ampla expertise na análise deste tipo de material. Na avaliação das lâminas de HE foi quantificado o número de neutrófilos, linfócitos, células gigantes (gigantócitos) e as voltas de macrófagos ao redor de cada filamento da tela. A contagem destes tipos celulares em 10 campos amostrais para cada lâmina e após a média dos valores para fins estatísticos foi a metodologia neste tempo.



**Fig. 3** – Processo de análise videomorfométrica. Colágeno total corado com picrossírius e quantitativamente avaliado pelo número de pixels na imagem digitalizada.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

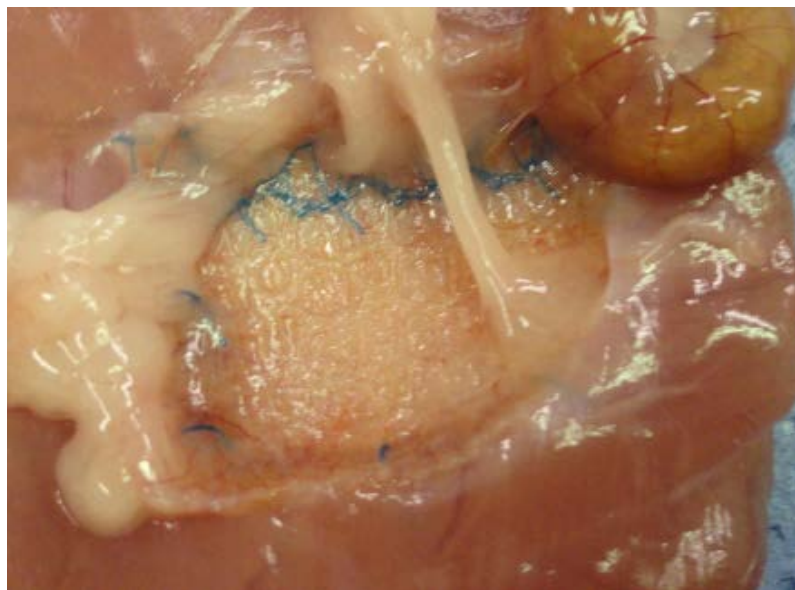
Os dados com distribuição normal foram analisados usando o teste t de student no nível de 95% de confiança ( $p < 0.05$ ), usando-se média e desvio-padrão. A diferença das médias (tamanho do efeito – E/S) foi uma análise estatística requintada que gerou conclusões mais elaboradas. A variável preditora do estudo foi o uso dois tipos de telas cirúrgicas e a variável desfecho a quantificação das aderências, o peso, os tipos celulares, o colágeno total, tipo I e III.

## **RESULTADOS**

O peso basal dos animais não foi significativamente diferente entre os grupos. ( $P=0,965$ ) Igualmente a diferença de peso no nonagésimo dia entre os grupos polipropileno e polipropileno revestido não foi estatisticamente diferente. ( $P=0,241$ ). (E/S -0,02 entre os grupos no início do trabalho e E/S 0,76 entre eles no fim do trabalho)

## **ANÁLISE MACROSCÓPICA**

A análise quantitativa revelou a média do escore de aderências do GP foi 7,5 (DP=1,65) e do GPC foi 6,14 (DP=2,91) (Fig. 12). Qualitativamente todos os animais do grupo polipropileno apresentaram aderência de epíplon à tela. No GPC um animal apresentou aderência de cólon (Fig. 4), um de intestino delgado e três de epíplon. Não houve significância estatística entre os grupos na variável aderência medida pelo escore próprio e o tamanho de efeito em favor do grupo polipropileno foi moderado. ( $P=0,335$  e  $E/S=0,56$  respectivamente)



**Fig. 4** – Aderência de cólon e epíplon no grupo Proceed. Notadamente mais localizada na inserção da tela à parede abdominal do animal.

### **ANÁLISE MICROSCÓPICA**

A média do número de neutrófilos do GP foi 6,15 por campo (DP=2,96) e de 3,39 por campo no GPC (DP= 3,30) sem diferença significativa entre eles. (P=0,142) A média de linfócitos do GP foi 4,65 (DP=1,46) e do GPC foi 2,71 (DP=1,53). Houve significância estatística nesta variável (P=0,041). As células gigantes tiveram como média no GP 3,1 (DP=0,87) e no GPC 4,02 (DP=1,78). Não houve diferença nesta variável. (P=0,260) Os macrófagos foram avaliados pelo número de voltas que apresentavam ao redor de cada filamento da tela. O GP teve 3,06 (DP=0,56) e GPC foi 3,03 (DP=0,68) voltas de macrófagos. Não houve diferença estatística. (P=0,940)

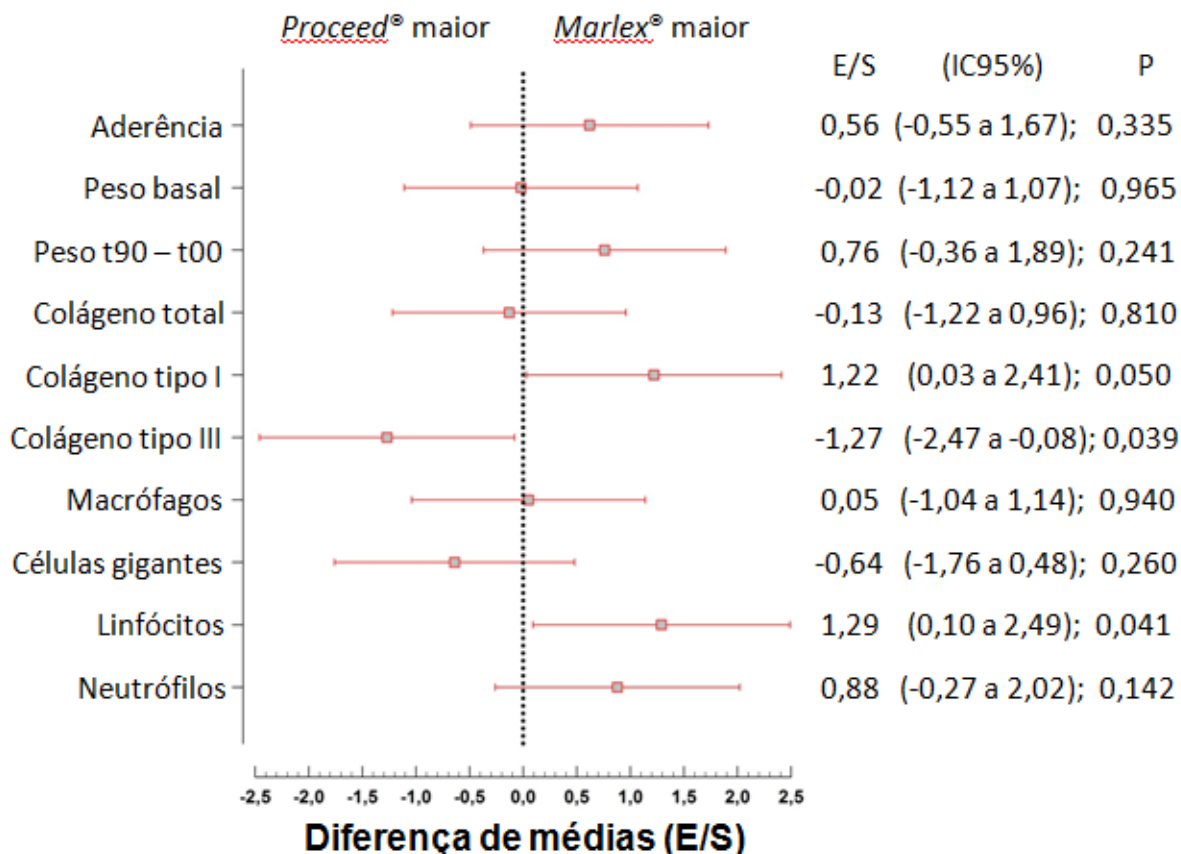
### **ANÁLISE VIDEOMORFOMÉTRICA**

#### **COLÁGENO TOTAL, TIPO I e TIPO III**

A média em pixels, para o grupo polipropileno, feita automaticamente por software específico foi para o colágeno total, tipo I e tipo III respectivamente 1777,68 (DP=586,62); 321,68 (DP=121,80); 241,51 (DP=586,52). O grupo revestido teve 1889,77 (DP=1016,80); 201,91 (DP=72,55); 441,88 (DP=190,6) para a mesma sequência de variáveis citadas. Houve diferença estatística para a variável colágeno tipo III (P=0,039), não havendo para o colágeno tipo I (P=0,050). O colágeno total também não teve diferença estatística entre os grupos

(P=0,810). Em relação ao tamanho do efeito, notamos que o colágeno tipo III tem grande tamanho de efeito no grupo revestido, demonstrando com isso intensa expressão deste tipo naquele grupo.

O tamanho do efeito (effect size - E/S) de cada variável do estudo pode ser visto na Figura 5.



**Fig. 5** – Gráfico de floresta representando as diferenças de médias padronizadas (E/S) entre as variáveis selecionadas para os grupos tratados com a prótese revestida e de polipropileno.

## DISCUSSÃO

A prótese de polipropileno, experimentalmente descrita no fim da década de 50 por Usher, foi considerada desde então de grande importância no reparo de defeitos herniários em humanos.<sup>17</sup> A literatura é rica em pesquisa com este tipo de prótese e seu uso é suportado amplamente. O tema que se impõe é o desenvolvimento de aderências intra-abdominais quando se faz uso deste tipo de tela. Aderências pós-operatórias têm sido relatadas entre 56-100% com taxas de complicações também não desprezíveis variando desde 20-50% para dor pélvica crônica até 74% para obstrução intestinal. O uso de materiais de barreira buscando

reduzir as aderências têm sido constantemente pesquisado, entretanto algumas vezes os resultados são contraditórios.<sup>6 7 10 24</sup>

A comparação primordial deste trabalho foi analisar uma tela de uso consagrado na clínica cirúrgica (polipropileno) com uma prótese revestida. O tempo de seguimento da pesquisa, noventa dias, foi estabelecido em virtude de não haver na literatura artigos com seguimento prolongado. A prótese revestida por se tratar de uma nova terapêutica no tratamento da hérnia estudos em humanos são escassos, portanto o modelo de estudo animal é adequado aos objetivos da pesquisa. Comparações diretas em humanos de materiais inabsorvíveis com bioabsorvíveis são escassos sendo incerto as complicações à longo prazo.

23

Informações técnicas disponibilizadas pelo fabricante da prótese revestida referem como sendo constituída de polipropileno, polidioxonona e de um composto de barreira anti-aderência bioabsorvível chamado celulose oxidada regenerada (Surgicel<sup>®</sup>). Esta última camada tem sido empregada na prevenção de aderências intra-abdominais e como barreira hemostática.<sup>25</sup> A camada de polímero de polidioxonona encapsula a camada de polipropileno à de celulose oxidada regenerada juntando-as. A camada de polipropileno é uma malha de baixo peso flexível e que permite o crescimento tecidual por entre seus poros sendo responsável pela adesão da prótese.

O modelo de criação da hérnia incisional demonstrou ser eficaz e condizente com os objetivos da pesquisa, assim como previamente estudado.<sup>24</sup> A fixação da tela em íntimo contato com as vísceras foi primordial e se demonstrou adequada à análise das aderências. A totalidade dos animais teve uma satisfatória síntese das bordas da prótese à parede abdominal anterior.

A análise dos dados demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os pesos dos animais no início do trabalho e um tamanho do efeito desprezível mostrando, portanto a equanimidade na seleção dos grupos. Igualmente o peso ao fim dos noventa dias não foi estatisticamente diferente entre os grupos tratados. Todos os treze animais tiveram aumento de peso no tempo de seguimento de noventa dias tendo um aumento maior, avaliado pelo tamanho do efeito, no grupo polipropileno ao fim do trabalho.

Idealmente planejado com sete animais em cada grupo e com um tempo de seguimento que poderia propiciar perdas ao longo do estudo; no entanto ao término tivemos apenas um óbito e o restante dos animais completaram o estudo sem complicações relacionadas à

inserção das próteses. O óbito ocorreu em um animal do grupo polipropileno provavelmente decorrente de infecção respiratória no primeiro mês de seguimento.

No gráfico de floresta da Figura 18 notamos todos os tamanhos do efeito fornecendo a dimensão da diferença entre as próteses para cada uma das variáveis do trabalho. Este gráfico, diferença de médias, explica os resultados da pesquisa na sua totalidade sendo, portanto um painel dos achados da pesquisa.

A pesquisa das aderências pelo escore e a análise de materiais de barreira tem sido constante na literatura cirúrgica.<sup>24 27 28</sup> Nesta variável, aderência, não houve diferença estatística entre as telas e o tamanho do efeito foi pequeno. O entendimento do conceito do tamanho do efeito é primordial, pois com ele podemos ver a diferença real entre os grupos mesmo com a hipótese nula não refutada para algumas variáveis. Valores do tamanho do efeito de até 0,20 são considerados pequenos, entre 0,20 e 0,50 médios e maiores que 0,80 grandes.<sup>29</sup> A magnitude do efeito na variável aderência é pequena entre as duas próteses, e, isto gera o entendimento de que a tela revestida não diminui as aderências até o nonagésimo dia pós-operatório. A prótese revestida é composta por polipropileno, polidioxona e celulose oxidada regenerada. Esta última é um composto bioabsorvível que é absorvido em vinte e oito dias. Portanto ao término do trabalho, aos noventa dias, este material foi completamente absorvido e não era notado macroscopicamente.

O que podemos formular é que a absorção da celulose oxidada regenerada expõe a camada de polipropileno ao conteúdo visceral abdominal e que por consequência ocasionou as aderências encontradas. Outro trabalho experimental demonstrou que a celulose oxidada regenerada gerou aderência em quase metade dos animais do estudo.<sup>25</sup>

A distribuição das aderências no grupo revestido deu-se de maneira irregular, mais intensamente nas bordas da prótese que estavam em contato com a parede abdominal. O uso de fio de polipropileno na sutura de fixação da tela à parede pode explicar as aderências mais localizadas na periferia da tela (Figura 13). No grupo polipropileno as aderências se fizeram de forma mais distribuídas em toda a área da tela semelhante a outros estudos.<sup>27 28</sup> Todos os animais do grupo polipropileno tiveram aderências de epíplon, mas também intestino delgado e cólon. Este achado é bem descrito por inúmeros trabalhos disponíveis.<sup>16 17 24 25 27 28</sup> As aderências podiam ser facilmente destacadas da tela em ambos os grupos. Adesões das telas inabsorvíveis são conhecidas e diversos graus de aderências podem estar presentes ocorrendo formação de reação de corpo estranho quando este tipo de prótese é utilizada. O processo de

formação das aderências é complexo sendo basicamente iniciado pelo processo de injúria tecidual que rompe o balanço entre coagulação e fibrinólise. A deposição de fibrina resulta em uma matriz onde os fibroblastos produzem matriz extra-celular. O término do processo gera diversos graus de aderências.<sup>23</sup> As tentativas de inibição, ou minimização desta reação são inúmeras visto a morbidade relacionada às aderências. As biopróteses buscam reparação tecidual nativa com menos atividade inflamatória e formação de corpo estranho.<sup>23</sup> Estudo experimental em coelhos demonstrou que até 40% das telas estruturadas com polipropileno mesmo revestidas com materiais bioabsorvíveis causam aderências em modelo animal.<sup>30</sup>

A análise do colágeno foi realizada com auxílio de imuno-histoquímica agregado com a tecnologia de videomorfometria computadorizada o que permitiu uma caracterização quantitativa da variável colágeno (total, tipo I e tipo III). O número de pixels de cada foto forneceu dados quantitativos, pois se sabe que este tipo de dado é melhor que o qualitativo na estatística. Para tal fizemos a média do número de pixels de quatro campos em cada lâmina. Este tipo de técnica é bem estruturado no grupo de pesquisa e publicações utilizaram esta metodologia. A pesquisa do colágeno com utilização da metodologia imuno-histoquímica torna o trabalho confiável sendo sua utilização fundamental na identificação dos colágenos I e III.<sup>31 32</sup>

O colágeno tipo I não foi estatisticamente significativo entre os grupos com um tamanho de efeito grande (1,22) em favor do grupo polipropileno. A argumentação disto é de que o colágeno tipo I foi encontrado mais no grupo polipropileno do que no grupo Proceed mesmo não havendo significância estatística.

O colágeno tipo III foi estatisticamente significativo entre os grupos sendo o tamanho do efeito grande (-1,27) em favor ao grupo revestido. O significado é de que o colágeno tipo III foi expresso com uma dimensão muito grande no grupo revestido. As alterações do metabolismo do colágeno e do tecido conjuntivo contribuem para formação de hérnia. Estudos demonstraram que pacientes com hérnia apresentam grande quantidade de colágeno tipo III. Este tipo de colágeno é considerado imaturo, fraco e que propicia fibras frágeis e de qualidade não ideal sendo encontrado nas fases iniciais de cicatrização.<sup>33</sup> No presente trabalho o colágeno tipo III foi expresso mais no grupo revestido e com base no resultado da pesquisa isto poderia aumentar a formação de hérnias. Não somente a expressão do colágeno tipo III se faz mais intensamente em pacientes com hérnia mas também a própria redução da síntese de colágeno pelos fibroblastos.<sup>32</sup> Por se tratar de uma prótese relativamente nova não



há dados de pesquisas *in vivo* com tempo de seguimento razoável para podermos associar estes resultados à clínica cirúrgica diária.

Assim também o colágeno total não foi estatisticamente significativo entre os grupos com uma força de associação extremamente pequena (-0,13). Entretanto a análise do colágeno tipo I e III foi fundamental para a análise crítica das próteses. Sabe-se que o colágeno tipo I é encontrado em tecidos cicatriciais maduros e a diminuição da relação colágeno I:III é associada a formação de hérnias.<sup>33</sup> A incidência de hérnia incisional e sua recidiva estão relacionadas ao metabolismo do colágeno tendo causas metabólicas envolvidas, assim como tabagismo, hormônios e uso de drogas. A formação herniária é influenciada por alterações na matriz extracelular e estudos epidemiológicos demonstram um defeito na biologia do tecido de cicatrização.<sup>34</sup>

A histologia das próteses não se notou diferença nos macrófagos, células gigantes e neutrófilos, sendo, portanto não significativas. Somente os linfócitos apresentaram diferença estatisticamente significativa. Como a análise foi em um único tempo aos noventa dias não podemos fazer inferências sobre o comportamento celular em mais de um tempo como relatado por outros.<sup>35</sup> Sabemos que os linfócitos foram o único tipo celular que mostrou diferença significativa. Estes estão envolvidos na resposta inflamatória inespecífica, recrutam macrófagos e influenciam diretamente a atividade fagocitária.

Evidências do uso de próteses são fortes e amplamente suportadas pela literatura, entretanto a seleção do tipo de prótese que poderá ser utilizada não nos parece uma decisão simples. Características particulares da prótese e do paciente devem ser sempre analisadas em conjunto para uma adequada escolha. Escassos estudos clínicos são disponíveis com a prótese revestida. Um dos poucos disponíveis mostra que em cirurgia videolaparoscópica de correção de hérnia ventral é uma prótese adequada e com baixos índices de complicações.<sup>36</sup>

O que apresentamos com este trabalho foi que, em modelo experimental, o uso da tela com mecanismo de barreira não exclui a possibilidade de ocorrência de aderências. Por conseguinte todas as complicações inerentes ao processo de formação de aderências como obstrução intestinal, fístulas, granulomas poderão por ventura ser constatadas com o uso deste tipo de prótese. De fato como mencionado não se dispõe de dados de ensaios clínicos com seguimento em longo prazo com a utilização da tela com camada de proteção contra aderências. Estudos clínicos ulteriores deverão trazer a tona, com um grau de evidência

científica superior, informações sobre o comportamento dos indivíduos que foram tratados com este tipo de tela.

## **CONCLUSÕES**

1. A quantidade de aderências não foi diferente para as telas de polipropileno e polipropileno revestido.
2. O colágeno tipo I é mais proeminente na tela de polipropileno (E/S).
3. O colágeno tipo III é mais presente na de polipropileno revestido.
4. A quantidade de colágeno total não apresentou diferença entre as telas.
5. O número de linfócitos é maior no grupo polipropileno revestido.

## REFERÊNCIAS

1. Skinner, H.L. and J.L. Elliott, *Incisional hernia*. N Y State J Med, 1951. **51**(11): p. 1424-6.
2. Andreollo, N.A., et al., *Hérnias incisionais: avaliação do tratamento cirúrgico*. Revista Paulista de Medicina, 1984. **102**(1): p. 23-6.
3. Jenkins, S.D., et al., *A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects*. Surgery, 1983. **94**(2): p. 392-8.
4. Liakakos, T., et al., *Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia*. Br J Surg, 1994. **81**(2): p. 248-9.
5. Usher, F.C., *A new technique for repairing large abdominal wall defects*. . AMA Arch Surg, 1961. **82**: p. 108-15.
6. Cassar, K. and A. Munro, *Surgical treatment of incisional hernia*. Br J Surg, 2002. **89**(5): p. 534-45.
7. Chan, G. and C.K. Chan, *A review of incisional hernia repairs: preoperative weight loss and selective use of the mesh repair*. Hernia, 2005. **9**(1): p. 37-41.
8. Ellis, H., H. Gajraj, and C.D. George, *Incisional hernias: when do they occur?* Br J Surg, 1983. **70**(5): p. 290-1.
9. Neto, J.M.K., *Hérnia Incisional*, in *Hérnias da Parede Abdominal*, Á.L.d. Silva, Editor 1997, Atheneu: Rio de Janeiro.
10. Usher, F.C., et al., *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. II. Clinical studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 138-45.
11. Usher, F.C. and J.P. Gannon, *Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. I. Experimental studies*. AMA Arch Surg, 1959. **78**(1): p. 131-7.
12. Dilege, E., et al., *Prevention of adhesion to prosthetic mesh in incisional ventral hernias: comparison of different barriers in an experimental model*. Eur Surg Res, 2006. **38**(3): p. 358-64.
13. Gaertner, W.B., M.E. Bonsack, and J.P. Delaney, *Visceral adhesions to hernia prostheses*. Hernia, 2010. **14**(4): p. 375-81.
14. Hutchinson, R.W., M. Chadon, and L.T. Divilio *Pre-clinical abdominal adhesion studies with proceed surgical mesh*. Global Surgery, 2004.
15. d'Acampora, A.J., et al., *Experimental study comparing the tensile strength of different surgical meshes following aponeurotic-muscle deformity synthesis on Wistar rats*. Acta Cirurgica Brasileira, 2007. **22**: p. 47-52.
16. Turza, K.C. and C.E. Butler, *Adhesions and meshes: synthetic versus bioprosthetic*. Plast Reconstr Surg, 2012. **130**(5 Suppl 2): p. 206S-13S.
17. Balbinotto, R.P., et al., *Barrier methods used to prevent pelvic adhesions in videolaparoscopy: experimental study in female rabbits*. Surg Endosc, 2011. **25**(8): p. 2637-42.
18. Lontra, M.B., et al., *Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de polipropileno na formação de aderências intraperitoneal: um modelo experimental em ratos*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 2010. **37**: p. 364-369.
19. Costa, R.G.d., et al., *Polylactic acid film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats*. Acta Cirurgica Brasileira, 2009. **24**: p. 128-135.

20. Loureiro, L.M.J. and M.G.H. Gameiro, *Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística*. Revista de enfermagem referência, 2011. **3**: p. 152-62.
21. Goldenberg, A., et al., *Comparative study of inflammatory response and adhesions formation after fixation of different meshes for inguinal hernia repair in rabbits*. Acta Cirurgica Brasileira, 2005. **20**: p. 347-352.
22. Novistky, Y.W., et al., *Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit*. J Surg Res, 2007. **1**(140): p. 6-11.
23. Fachinelli, A., M.R. Trindade, and F.A. Fachinelli, *Elastic fibers in the anterior abdominal wall*. Hernia, 2011. **15**(4): p. 409-15.
24. Gonçalves, R.O., et al., *Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 2003. **30**: p. 286-292.
25. Henriksen, N.A., et al., *Connective tissue alteration in abdominal wall hernia*. Br J Surg, 2011. **98**(2): p. 210-9.
26. Rosch, R., et al., *Hernia - A Collagen Disease?* Eur. Surg., 2003. **35**(1): p. 11-5.
27. Zogbi, L., et al., *Retraction and fibroplasia in a polypropylene prosthesis: experimental study in rats*. Hernia, 2010. **14**(3): p. 291-8.
28. Rosenberg, J. and J. Burcharth, *Feasibility and outcome after laparoscopic ventral hernia repair using Proceed mesh*. Hernia, 2008. **12**(5): p. 453-6.
29. Piazzese, E., et al., *Incidence, predisposing factors, and results of surgical treatment of incisional hernia after orthotopic liver transplantation*. Transplant Proc, 2004. **36**(10): p. 3097-8.

Conflict of interest: none

Source of financing: none

**Correspondência:**

Lucas Félix Rossi – drlucasrossi@gmail.com

Rua 8 de Julho 95/707 – Porto Alegre – RS - Brasil  
90690-240

**PERITONEAL ADHESIONS, TYPE I, III AND TOTAL COLLAGEN ON  
POLYPROPYLENE AND COATED POLYPROPYLENE MESHES:  
EXPERIMENTAL STUDY IN RATS<sup>17</sup>**

**Lucas Félix Rossi<sup>18</sup>, Manoel Roberto Maciel Trindade<sup>19</sup>, Armando José d`Acampora<sup>20</sup>,  
Luise Meurer<sup>21</sup>**

**ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Hernia correction is a routinely performed treatment in surgical practice. The improvement of the operative technique and available materials certainly has been a great benefit to the quality of surgical results. The insertion of prostheses for hernia correction is well-founded in the literature, and has become the standard of treatment when this type of disease is discussed. The purpose of this study is to evaluate two available prostheses: the polypropylene and polypropylene coated ones in an experimental model. **METHODS:** Seven prostheses of each kind were inserted into Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus*) in the anterior abdominal wall of the animal in direct contact with the viscerae. After a ninety-day follow-up we analyzed the intra-abdominal adhesions, and also performed a immunohistochemical evaluation and videomorphometry of the total, type I and type III collagen. Histological analysis was also performed with hematoxylin-eosin to evaluate cell types present in each mesh. **RESULTS:** At ninety days the adhesions were not different among the groups (P=0.335). Total collagen likewise was not statistically different (P=0.810). Statistically there was more type III collagen in the coated polypropylene group (P=0.039) while type I collagen was not different among the prostheses (P=0.050). The lymphocytes were statistically more present in the polypropylene group (P=0.041). **CONCLUSION:** The coated prosthesis was not different from the polypropylene one regarding the adhesion variable. Total and type I collagen were not different among the groups, while type III collagen is more present on the coated mesh. There was a greater number of lymphocytes on the polypropylene mesh.

**Key words:** Surgery, Animal Model, Hernia, Surgical Mesh, Tissue Adhesions.

---

<sup>17</sup> Research study performed at Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brazil.

<sup>18</sup> Digestive Tract Surgeon – Pontifícia Universidade Católica PUCRS. Porto Alegre – Brazil.

<sup>19</sup> PhD, Head of the Digestive Tract Surgery Service at Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brazil.

<sup>20</sup> PhD, Associate Professor, Operatory Technique and Experimental Surgery, Federal University of São Paulo (UNIFESP). Surgeon in Chief for General Surgery at Florianópolis Hospital. Florianópolis - Brazil

<sup>21</sup> PhD, Teacher in the Department of Pathology at Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – Brazil.

## **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** A correção herniária é um tratamento realizado rotineiramente na prática cirúrgica. O aprimoramento da técnica operatória e dos materiais disponíveis trouxe sem dúvida enorme benefício na qualidade dos resultados da cirurgia. A inserção de próteses para correção herniária é bem embasada na literatura e tornou-se o padrão de tratamento quando abordamos este tipo de doença. O objetivo deste trabalho é avaliar duas próteses disponíveis: a de polipropileno e a de polipropileno revestido em modelo experimental. **MÉTODOS:** Foram inseridas sete próteses de cada tipo em ratos Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) na parede abdominal anterior do animal em contato direto com as vísceras. Após o seguimento de noventa dias fizemos a análise das aderências intra-abdominais, bem como avaliação por imuno-histoquímica e videomorfometria do colágeno total, tipo I e tipo III. Ainda fez-se a análise histológica com hematoxilina-eosina para avaliação dos tipos celulares presentes em cada tela. **RESULTADOS:** Aos noventa dias as aderências não foram diferentes entre os grupos ( $P=0,335$ ). O colágeno total igualmente não foi estatisticamente diferente ( $P=0,810$ ). O colágeno tipo III foi estatisticamente maior no grupo polipropileno revestido ( $P=0,039$ ) enquanto o colágeno tipo I não diferiu entre as próteses ( $P=0,050$ ). Os linfócitos foram estatisticamente mais presentes no grupo polipropileno ( $P=0,041$ ). **CONCLUSÃO:** A prótese revestida não foi diferente da de polipropileno na variável aderência. O colágeno total e tipo I não foram diferentes entre os grupos enquanto que o colágeno tipo III é mais presente na tela revestida. O número de linfócitos foi maior na tela de polipropileno.

**Descritores:** Cirurgia. Modelos animais. Hérnia. Telas cirúrgicas. Aderências teciduais.

## INTRODUCTION

Incisional hernia repair has been a problem for surgeons ever since the beginning of abdominal surgery.<sup>1 2</sup> Incisional hernia is the protrusion of abdominal content through a weak point in the wall, constituted by a scar from the previous surgery. The synthesis of the abdominal wall in complex situations such as severe infections, large incisional hernias, massive loss of tissue, necrosis and tumors is a difficult problem for a general surgeon to solve, especially when they do not have sufficient autogenous tissue available for adequate primary closure.<sup>5 6 7</sup> The increase in the number of laparotomies under unfavorable conditions led to difficult, sometimes impossible situations of abdominal closure, which, consequently increased the prevalence of IH. It is a major cause of morbidity among patients<sup>8</sup> and interferes in quality of life and cosmetic results.<sup>9</sup>

The incidence of incisional hernia varies from 1 to 11%, with a great increase if the cavity is closed under tension.<sup>6</sup> IH continues to occur even several years after the base intervention.<sup>12,13</sup>

A synthetic material, to be used as a prosthesis, should follow a few basic principles: it should not change in the presence of tissue fluids, produce an inflammatory or foreign body type reaction, be carcinogenic or produce an allergy. It should be chemically inert, sterilizable, mechanically resistant and affordable.<sup>14</sup> The polypropylene prosthesis is best for the surgical treatment of IH.<sup>7 10 17</sup> However, intra-abdominal placement causes a major formation of adhesions, and may result in serious complications such as intestinal obstruction and enterocutaneous fistulae.<sup>18</sup> In order to diminish the rate of complications and the possibility of direct contact between the mesh and the abdominal viscerae, a mesh formed by polypropylene associated with a layer composed of regenerated oxidized cellulose appeared. The latter aims at reduction of adhesion formation (Proceed® Ethicon Inc, Somerville, NJ, USA). Indeed, according to the manufacturer, meshes with biological barriers are associated with much less adhesion formation than those without this structure.

The choice of mesh for incisional hernia repair may be a dilemma, since currently, various types of products are available to treat it.<sup>19</sup> Therefore, we use a mesh that is already widely used in surgical science, i.e., of pure polypropylene with a new available mesh whose characteristic is the association of materials seeking to reduce intraperitoneal adhesions. The compound mesh was developed by Ethicon® to be implanted in deep layers of the abdomen, aiming at intra-abdominal pressure to keep it in position, without visceral adhesion when it is

in a position very close to them. Excellent tissue growth and resistance with low rates of adhesion are found when using them.<sup>20</sup>

Thus, this study proposes to analyze primarily the adhesions using these two types of mesh, besides total collagen, type I and type III collagen. The histology was analyzed studying the cell types present in the prostheses.

## **METHODS**

### **VENUE OF THE STUDY**

The study was done at the Unit of Animal Experimentation (UEA- Unidade de Experimentação Animal) and at the Unit of Experimental Pathology (UPE- Unidade de Patologia Experimental) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) belonging to the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The research was funded by the Fund of Incentive to Research and Events (FIPE) and the bioethical aspects were approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals (CEUA/HCPA) under number 110079.

### **SAMPLE**

We used an experimental model on male rats (*Rattus norvegicus albinus*) of the Wistar strain, weighing 303-368 grams, approximately three months old and apparently healthy. During the entire study, they were kept under adequate environmental conditions according to the bioethical standards of work with animals. In keeping with the aims of the research, the animals were allocated by simple randomization into two groups of seven exemplars, distributed as follows: ***Polypropylene Group (GPP)***: polypropylene mesh measuring 3.0 centimeters long by 2.0 centimeters wide (6 cm<sup>2</sup>) to close the defect caused in the abdominal wall, ***Coated Polypropylene Group (GPC)***: low density polypropylene mesh associated with regenerated oxidized cellulose (COR) and polydioxone (PDS) - – Proceed<sup>22®</sup>. The same procedures were adopted in the polypropylene group using the aforementioned prosthesis.

---

<sup>22</sup> Proceed Surgical Mesh – Ethicon – Somerville, NJ - USA



## **PROSTHESES**

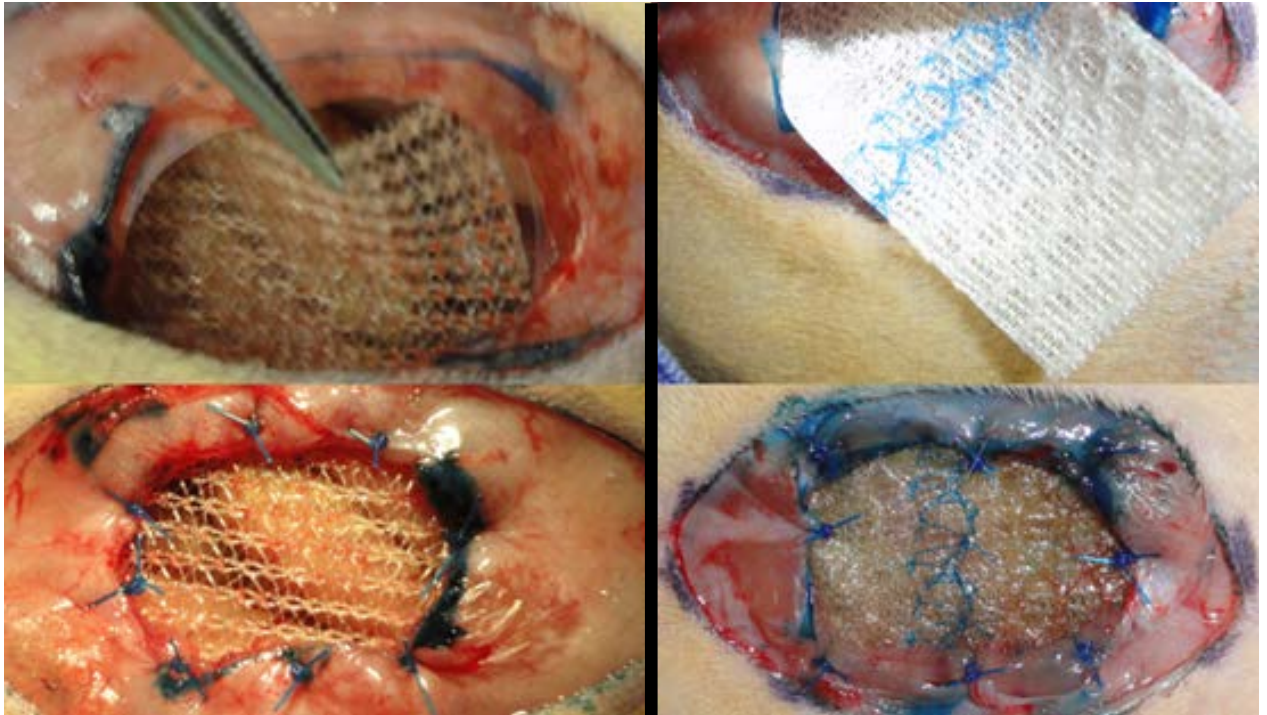
High density polypropylene prosthesis (Marlex<sup>®</sup> - Bard, UK) and low density coated prosthesis (Proceed<sup>®</sup> - Ethicon, USA)

## **SURGICAL TECHNIQUE**

Anesthesia was performed with an injection of a solution of ketamine hydrochloride (100 mg/kg) and 2% xylazine hydrochloride (10 mg/kg) at a 2:1 dilution, intraperitoneally. All principles of antisepsis were followed and no antibiotic was used at any time in the trial. The animals remained under spontaneous respiration throughout the surgical procedure. A 4-centimeter long median longitudinal incision was performed in the anterior abdominal wall. The hypodermis was dissected seeking to expose the anterior abdominal wall and enabling the creation of an incisional hernia model. A mold constituted by a segment of malleable plastic, two centimeters wide by three centimeters long and dyed with methylene blue was used to demarcate the resection. In this way a defect was created in the anterior abdominal wall and then filled with the prostheses that were being studied.

The implants were allocated in an intraperitoneal position in direct contact with the viscerae. The borders of the prosthesis were fixed to the anterior abdominal wall muscles with polypropylene 4-0 suture.

In figure 1 we see the implantation, on the left, of the polypropylene mesh and on the right the coated one. The latter has different surfaces, and it is essential to position it correctly. The face that, theoretically, reduces adhesions is composed by regenerated oxidized cellulose and it was positioned in contact with the visceral content of the animal. The skin synthesis was performed with nylon 3-0 sutures.



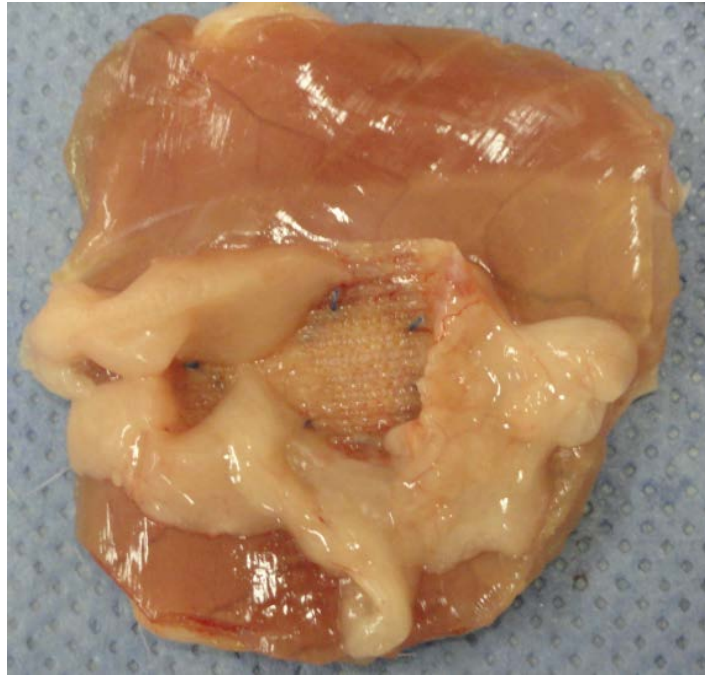
**Fig. 1** – Insertion of prostheses, on the left the polypropylene mesh and its fixation with polypropylene 4-0 suture. On the right mesh that separates tissues, fixed with the same suture.

### **OBSERVATION PERIOD**

Immediately after the procedure, the animals remained in a heated incubator and were distributed into individual cages. The stipulated follow-up time was ninety days.

### **DEATH and ANALYSIS OF VARIABLES**

After the follow-up time, the rats were killed in a CO<sup>2</sup> chamber. The entire anterior abdominal wall with the implanted prosthesis was resected (Fig. 2). The adhesions were graded using a specific score (Table 1). Afterwards they were placed in containers with a solution of 10% buffered formaldehyde, and identified individually according to group for later microscopic and immunohistochemical analysis.



**Fig. 2** – Photograph of the resected anterior abdominal wall with the implanted prosthesis – polypropylene group.

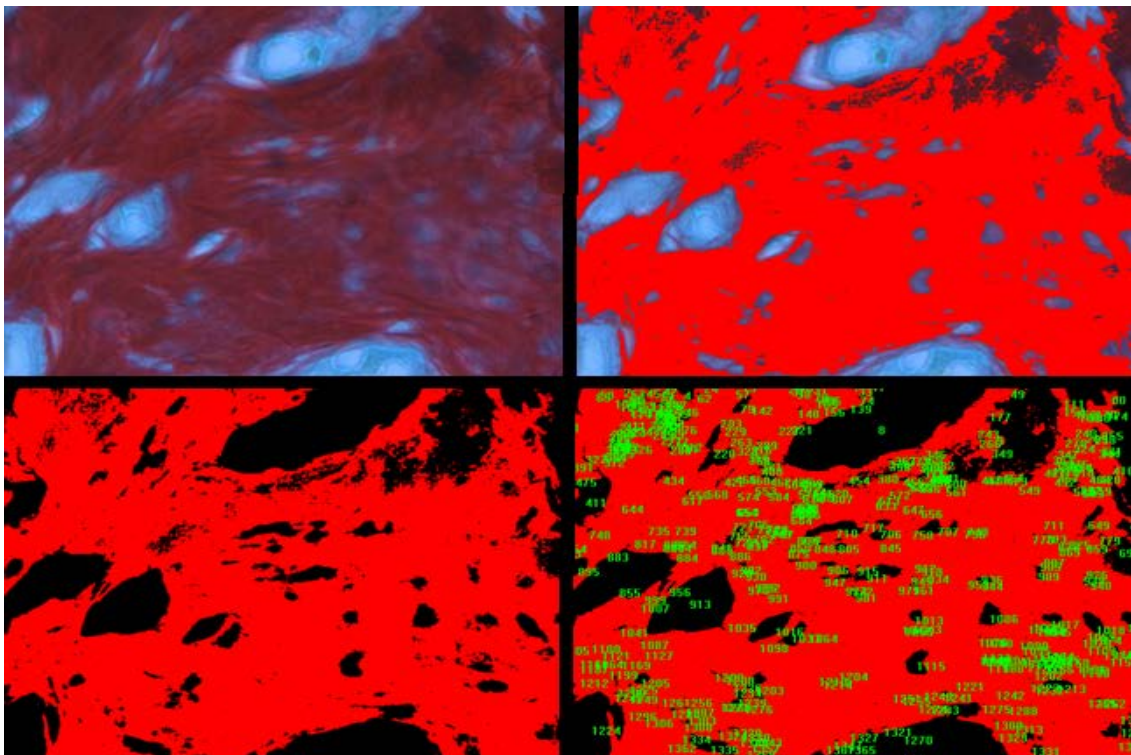
**Table 1** – Evaluation score of the adhesions.

Parameter	Score				
	0	1	2	3	4
% Adhesion in each piece of mesh	Absent	1-25% area of the mesh with adhesion	26-50% area of the mesh with adhesion	51-75% area of the mesh with adhesion	76-100% area of the mesh with adhesion
Adhesion thickness	Absent	< 5mm	5-10 mm	11-15 mm	15mm
Adhesion resistance	Absent	Spontaneous separation of the adhesion	Adhesion separated by traction	Adhesion separated by dissection	----

Values are reported as the sum of adhesions and intensity, ranging from 0 to 12.

## MICROSCOPIC AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

The material was processed in the usual manner at the Laboratory of Experimental Pathology with the specimen processed in paraffin, cut at 4  $\mu\text{m}$  and stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The qualitative and quantitative analysis of collagen was done using an immunohistochemical technique applying type I and II anticollagen monoclonal antibody. The quantitative evaluation of total collagen was performed using the picrosirius technique. The analysis of all types of collagen was performed with computed optical videomorphometry measuring the number of pixels in each image . (Fig. 3) The pathologist who evaluated the microscopy did not know to which group each slide belonged, and it was thus a blinded trial. She had wide expertise in analyzing this type of material. In evaluating the HE slides, the number of neutrophils, lymphocytes, giant cells and number of times macrophages were wrapped around each mesh filament were quantified. The cell types in 10 sample fields (200x magnification) were counted for each slide and then the mean values for each variable.



**Fig. 3** – Process of videomorphometric analysis. Collagen stained with picrosirius and quantitatively evaluated by number of pixels in the digitized image.

## **STATISTICAL ANALYSIS**

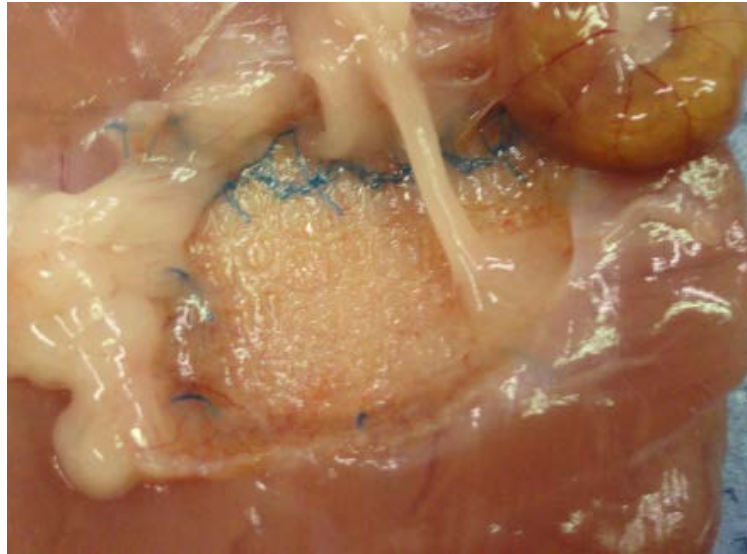
The data with a normal distribution were analyzed using the Student t test at a 95% level of confidence ( $p < 0.05$ ), with mean and standard deviation. The difference of the means (effect size – E/S) was a refined statistical analysis that generated more elaborate conclusions. The predictive variable of the study was the use of two types of surgical meshes, and the outcome variable was the quantification of adhesions, weight, cell types, total, type I and type III collagen.

## **RESULTS**

The baseline weight of the animals was not significantly different among the groups. ( $P=0.965$ ) Likewise, the difference in weight on the ninetieth day between the polypropylene and coated polypropylene groups was not statistically different ( $P=0.241$ ). (E/S -0.02 between the groups at the beginning of the study and e E/S 0.76 between them at the end of the study.)

## **MACROSCOPIC ANALYSIS**

Quantitative analysis showed that the mean score of adhesions of the GP was 7.5 (SD =1.65) and of the GPC was 6.14 (SD=2.91) (Fig. 12). Qualitatively, all animals in the polypropylene group presented adhesion of the epiploon to the mesh. In the GPC on animal presented adhesion of the colon (Fig.4), one of the small bowel and three of the epiploon. There was no statistical significance between the groups in the variable adhesion, measured by its own score and the effect size in favor of the polypropylene group was moderate. ( $P=0.335$  and E/S=0.56 respectively)



**Fig. 4** – Colon and epiploon adhesion in the Proceed group. Notably more localized at the insertion of the mesh to the abdominal wall.

#### **MICROSCOPIC ANALYSIS**

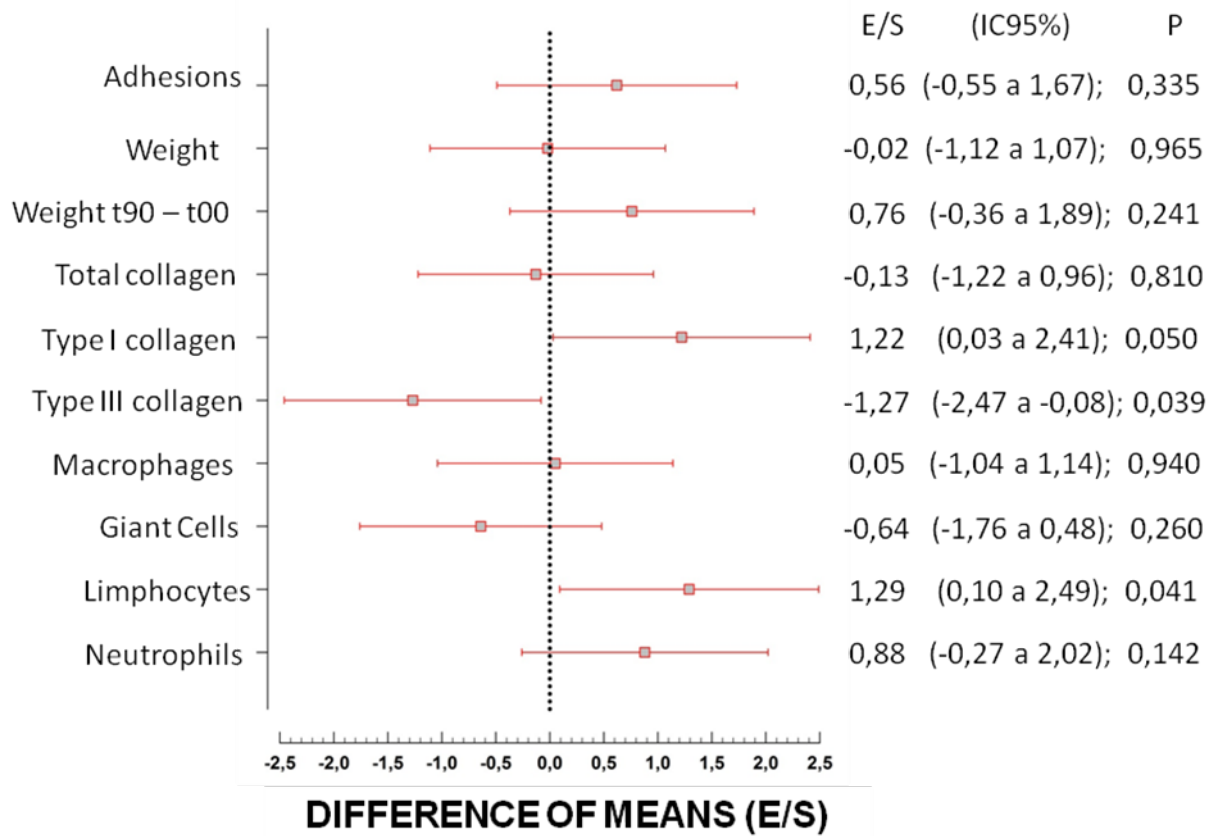
The mean number of neutrophils of the GP was 6.15 per field (SD =2.96) and 3.39 per field in the GPC (SD= 3.30) without a significant difference among them. (P=0.142) The mean number of lymphocytes in the GP was 4.65 (SD=1.46) and in the GPC, 2.71 (SD=1.53). There was a statistical significance in this variable (P=0.041). The mean of the giant cells in the GP was 3.1 (SD=0.87) and in the GPC 4.02 (SD=1.78). There was no difference in this variable. (P=0.260) The macrophages were evaluated according to the number of times they were wrapped around each filament of the mesh. In the GP the macrophages were wrapped around 3.06 (SD=0.56) times and in the GPC 3.03 (SD=0.68) times. There was no statistical difference. (P=0.940)

#### **MORPHOMETRIC ANALYSIS TOTAL, TYPE I and TYPE III COLLAGEN**

The mean number of pixels, for the polypropylene group, counted automatically by specific software, was for total, type I and type III collagen respectively 1777.68 (SD=586.62); 321.68 (SD=121.80); 241.51 (SD=586.52). The coated group had 1889.77 (SD=1016.80); 201.91 (SD=72.55); 441.88 (SD=190.6) for the same sequence of variables cited. There was a statistical difference for the type III collagen variable (P=0.039), but none for type I collagen (P=0.050). Total collagen also did not present a statistical difference

among the groups ( $P=0.810$ ). As to effect size, we noted that type III collagen has a large effect size in the coated group, thus showing the intense expression of this type in that group.

The effect size (E/S) of each variable can be seen in Figure 5.



**Fig. 5** – Forest graph showing the differences of standardized means (S/S), among the variable selected for the group treated with the coated prosthesis and the polypropylene one.

## DISCUSSION

The polypropylene prosthesis, experimentally described at the end of the 50s by Usher, has since then been considered very important to repair hernia defects in human beings.<sup>17</sup> The literature has a wealth of research on this type of prosthesis and its use is widely supported. The topic that must be dealt with is the development of intra-abdominal adhesions when this type of mesh is used. Postoperative adhesions have been reported as ranging from 20-50% for chronic pelvic pain to 74% for bowel obstruction. The use of barrier materials in an attempt to reduce adhesions has been constantly researched, but sometimes the results are contradictory.<sup>6 7 10 24</sup>

The main comparison in this study was to analyze a mesh that is widely used in surgery (polypropylene) with a coated prosthesis. The study follow-up time, ninety days, was established because there were no articles in the literature with prolonged follow-up. Because the coated prosthesis is a new therapy in the treatment of hernia, there are scarce studies on human beings, therefore the animal study model is appropriate for the objectives of the research study. Direct comparisons of unadsorbable materials to biologically absorbable materials in humans are scarce, and long term complications are uncertain.<sup>23</sup>

Technical information provided by the manufacturer of the coated prosthesis mention that it is composed of polypropylene, polydioxane and a bioabsorbable anti-adhesion barrier compound called regenerated oxidized cellulose (Surgicel®). This latter layer has been used for the prevention of intra-abdominal adhesions and as a hemostatic barrier.<sup>25</sup> The polydioxane polymer layer encapsulates the polypropylene layer to that of regenerated oxidized cellulose, joining them together. The polypropylene layer is a flexible low weight mesh which allows tissue growth through its pores and is responsible for prosthesis adhesion.

The model of the creation of incisional hernia proved effective and appropriate to the aims of the research, as previously studied.<sup>24</sup> Fixation of the mesh in close contact with the viscerae was of the utmost importance and proved adequate to analyze the adhesions. All of the animals had a satisfactory synthesis of the borders of the prosthesis to the anterior abdominal wall.

Analysis of the data showed that there was no statistically significant difference between the weights of the animals at the beginning of the study and a negligible size effect, thus showing the equanimity in the selection of the groups. Likewise, the weight at the end of the ninety days was not statistically different among the groups treated. All thirteen animals had a weight increase during the ninety-day follow-up time, with a greater increase, evaluated by size effect in the polypropylene group at the end of the study.

Ideally planned with seven animals in each group and with a follow-up time that could lead to losses during the course of the study; however, ultimately we only had a single death and the remainder of the animals completed the study without any complications related to the prosthesis insertion. The death occurred in an animal in the polypropylene group, probably as a result of respiratory infection during the first month of follow-up.

In the forest graph of Figure 18, we observed all sizes of the effect supplying the dimension of the difference among the prostheses for each of the work variables. This graph,



difference of means, explains the results of the study as a whole, and it is thus a panel of the research findings.

There has been constant research on adhesion by score and analysis of barrier materials in the surgical literature.<sup>24 27 28</sup> In this variable, adhesion, there was no statistical difference between the meshes and the size effect was small. It is essential to understand the concept of size effect, because with this we can see the real difference between the groups even if the null hypothesis has not been refuted for some variables. Size effect values of up to 0.20 are considered small, between 0.20 and 0.50 medium and larger than 0.80, big.<sup>29</sup> The magnitude of effect on the adhesion variable is small between the two prostheses, and this leads to the idea that the coated mesh does not diminish adhesions up to the ninetieth day postoperatively. The coated prosthesis is composed of polypropylene, polydioxone and regenerated oxidized cellulose. The latter is a bioabsorbable compound that is absorbed within twenty-eight days. Thus, by the end of the study, at ninety days, the material had been completely absorbed and could not be seen macroscopically.

What we can formulate is that absorption of the regenerated oxidized cellulose exposes the polypropylene layer to the abdominal visceral content and that this consequently led to the adhesions found. Another experimental study showed that regenerated oxidized cellulose caused adhesions in almost half of the animals in the study.<sup>25</sup>

The distribution of adhesions in the coated group occurred irregularly but intensively on the borders of the prosthesis that were in contact with the abdominal wall. The use of polypropylene suture thread to fixate the mesh to the wall may explain the adhesion that is located closer to the periphery of the mesh (Figure 13). In the polypropylene group the adhesions occurred in a more distributed form throughout the area of the mesh, similarly to other studies.<sup>27 28</sup> All the animals in the polypropylene group had epiploon adhesions, but also small intestine and colon. This finding is well described by many available studies.<sup>16 17 24 25 27 28</sup> The adhesions could be easily detached from the mesh in both groups. Adhesions of the unabsorbable meshes are known and several degrees of adhesion can be present, with the formation of foreign body reaction when this type of prosthesis is used. The adhesion formation process is complex and is basically started by the tissue injury process which breaks down the balance between coagulation and fibrinolysis. Fibrin deposition results in a matrix where the fibroblasts produce extracellular matrix. The end of the process generates various degrees of adhesion.<sup>23</sup> There are many attempts at inhibiting or minimizing this

reaction, considering the morbidity involved in the adhesions. The bioprotheses seek native tissue repair with less inflammatory activity and foreign body formation.<sup>23</sup> An experimental study in rabbits showed that up to 40% of the meshes structured with polypropylene, even coated with bioabsorbable materials, cause adhesions in an animal model.<sup>30</sup>

Collagen was analyzed with the help of histochemistry aggregated to the computed videomorphometry technology. This allowed a quantitative characterization of the collagen variable (total, type I and type III). The number of pixels in each photo supplied quantitative data, since it is known that this type of data is better than the qualitative one in statistics. For this purpose we measured the average number of pixels of four fields in each slide. This type of technique is well structured in the research group and publications used this methodology. Collagen research using the immunohistochemical methodology make the study reliable and its use is essential to identify collagens I and III.<sup>31 32</sup>

Type I collagen was not statistically significant among the groups with a large size effect (1,22) in favor of the polypropylene group. The argument concerning this is that type I collagen was found more in the polypropylene group than in the Proceed group even if there was no statistical significance.

Type III collagen was statistically significant among the groups and there was a large size effect (-1.27) in favor of the coated group. This means that type III collagen was expressed with a very large dimension in the coated group. The alterations in the metabolism of the collagen and the connective tissue contribute to hernia formation. Studies showed that patients with hernia present a larger amount of type III collagen. This type of collagen is considered immature, weak and favoring fragile fibers with a non-ideal quality found in the initial phases of healing.<sup>33</sup> In the present study, type III collagen was expressed more in the coated group and based on the result of the research this could increase hernia formation. Not only type III collagen expression is more intense in hernia patients, but also the reduction itself of collagen synthesis by fibroblasts.<sup>32</sup> Since it is a relatively new prosthesis, there are no data on in vivo research with a reasonable follow-up time to be able to associate these results with daily surgical practice.

Hence also total collagen was not statistically significant among the groups with an extremely low association force (-0,13). However, the analysis of type I and III collagen was essential for critical analysis of the prostheses. It is known that type I collagen is found in mature scar tissue and the reduction of the I:III collagen ratio is associated with hernia

formation.<sup>33</sup> The incidence of incisional hernia and its recurrence are related to collagen metabolism. Metabolic causes are involve as well as smoking, hormones and drug use. Hernia formation is influenced by alterations in the extracellular matrix and epidemiological studies show a defect in the biology of the scar tissue.<sup>34</sup>

In the histology of the prostheses, no difference was noted in macrophages, giant cells and neutrophils, and thus they are not significant. Only the lymphocytes presented a statistically significant difference. Since analysis was done in a single step at ninety days, we cannot infer anything about cellular behavior in more than one time step, as reported by others.<sup>35</sup> We know that the lymphocytes were the only cell type that showed a significant difference. These are involved in the non-specific inflammatory response, they recruit macrophages and influence phagocytic activity directly.

There is strong evidence, widely supported in the literature, regarding the use of prostheses. However, we do not believe that the selection of the type of prosthesis that can be used is a simple decision. Specific characteristics of the prosthesis and the patient, should always be analyzed together for an appropriate choice. There are few clinical studies available with a coated prosthesis. One of the few available shows that in videolaparoscopic surgery to correct ventral hernia, it is an adequate prosthesis with low rates of complication.<sup>36</sup>

What we presented in this study showed that in an experimental model the use of mesh with a barrier mechanism does not prevent the possibility of adhesions. Consequently all complications inherent to the process of adhesion formation, such as bowel obstruction, fistulae and granulomas may be found using this type of prosthesis. Indeed, as mentioned, there are no data from clinical trials with a long term follow-up using mesh with a layer of protection against adhesions. Further clinical trials will reveal, with a higher degree of scientific evidence, information about the behavior of individuals who were treated with this kind of mesh.

## **CONCLUSIONS**

1. Quantity of adhesions was not different for the polypropylene and coated polypropylene meshes.
2. Type I collagen is more prominent on the polypropylene mesh (E/S).
3. Type III collagen is more often present on the coated polypropylene mesh.
4. The quantity of total collagen did not show any difference between the meshes.
5. The number of lymphocytes is greater in the coated polypropylene group.

## **REFERENCES**

1. Skinner HL, Elliott JL. Incisional hernia. *New York state journal of medicine* 1951;51(11):1424-6.
2. Andreollo NA, Brandalise NA, Fagundes JJ, L.S. L, M. M. Hérnias incisionais: avaliação do tratamento cirúrgico. *Revista Paulista de Medicina* 1984;102(1):23-6.
3. Acquaroni D. Hérnia Incisional. In: Zerbini EJ, editor. *Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Netto*. São Paulo: Sarvier, 1974:100-7.
4. Mittelstaedt WEM, Andrade ACH, Fontes W, Festa E, Mester M, Pires P, et al. Hérnias incisionais: revisão de 228 casos operados no hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo. *Revista Paulista de Medicina* 1986;104:117-27.
5. Jenkins SD, Klamer TW, Parteka JJ, Condon RE. A comparison of prosthetic materials used to repair abdominal wall defects. *Surgery* 1983;94(2):392-8.
6. Liakakos T, Karanikas I, Panagiotidis H, Dendrinou S. Use of Marlex mesh in the repair of recurrent incisional hernia. *The British journal of surgery* 1994;81(2):248-9.
7. Usher FC. A new technique for repairing large abdominal wall defects. *AMA Arch Surg* 1961;82:108-15.
8. Cassar K, Munro A. Surgical treatment of incisional hernia. *The British journal of surgery* 2002;89(5):534-45.
9. Chan G, Chan CK. A review of incisional hernia repairs: preoperative weight loss and selective use of the mesh repair. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2005;9(1):37-41.
10. Usher FC, Fries JG, Ochsner JL, Tuttle LL, Jr. Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. II. Clinical studies. *AMA Arch Surg* 1959;78(1):138-45.
11. Mudge M, Hughes LE. Incisional hernia: a 10 year prospective study of incidence and attitudes. *The British journal of surgery* 1985;72(1):70-1.
12. Ellis H, Gajraj H, George CD. Incisional hernias: when do they occur? *The British journal of surgery* 1983;70(5):290-1.
13. Piazzese E, Montalti R, Beltempo P, Bertelli R, Puviani L, Pacile V, et al. Incidence, predisposing factors, and results of surgical treatment of incisional hernia after orthotopic liver transplantation. *Transplantation proceedings* 2004;36(10):3097-8.
14. Neto JMK. Hérnia Incisional. In: Silva ÁLd, editor. *Hérnias da Parede Abdominal*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997.
15. Garland JG. Incisional hernia. *Wisconsin medical journal* 1952;51(11):1079-80.
16. Goldenberg A, Matone J, Marcondes W, Herbella FAM, Farah JFdM. Comparative study of inflammatory response and adhesions formation after fixation of different meshes for inguinal hernia repair in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira* 2005;20:347-52.
17. Usher FC, Gannon JP. Marlex mesh, a new plastic mesh for replacing tissue defects. I. Experimental studies. *AMA Arch Surg* 1959;78(1):131-7.
18. Dilege E, Coskun H, Gunduz B, Sakiz D, Mihmanli M. Prevention of adhesion to prosthetic mesh in incisional ventral hernias: comparison of different barriers in an experimental model. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 2006;38(3):358-64.
19. Gaertner WB, Bonsack ME, Delaney JP. Visceral adhesions to hernia prostheses. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2010;14(4):375-81.
20. Hutchinson RW, Chadon M, Divilio LT. Pre-clinical abdominal adhesion studies with proceed surgical mesh. *Global Surgery: Ethicon*, 2004.

21. Silva Wd, Fagundes DJ, Seidel AC, Taha MO. Animal model of chronic abdominal hernia in rabbit. *Acta Cirurgica Brasileira* 2009;24:256-61.
22. Amid PK. Polypropylene prostheses. In: Bendavid R, Abrahamson J, Arregui ME, editors. *Abdominal Wall Hernias: Principles and management*. New York: Springer-Verlag, 2001:272-77.
23. Turza KC, Butler CE. Adhesions and meshes: synthetic versus bioprosthetic. *Plastic and reconstructive surgery* 2012;130(5 Suppl 2):206S-13S.
24. d'Acampora AJ, Kesterling DdM, Soldi MdS, Rossi LF. Experimental study comparing the tensile strength of different surgical meshes following aponeurotic-muscle deformity synthesis on Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 2007;22:47-52.
25. Balbinotto RP, Muller AL, Nunes AG, Da Silva R, Meyer FS, Cerski CS, et al. Barrier methods used to prevent pelvic adhesions in videolaparoscopy: experimental study in female rabbits. *Surgical endoscopy* 2011;25(8):2637-42.
26. Lindenau JDR, Guimarães LSP. Calculando o tamanho de efeito no SPSS. *Rev HCPA* 2012;32(3).
27. Lontra MB, Bigolin AV, Costa RGd, Grossi JV, Scalco P, Roll S, et al. Efetividade do uso combinado de filme de ácido láctico e tela de polipropileno na formação de aderências intraperitoneal: um modelo experimental em ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 2010;37:364-69.
28. Costa RGd, Lontra MB, Scalco P, Cavazzola LT, Gurski RR. Polylactic acid film versus acellular porcine small intestinal submucosa mesh in peritoneal adhesion formation in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 2009;24:128-35.
29. Loureiro LMJ, Gameiro MGH. Interpretação crítica dos resultados estatísticos: para lá da significância estatística. *Revista de enfermagem referência* 2011;3:152-62.
30. Novistky YW, Harrel AG, Cristiano JA, Paton BL, Norton HJ, Peindl RD, et al. Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a rabbit. *The Journal of surgical research* 2007;1(140):6-11.
31. Fachinelli A, Trindade MR, Fachinelli FA. Elastic fibers in the anterior abdominal wall. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2011;15(4):409-15.
32. Gonçalves RO, Silva EM, Marques TC, Lopes Filho GJ. Avaliação histoquímica quantitativa do colágeno na fascia transversalis e na bainha anterior do músculo reto abdominal em doentes com hérnia inguinal. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 2003;30:286-92.
33. Henriksen NA, Yadete DH, Sorensen LT, Agren MS, Jorgensen LN. Connective tissue alteration in abdominal wall hernia. *The British journal of surgery* 2011;98(2):210-9.
34. Rosch R, Junge K, Lynen P, Mertens PR, Klinge U, Schumpelick V. Hernia - A Collagen Disease? *Eur. Surg.* 2003;35(1):11-5.
35. Zogbi L, Portella AO, Trindade MR, Trindade EN. Retraction and fibroplasia in a polypropylene prosthesis: experimental study in rats. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2010;14(3):291-8.
36. Rosenberg J, Burcharth J. Feasibility and outcome after laparoscopic ventral hernia repair using Proceed mesh. *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery* 2008;12(5):453-6.

Conflict of interest: none  
Source of financing: none

**Correspondence:**

Lucas Félix Rossi – drlucasrossi@gmail.com  
Rua 8 de Julho 95/707 – Porto Alegre – RS - Brazil  
90690-240

**Hernia** 

HOME • LOG OUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: fish2121

**Submissions Being Processed for Author Lucas Félix Rossi, M.D.**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	HERN-D-13-00086	PERITONEAL ADHESIONS, TYPE I, III AND TOTAL COLLAGEN ON POLYPROPYLENE AND COATED POLYPROPYLENE MESHES: EXPERIMENTAL STUDY IN RATS	25-02-2013	01-03-2013	With Editor

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.