

Reparo de hérnia abdominal com pericárdio bovino associado a células-tronco mesenquimais em ratos Wistar*

Abdominal Hernia Repair with Bovine Pericardium Seeded with Mesenchymal Stem Cells in Wistar Rats

Silvana Bellini Vidor¹, Janete Maria Volpato Marques², Lanucha Fidelis da Luz Moura², Cristiano Gomes³, Ana Helena Paz⁴, Herbert Martins Gomes⁵, Luíse Meurer⁴, Rodrigo Rodrigues de Barros⁵, Karina Magano Guimarães¹, Elizabeth Obino Cirne-Lima⁴ & Emerson Antônio Contesini⁶

ABSTRACT

Background: Biological membranes demonstrate superiority over synthetic ones for its biocompatibility and strength in the reduction of abdominal hernias. Recent tissue engineering researches add mesenchymal stem cells to biological membranes with the purpose of obtaining additional cellular proliferation and consequent muscle regeneration, using biological membranes as cellular scaffolds. This article aimed to study the influence of mesenchymal stem cells in muscle regeneration in abdominal hernias, reduced with biological membranes.

Materials, Methods & Results: Adult Wistar rats underwent abdominal hernia-inducing. They were divided into two groups as to the form of treatment for the reduction of hernia: stem cells associated with biological membranes or only biological membranes. After the treatment the macro and microscopic reviews were carried out in days seven, 14 and 60 postoperatively. Preparation of bovine pericardium with glycerin 98% presented efficiency in decellularization and conservation, maintaining its strength and avoiding bacterial growth. The mesenchymal stem cells obtained from bone marrow of adult Wistar rats, had capacity of proliferation. The majority of the cells was positive for the expression of surface antigens CD44, CD29 and CD99 and was negative for CD 34. In the differentiation trials, the same cells were able to differentiate into adipocytes and osteocytes. With 24 h from co-cultivating adhesion of mesenchymal stem cells in the membranes was observed. There was no foreign body reaction or contamination of surgical wounds and there was intense postoperative neovascularization on seven days. All animals presented omentum adherence, but no adherence to other organs. There was no statistically difference for the different times in macroscopic assessment: deposition of fibrous tissue, implant integration. The same occurred with the microscopic evaluations between the different treatment groups. The groups of immediate and later repair presented different responses to treatment.

Discussion: The use of rats as animal model was satisfactory, being suitable for surgical procedures and assessments of the abdominal cavity. The different results obtained between groups of immediate repair and late repair corroborate with the idea that there is difference between induction and repair models in the same surgery or in different surgeries with the time interval between the two, suggesting the need for methodologies that simulate the hernias chronicity. The cells used were classified as mesenchymal stem cells, because it met all the criteria of Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society of Cellular Therapy. The membranes conserved with glycerin 98% demonstrated biocompatibility, because there was no rejection or necrosis, infection or exacerbated inflammation. However the muscle regeneration was not obtained over the membranes - and the methodological difference in other latest experiments about the membranes decellularization and the co-cultivating - can leads to conclusion that the cells attached to membranes were insufficient in number to obtain the desired result. These results suggest the need of new research studies or co-cultivating times and decellularization methods of bovine pericardium for association with mesenchymal stem cells.

Keywords: cellular therapy, biological membranes, wound healing, tissue engineering, muscle.

Descritores: terapia celular, membranas biológicas, cicatrização, engenharia celular, músculo.

Received: 19 April 2012

Accepted: 30 September 2012

Published: 3 January 2013

*Artigo baseado em parte do experimento da Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias da segunda autora. ¹Graduação, Faculdade de Veterinária (FaVet), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. ²M.V. autônoma. ³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. ⁴Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre. ⁵Faculdade de Engenharia Mecânica, UFRGS. ⁶Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), UFRGS. CORRESPONDENCE: E.A. Contesini [emerson.contesini@ufrgs.br - Tel.: +55 (51) 3308-6109]. Av. Bento Gonçalves n. 9090, Bairro Agronomia. CEP 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

INTRODUÇÃO

Vários tipos de implantes, naturais ou sintéticos, vêm sendo testados no reparo cirúrgico de hérnias. As membranas biológicas, ou arcabouços dérmicos descelularizados, apresentam reduzida formação de aderência entre o implante e as vísceras, diminuição da formação de fístulas, infecções e recorrências. Também apresentam resistência suficiente para suportar a pressão abdominal, evitando deiscências e eviscerações [17,18,21,39].

Além de orientar o crescimento celular na formação do novo tecido e de manter as propriedades biomecânicas, as membranas biológicas devem ser biocompatíveis. Isso ocorre pelo processo de descelularização do tecido a ser implantado, com a remoção de proteínas não estruturais, a fim de evitar reação imune do paciente após o implante [39].

As pesquisas apontam as propriedades das células-tronco no remodelamento e na regeneração de tecidos pelo estudo da engenharia tecidual. Com as pesquisas recentes em modelos animais, percebe-se que essas células complementam a ação dos implantes na reparação de hérnias. É possível obter nos animais receptores de células-tronco mesenquimais associadas às membranas biológicas maior angiogênese, maior capilaridade local e até mesmo regeneração muscular [39]. Essas células podem ainda reduzir a aderência visceral, mesmo com o uso de um implante sintético [15].

O trabalho objetiva estudar a influência das células-tronco mesenquimais na regeneração muscular em hérnias abdominais induzidas em ratos Wistar, associadas ao implante de pericárdio bovino conservado em glicerina 98%. Visa compreender como a adição dessas células pode contribuir para a cicatrização após o reparo cirúrgico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento e caracterização das células-tronco

As células-tronco mesenquimais utilizadas foram isoladas a partir de medula óssea de ratos Wistar e processadas de acordo com Paz *et al.* [29]. Resumidamente, as células de medula óssea foram plaqueadas na concentração de 1×10^7 células por frasco de cultura T25, em meio de cultura *Dulbecco minimal essential medium* (DMEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de solução antimicrobiana (penicilina e estreptomicina). Foram armazenadas em

incubadora umidificada a 37°C, na presença de 5% de CO₂. No terceiro dia de cultivo, as células não aderentes foram removidas. Quando em 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e expandidas. A cultura de células-tronco mesenquimais foi caracterizada por estimativa de dobros populacionais, imunofenotipagem e diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteócitos [30].

Preparação das membranas biológicas

As membranas biológicas consistiram de pericárdio bovino, coletado em abatedouro comercial. Foram lavadas em solução de cloreto de sódio a 0,9% e armazenadas em glicerina 98% por seis meses para a sua descelularização. Recortadas assepticamente, com o auxílio de um molde, foram novamente armazenadas em glicerina 98% por sete dias. Cinco amostras foram separadas aleatoriamente e enviadas para teste microbiológico. Para a cultura celular sobre os implantes, as membranas biológicas foram lavadas com *phosphate buffered saline* (PBS) para retirada da glicerina e reidratadas com meio de cultivo DMEM (Figura 1).

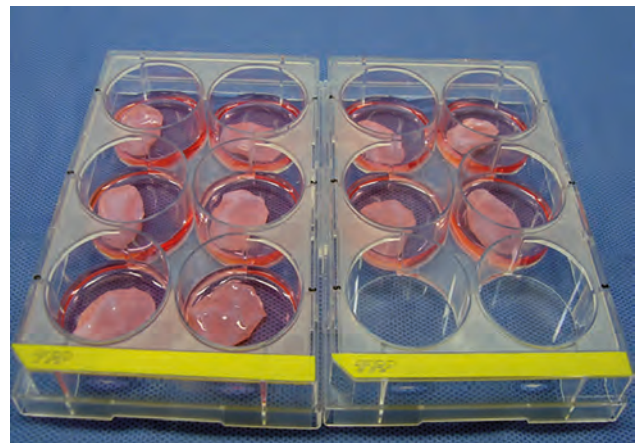


Figura 1. Fragmentos de pericárdio reidratados e mantidos em co-cultura com células-tronco mesenquimais prontos para correção do defeito herniário induzido cirurgicamente.

Associação das células-tronco às membranas biológicas

Para promover a associação entre as células-tronco mesenquimais e as membranas biológicas, as células-tronco mesenquimais foram tripsinizadas e plaqueadas sobre as membranas imersas no meio de cultivo, onde permaneceram em estufa umidificada, com 5% de CO₂, por períodos de 24 h anteriores às cirurgias. As membranas biológicas dos grupos sem células-tronco mesenquimais permaneceram em meio de cultivo idêntico e pelo mesmo período. A aderência das células-tronco mesenquimais às membranas biológicas foi observada em microscopia óptica com

coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrosírius. Para isso, após o cultivo, as membranas biológicas com células-tronco mesenquimais foram fixada sem formol a 10%. O material foi posteriormente incluído em parafina, cortado e corado por HE e Picrosírius.

Animais experimentais

Foram utilizados 60 ratos adultos, machos, hípidos, da linhagem Wistar, alocados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os animais permaneceram em ambiente controlado e receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

Grupos experimentais

Foi criado cirurgicamente um defeito muscular na linha média abdominal em todos os animais do experimento, simulando uma hérnia abdominal.

Esse defeito foi reparado com membrana biológica na mesma cirurgia (reparo imediato) ou em cirurgia posterior (reparo tardio). Nos grupos de reparo imediato, grupos 1 e 2, o defeito foi reduzido com a implantação da membrana biológica. Porém, somente o grupo 1 recebeu as células-tronco mesenquimais associadas ao implante. Nos grupos de reparo tardio, grupos 3 e 4, sete dias após a cirurgia de indução do defeito, foi realizada uma segunda cirurgia para reparação do mesmo. Somente o grupo 3 recebeu as células-tronco mesenquimais associadas à membrana biológica. Nos grupos 3 e 4, a segunda intervenção cirúrgica ocorreu por acesso cirúrgico semelhante ao dos grupos 1 e 2.

Aos sete, 14 e 60 dias de pós-operatório, cinco animais de cada um dos quatro grupos foram submetidos à eutanásia para avaliações macro e microscópicas (Tabela 1).

Tabela 1. Delineamento experimental: 12 grupos com cinco animais, com eutanásia nos tempos de 7, 14 e 60 dias (CTM: células-tronco mesenquimais).

60 ratos da linhagem Wistar												
	Com CTM - 30 ratos						Sem CTM - 30 ratos					
	Reparo imediato 15 ratos			Reparo tardio 15 ratos			Reparo imediato 15 ratos			Reparo tardio 15 ratos		
Eutanásia	7 dias	14 dias	60 dias	7 dias	14 dias	60 dias	7 dias	14 dias	60 dias	7 dias	14 dias	60 dias

Procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos

A indução anestésica foi realizada com isoflurano até os animais apresentarem ausência do reflexo interdigital e reflexo da cauda. Para analgesia, foi administrado cloridrato de tramadol (3mg.kg⁻¹,SC), e a manutenção anestésica foi realizada com máscara de isoflurano, em vaporizador universal, ao efeito, com oxigênio 100% a 500 mL.min⁻¹. A coloração da mucosa e a frequência cardíaca e respiratória foram monitoradas no trans-operatório.

Nos grupos de reparo imediato, a indução da hérnia ventral foi realizada com uma incisão longitudinal ventral mediana da pele, seguida pela divulsão de tecido subcutâneo, com o objetivo de

expor a musculatura abdominal ventral. Um fragmento de musculatura foi pinçado e, com uma tesoura Goldman-Fox serrilhada, realizou-se a ressecção do fragmento da musculatura abdominal de 1,5 cm X 2,5 cm (músculos oblíquo abdominal interno, oblíquo abdominal externo e reto abdominal). O defeito herniário foi corrigido imediatamente, com padrão de sutura contínuo simples e fio mononáilon 5-0 (Figura 2), utilizando membrana biológica com células-tronco mesenquimais no grupo 1, e somente membrana biológica no grupo 2. A síntese de pele foi realizada em padrão intradérmico, com o mesmo fio de sutura, com os nós voltados internamente para evitar que os animais roessem os pontos.

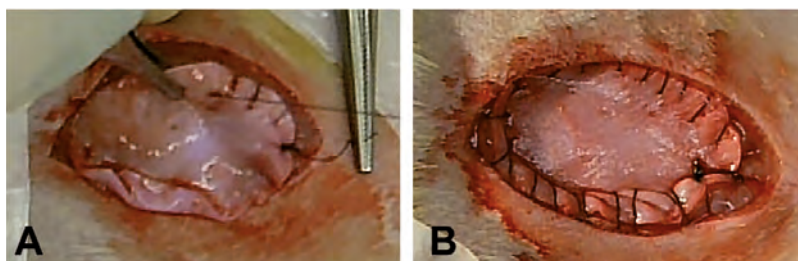


Figura 2. Correção imediata do defeito herniário, com pericárdio bovino semeado com células-tronco mesenquimais. A: Membrana sendo suturada em padrão contínuo simples com fio mononáilon 5-0. B: Aspecto cirúrgico ao término da correção da hérnia.

Na cirurgia de criação do defeito dos grupos de reparo tardio, foi realizada uma incisão cutânea transversal na região ventral pré-púbica, seguida de divulsão entre o tecido subcutâneo e a musculatura ao longo da linha Alba. Um fragmento muscular de aproximadamente 1,5 cm X 2,5 cm foi pinçado e retirado com uma tesoura Goldman-Fox serrilhada, na região medial dos músculos abdominais (Figura 3). A sutura de pele foi realizada em padrão intradérmico, com os nós voltados internamente, com fio mononáilon 5-0. Passados sete dias de pós-operatório, procedeu-se a herniorrafia destes animais com procedimento cirúrgico similar aos grupos de reparo imediato (Figura 2). Quando necessário, foram desfeitas aderências de omento ou de alças intestinais, utilizando hastes flexíveis com pontas de algodão estéreis, umedecidas com solução salina isotônica.

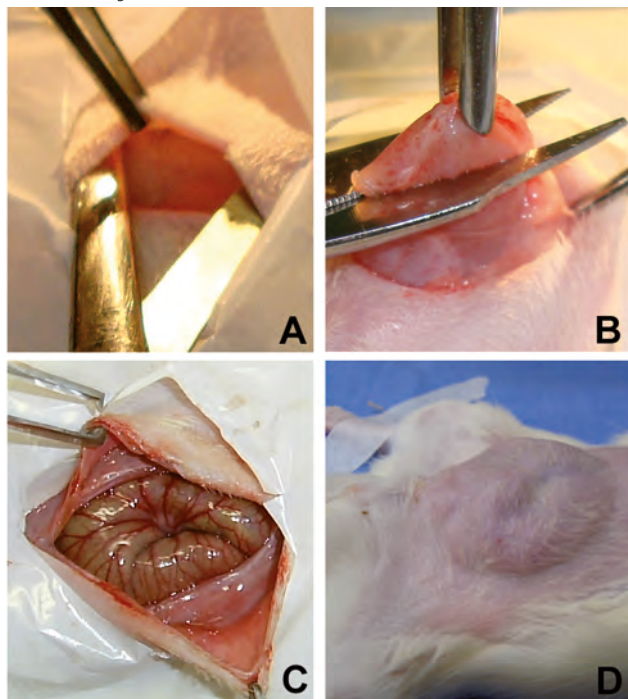


Figura 3. Criação do defeito cirúrgico dos grupos de reparo tardio. A: Divulsão do tecido subcutâneo entre a pele e a musculatura abdominal na cirurgia de indução do defeito. B: Retirada de fragmento muscular. C: Visualização cirúrgica de hérnia abdominal, na cirurgia de correção. D: Animal com grande conteúdo herniado, antes da cirurgia de correção.

Concluído o procedimento cirúrgico, realizou-se a limpeza da ferida cirúrgica com solução salina a 0,9%. No pós-operatório imediato, os animais receberam cetoprofeno (3mg.kg^{-1} SC, SID) durante dois dias. A avaliação da ferida cirúrgica foi realizada diariamente nas duas primeiras semanas e, após esse período, a cada sete dias. As eutanásias foram realizadas aos setes, 14 e 60 dias de pós-operatório, em câmara de CO_2 , conforme indicado para pequenos roedores de laboratório.

Avaliações macroscópicas

No pós-operatório, os animais tiveram sua ferida cirúrgica avaliada clinicamente de acordo com a existência de eventração e/ou evisceração e o acúmulo de líquido. Após as eutanásias, foram realizadas as avaliações macroscópicas, segundo os seguintes parâmetros: presença e coloração do implante, consistência, coleção de líquidos, presença de vascularização, infecção da ferida operatória, ulceração cutânea provocada pelo implante, formação de hérnia incisional, formação de fístulas com o implante, infecção intraperitoneal e formação de aderências.

Avaliações histológicas

As avaliações microscópicas foram realizadas com material coletado na região do implante, incluído em lâminas coradas com HE e com Picosírius e examinadas em microscópio óptico. A análise histológica com HE, com aumento de 100 vezes, considerou os tipos e a intensidade da reação inflamatória e avaliou a presença de macrófagos, fibrina, neutrófilos, tecido de granulação, fibrose, presença do implante e quantidade de fibras musculares. Para cada característica foi atribuída uma escala em cruz, na qual “0” correspondeu à ausência de células; “+1, +2 e +3” corresponderam à existência de uma a duas células por campo, três a cinco células por campo e mais de cinco células por campo, respectivamente.

A análise com coloração de Picrosírius avaliou a proporção e distribuição de colágeno através de um sistema de análise computadorizada de imagens, com *software*¹ específico. Foram obtidas seis imagens de diferentes segmentos da membrana, captadas em dispositivo físico no formato *tag image format* (TIFF). Através desse sistema de análise computadorizada de imagens, obteve-se a quantificação automática da área de fibrose presente por campo.

Análise estatística

As variáveis categóricas foram descritas pela mediana e pelos valores máximos e mínimos e comparadas pelo teste de Mann-Whitney. A análise de presença do implante foi realizada utilizando ANOVA de três vias.

RESULTADOS

Preparação das membranas biológicas

O pericárdio bovino foi escolhido como membrana biológica por sua fácil obtenção, seu baixo custo e sua alta resistência. Além da eficiência no processo de descélularização, a solução de glicerina foi adotada como conservante das membranas por seu baixo custo e por não demandar equipamentos especializados. Adicionalmente, a glicerina 98% foi eficaz na conservação das membranas, pois nenhuma delas apresentou alteração de coloração, odor ou textura. A resistência dos implantes foi mantida após a sua reconstituição em solução salina 0,9% e não houve crescimento bacteriano nas amostras submetidas à cultura microbiológica.

Isolamento e caracterização das células-tronco

O cultivo de longo termo de células-tronco mesenquimais foi estabelecido a partir de medula óssea de ratos adultos jovens. As células selecionadas apresentaram adesão ao plástico do frasco de cultivo e morfologia semelhante à descrita por outros autores [16]: afiladas, fibroblastóides, com núcleo bem delimitado, nucléolos bem evidentes, citoplasma amplo de limites imprecisos e borda irregular. Foi verificado que a partir da terceira passagem a população apresentou quatro dobros populacionais a cada 48 h, sem indício de senescência ou diminuição de proliferação celular. Dessa forma, as células-tronco mesenquimais utilizadas no experimento possuíam capacidade de proliferação no momento do implante.

Na imunofenotipagem, realizada na terceira passagem, foi evidenciado que a maioria das células foi positiva para a expressão dos antígenos de superfície CD44, CD90, e CD29. Uma pequena população de células apresentou positividade para CD45 e CD11b/c e não houve expressão de CD34. Os ensaios de diferenciação celular demonstraram que as células-tronco mesenquimais foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos. A coloração de *Oil Red* comprovou a presença de vacúolos de gordura nos adipócitos, e a coloração Vermelho de Alizarina demonstrou haver matriz extracelular rica em cálcio nos osteócitos.

Associação das células-tronco às membranas biológicas

Após 24 h de co-cultivo, foi possível observar a aderência das células-tronco mesenquimais às membranas biológicas pela análise histológica com coloração por Hematoxilina e Eosina e Picrosírius (Figura 4). Foi possível observar a presença de células aderidas às membranas biológicas, que anteriormente se encontravam completamente descélularizadas pelo armazenamento em glicerina 98%.

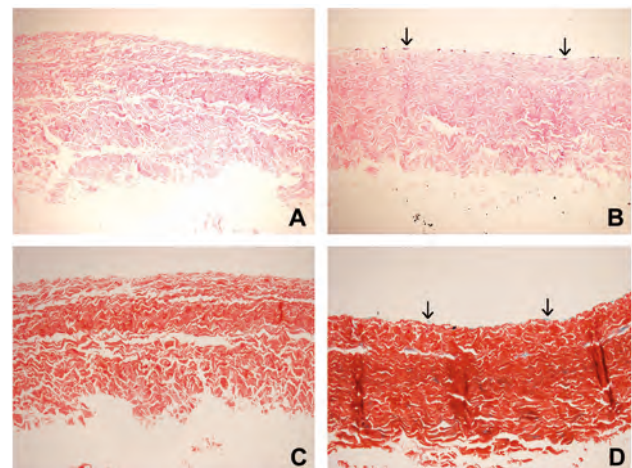


Figura 4. Cortes histológicos das membranas observados em aumento de 20 vezes. A: Membrana sem células coradas com HE. B: Membrana com células-tronco mesenquimais aderidas na face dorsal da membrana (núcleos corados em roxo - seta) com coloração HE. C: Membrana sem células coradas por Picrosírius. D: Membrana com células-tronco mesenquimais aderidas na face dorsal da membrana (coradas em verde) com coloração Picrosírius.

Procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos

Não houve intercorrência durante as cirurgias do grupo de reparo imediato. A retirada do retalho de musculatura não ocasionou lesões viscerais, e o procedimento de correção do defeito não apresentou qualquer complicação, tais como deiscência de pontos, rejeição do implante ou exposição da membrana.

Conforme o previsto, no segundo procedimento cirúrgico do grupo de reparo tardio, nenhum animal apresentou fechamento espontâneo do defeito previamente criado. Todos os animais apresentaram contração das bordas do anel herniário e consequente aumento da ferida. Metade dos animais do grupo de reparo tardio apresentou aderências de omento ao tecido subcutâneo na segunda cirurgia. Quatro animais apresentaram aderências de alças intestinais na musculatura, um deles foi eutanasiado durante o trans-operatório pela impossibilidade de reduzi-las.

Nenhum animal apresentou deiscência dos pontos, nem rejeição ou exposição da membrana. Não houve insinuação visceral entre o implante e a musculatura no pós-operatório. O implante permaneceu presente nos grupos de reparo imediato com e sem células-tronco mesenquimais com avaliação em 7 e 14 dias. Contudo, aos 60 dias, o implante havia sido integrado em 60% nos grupos com células-tronco mesenquimais e 80% nos grupos sem células-tronco mesenquimais. Diferentemente dos grupos de reparo tardio, os quais apresentaram integração da membrana biológica aos 7 e 14 dias.

Avaliações macroscópicas

Todos os animais do experimento permaneceram com as membranas implantadas. Elas apresentaram coloração entre o amarelo claro à esbranquiçada e consistência maleável. Não houve contaminação da ferida cirúrgica, ou reação do tipo corpo estranho ao pericárdio bovino. Em todos os grupos, houve presença de edema nos dias dois e três de pós-operatório e acúmulo progressivo de seroma entre os dias quatro e sete, com posterior regressão gradativa. Mas entre os dias 14 e 21, os animais apresentaram reabsorção total do exsudato inflamatório.

Em todos os animais houve a aderência do tecido subcutâneo ao implante e a neovascularização na região de interface do implante com a pele. A neovascularização ocorreu mais intensamente nos sete primeiros dias de avaliação, regrediu até os 14 dias de pós-operatório e regrediu mais intensamente até os 60 dias, igualmente em todos os grupos (Figura 5). Todos os animais apresentaram aderência de omento ao implante em diferentes proporções, mas aderências com outros órgãos não foram observadas. Clinicamente, houve maior presença de tecido de granulação nos animais que receberam células-tronco com sete dias de pós-operatório.

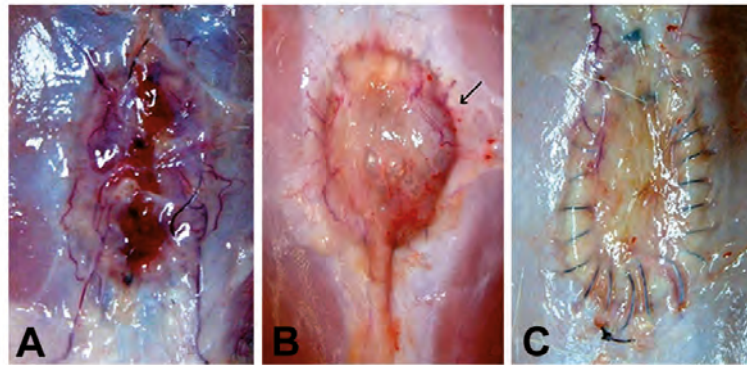


Figura 5. Visualização de neovascularização em defeitos herniários cirurgicamente criados e imediatamente reparados com membrana biológica com células-tronco mesenquimais. A: Avaliação aos sete dias de pós-operatório, com intensa vascularização em toda região do implante. B: Visualização aos 14 dias de pós-operatório, com vascularização menos evidente e acúmulo de exsudato inflamatório (seta). C: Observação aos 60 dias de pequena quantidade de vasos sanguíneos no entorno do enxerto.

Avaliações histológicas

As avaliações histopatológicas demonstraram que não houve reações de rejeição ou de necrose na região do implante, confirmando a avaliação macroscópica. Não foram encontradas reações inflamatórias exacerbadas. A contagem de neutrófilos, macrófagos, células gigantes e de tecido de granulação não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre

os grupos com e sem células-tronco mesenquimais ou entre os grupos de reparo tardio ou imediato. No entanto, é possível notar que nos grupos de reparo imediato e de reparo tardio, obteve-se maior grau de inflamação nos grupos com células-tronco mesenquimais com eutanásia aos 14 e aos 60 dias. Contrariamente, os grupos de reparo imediato e de reparo tardio com eutanásia aos sete dias demonstraram valores muito próximos (Figura 6).

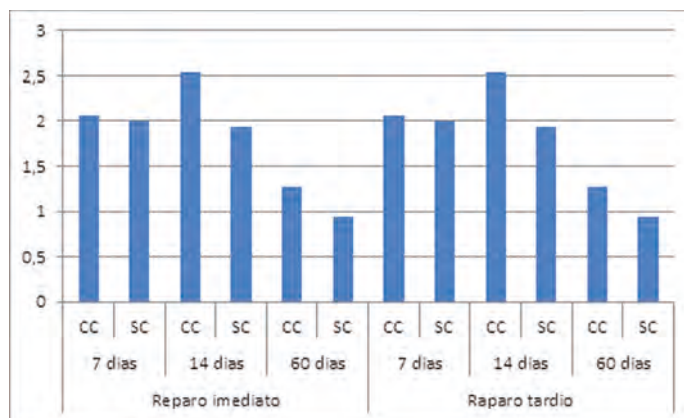


Figura 6. Médias das pontuações obtidas na análise histológica para quantidade de células inflamatórias: macrófagos e células gigantes, neutrófilos e tecido de granulação.

A presença de fibrina não foi visualizada na avaliação histológica. Quanto à deposição de tecido conjuntivo fibroso, obtiveram-se médias ligeiramente maiores nos grupos de reparo imediato sem células-tronco mesenquimais, mas sem diferenças estatisticamente significativas. Nos grupos de sete dias, a deposição de tecido conjuntivo fibroso obteve um valor limítrofe ($P = 0,056$) entre os tratamentos com e sem células-tronco mesenquimais.

DISCUSSÃO

A utilização de ratos Wistar no experimento foi satisfatória, pois os animais apresentaram docilidade ao manuseio, fácil manipulação, manutenção pouco trabalhosa e com baixo custo, apesar de poucos estudos utilizarem esse animal como modelo para hérnias abdominais [28]. Sua estrutura anatômica foi apropriada para a elaboração dos procedimentos cirúrgicos [17] e para a avaliação pós-cirúrgica, conforme outros trabalhos sobre cirurgias abdominais [4,5,7-9,11].

A utilização de animais de maior porte nessas pesquisas, como o coelho, é amplamente descrita, utilizando tanto a correção laparoscópica como a síntese por cirurgia aberta [1-3,10,15,26,33-35,39]. No entanto, esta espécie apresenta um maior custo de aquisição e de manutenção, além de maior gasto de material cirúrgico e anestésico, sem aumento significativo na qualidade das informações obtidas.

Os grupos de reparo tardio não apresentaram neovascularização intensa. Isso sugere que nesses grupos a resposta inflamatória do tecido já estaria concluída, quando da correção do defeito. Nesses casos, os fatores importantes para a ativação das células-tronco, como citocinas e outros estímulos, não estariam mais

presentes. As células-tronco mesenquimais, quando expostas a fator de estresse, aumentam a liberação de fatores de crescimento angiogênico (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) para melhorar o fluxo sanguíneo regional e promover a sobrevivência autócrina [13]. Tais fatores agem na fase inicial da inflamação, até o sétimo dia, durante a formação do tecido de granulação [14,23,38].

A diferença das análises histológicas dos grupos de reparo imediato e de reparo tardio sugere haver comportamentos diferentes na cicatrização das hérnias agudas e das crônicas, colaborando com a idéia de que a indução de hérnia com redução na mesma cirurgia possa não ser o melhor modelo para o estudo da hernioplastia [10,33,34]. Há experimentos que chegam a utilizar um intervalo de três [26] ou até quatro [33] semanas entre a cirurgia de indução experimental e a segunda cirurgia para a hernioplastia.

Outros autores sugerem ainda a criação de um modelo animal de hérnia suficientemente confiável para testar as diferentes técnicas e materiais [33]. Na medicina humana, estudos sobre a prevalência de hérnias são realizados em busca do melhor material e da melhor técnica. No entanto, não existe um consenso sobre esses procedimentos, porque a maioria dos estudos utiliza técnicas variadas de fechamento da cavidade abdominal e em processos patológicos não padronizados [25,35].

A permanência dos implantes ocorreu provavelmente pela utilização de membrana biológica, submetida à ação antimunogênica da glicerina [1,8,9,20,24,27,37,39], diferentemente do uso de materiais sintéticos, que apresentam uma resposta antigênica com um grande potencial de complicações como

a infecção, extrusão da tela, dor crônica, aderência intestinal, obstrução e formação de fístula e recorrência [6,17,22,26,40]. As avaliações histopatológicas demonstraram que não houve reação de rejeição ou necrose na região do implante, confirmando a biocompatibilidade das membranas [1,8,9,20,24,27,37,39].

Todos os animais apresentaram aderência de omento ao implante em diferentes proporções, pois o trauma causado pelas cirurgias abdominais geralmente favorece a migração do omento [35], sendo a estrutura anatômica que normalmente protrui primeiro [32]. Aderências a outros órgãos não foram observadas [8,12,31], diferentemente de Baroncelo *et al.* [3], que obtiveram aderências intestinais e fístulas de pele. Assim, a não formação de aderência às vísceras ratificou a biocompatibilidade das membranas, ao mesmo tempo que o material demonstrou ter resistência suficiente para suportar a pressão abdominal, excluindo a ocorrência de deiscência e evisceração [1,8,9,18,20,24,27,37,39].

O implante mostrou ser uma estrutura de sustentação adequada, pois não gerou reações inflamatórias exacerbadas, que poderiam interferir na adaptação das células-tronco mesenquimais [24,17]. Contudo, a semelhança de resultados obtidos entre os grupos com e sem células-tronco mesenquimais faz crer que a aderência destas células às membranas biológicas, observada anteriormente ao momento do implante, não é garantia de que o material seja totalmente biocompatível com estas células. Diferentes carreadores se comportam de maneiras distintas com o passar do tempo avaliado, sugerindo que a degradação do material possa se tornar um ambiente hostil para as células [14].

É possível também que o cultivo das células-tronco mesenquimais com as membranas biológicas durante 24 h tenha permitido a aderência de um número insuficiente de células ao implante. Zhao *et al.* [39] obtiveram diferença significativa entre o grupo tratamento e o grupo controle, utilizando células-tronco mesenquimais associadas à pele descelularizada. Contudo, este autor realizou o co-cultivo durante sete dias. Em trabalhos realizados posteriormente ao experimento, o co-cultivo foi realizado em cinco, sete e dez dias [1,15,39]. Em alguns casos, os autores realizaram séries de três sementeiras [39] ou quantificaram as células em diferentes momentos do cultivo para determinar o seu melhor tempo [1,15].

Outra diferença metodológica que pode ter influenciado o funcionamento efetivo das células-tronco

mesenquimais nas membranas biológicas é o método de descelularização empregado. Os autores que vêm testando células-tronco mesenquimais ou mioblastos associados às membranas biológicas [1,11,39] têm utilizado um método enzimático de descelularização, enquanto este experimento utilizou glicerina 98%. Apesar deste método de descelularização ter-se mostrado eficaz em experimentos de implantação de membranas biológicas [20,24,31], seria importante realizar novos testes sobre a compatibilidade deste método com as células-tronco mesenquimais ou outros tipos de células precursoras.

CONCLUSÕES

Os resultados positivos encontrados por outros autores, em contraste com os resultados deste experimento, no sentido de obter regeneração muscular junto ao implante, permitem crer que o tempo de co-cultivo das membranas biológicas com as células-tronco mesenquimais possa ter sido insuficiente. Apresenta-se assim a necessidade de novas pesquisas para encontrar o tempo de co-cultivo apropriado e o número mínimo de células-tronco mesenquimais aderidas às membranas biológicas anteriormente ao implante. Também há a necessidade de realizar novos testes de compatibilidade entre o método de descelularização com a glicerina 98% e o cultivo das células-tronco mesenquimais junto às membranas. As diferenças dos resultados obtidos pelos grupos de reparo imediato e de reparo tardio apontam para a necessidade de utilização de metodologia que busque a experimentação em modelos crônicos de hérnia, buscando a aproximação com o contexto da rotina de hernioplastia.

NOTA INFORMATIVA

¹Image-ProPlus 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA.

Acknowledgments. Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS; ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio financeiro ao projeto através do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE); à CAPES e ao CNPq pelas bolsas de Mestrado e de Iniciação Científica; ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo cultivo das células-tronco mesenquimais e pelo apoio na redação deste artigo.

Ethical Approval. The procedure was approved by the Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), number 09/174.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Ayele T., Zuk A.B.Z., Noorjahan B.M.A. & Noordin M.M. 2010. Tissue engineering approach to repair abdominal wall defects using cell-seeded bovine tunica vaginalis in a rabbit model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21(5): 1721-1730.
- 2 Aydos R.D., Silveira I.S., Magalhães A.M. & Goldenberg S. 1997. Um modelo de hérnia incisional em coelhos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 12(3): 189-192.
- 3 Baroncelo J.B., Czczeko N.G., Malafaia O., Ribas-Filho J.M., Nassif P.A.N. & Dietz A.U. 2008. O uso de telas parietex® e surgisis® na correção de defeitos produzidos na parede abdominal de coelhos. *Arquivos de Gastroenterologia*. 45(4): 323-329.
- 4 Bastos E.L.S., Fagundes D.J., Taha M.O., Novo N.F. & Silvado R.A.B. 2005. Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 32(5): 256-260.
- 5 Batista C.A.M., Netoll R.C. & Lopes Filho G.J. 2008. Comparative study of the healing process of the aponeurosis of the anterior abdominal wall of rats after wound closure using 3-0 nylon suture and N-butyl-2-cyanoacrylate tissue adhesive. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 23(4): 352-363.
- 6 Bellows C.F., Alder A. & Helton W.S. 2006. Abdominal wall reconstruction using biological tissue grafts: present status and future opportunities. *Expert Review of Medical Devices*. 3(5): 657-682.
- 7 Brofman P.R., Carvalho K.A., Guarita-Souza L.C., Rebelatto C., Hansen P., Senegaglia A.C., Myague N., Furuta N., Francisco J.C. & Olandoski M. 2004. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 19(3): 261-266.
- 8 Brun M.V., Pippi N.L., Dreimeier D., Contesini E.A., Beck C.A.C., Cunha O., Pinto Filho S.T.L., Roehsig C. & Stedile R. 2002. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. *Ciência Rural*. 32(6): 1019-1025.
- 9 Brun M.V., Pippi N.L., Dreimeier D., Contesini E.A., Beck C.A.C., Cunha O., Pinto Filho S.T.L., Roehsig C., Stedile R. & Silva T.F. 2002. Solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98% como conservantes de centros frênicos caninos utilizados na reparação de defeitos musculares em ratos Wistar. *Ciência Rural*. 34(1): 147-153.
- 10 Carvalho Z.M., Fagundes D.J., Rodrigues O.R. & Shimidht Jr. A. 2001. Incisional hernia: a experimental model in rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 16(2): 82-85.
- 11 Conconi M.T., De Coppi P., Bellini S., Zara G., Sabatti M., Marzano M., Zanon G.F., Gamba P.G., Parnigotto P.P. & Nussdorfer G.G. 2005. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. *Biomaterials*. 26(15): 2567-2574.
- 12 Contesini E.A. & Schosler J.E.W. 2003. Hernioplastia abdominal com implante de centro frênico heterólogo em felino - Relato de caso. *Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 6(2): 145-148.
- 13 Crisostomo P.R., Markel T.A., Wang Y. & Meldrum D.R. 2008. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery*. 143(5): 577-581.
- 14 Dietrich I. 2004. Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano. 90f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Cardiologia) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- 15 Dolce C.J., Stefanidis D., Keller J.E., Walters K.C., Newcomb W.L., Heath J.J., Norton H.J., Lincourt A.E., Kercher K.W. & Heniford B.T. 2010. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. *Surgical Endoscopy*. 24(11): 2687-2693.
- 16 Gianlupi A. & Trindade M.R.M. 2004. Comparação entre o uso de fio inabsorvível (polipropileno) e fio absorvível (poliglactina 910) na fixação de prótese de polipropileno em correção de defeitos músculo-aponeurótico da parede abdominal: estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 19(2): 94-102.
- 17 Greca F.H., Souza Filho Z.A., Rocha S.L., Borsato K.S., Fernandes H.A.D. & Niiside M.A. 2004. Submucosa de intestino delgado no reparo de defeito em parede abdominal de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 19(5): 471-477.
- 18 Guarita-Souza L.C., Carvalho K.A.T., Rabellato C., Senegaglia A., Hansen P., Furuta M., Miyague N., Francisco J.C., Olandoski M., Woitowicz V., Simeoni R., Faria-Neto J.R. & Brofman P. 2005. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*. 20(3): 270-278.

- 19 Guimarães G.C., Scavone A.R.F., Machado M.R.F., Cruz C., Capalbo A.C. & Santos A.L.Q. 2007. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. *Biosciences Journal*. 23(3): 120-127.
- 20 Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F.C., Deans R.J., Krause D.S. & Keating A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 7(5): 393-395.
- 21 Kim H., Bruen K. & Vargo D. 2006. Acellular dermal matrix in the management of high-risk abdominal wall defects. *The American Journal of Surgery*. 192(6): 705-709.
- 22 Mann C.J., Perdiguero E., Kharraz Y., Aguilar S., Pessina P., Serrano A.L. & Muñoz-Cánoves P. 2011. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle Journal*. 1: 21.
- 23 Mazzanti A., Pippi N.L., Raiser A.G., Graça D.L., Faria R.X., Oliveira L.O. & Guimarães L.D. 2001. Reparação do diafragma de cães com segmento muscular homólogo ortotópico conservado em solução supersaturada de açúcar. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 53(1): 21-26.
- 24 Millikan K.M. 2003. Incisional hernia repair. *Surgical Clinics of North America*. 83(5): 1223-1234.
- 25 Ngo M.D., Aberman H.M., Hawes M.L., Choi B. & Gertzman A. 2011. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in an *in vivo* model for incisional hernia repair. *Cell Tissue Bank*. 12(2): 135-145.
- 26 Oliveira L.L., Souza D.B., Abílio E.J. & Carvalho E.C. 2009. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. 2(3): 175-188.
- 27 Paulo D.N.S., Pereira F.E.L., Mata R.F., Dauad F.R.D. & Paulo I.C.A.L. 1997. Experimental models of longitudinal abdominal incisional hernia in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 12(4): 235-239.
- 28 Paz A.H., Salton G.D., Ayala-Lugo A., Gomes C., Terraciano P., Scalco R., Laurino C.C., Passos E.P., Schneider M.R., Meurer L. & Cirne-Lima E. 2011. Betacellulin over expression in Mesenchymal stem cells induces insulin secretion *in vitro* and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Stem Cells and Development*. 20(2): 223-232
- 29 Phinney D.G., Kopen G., Isaacson R.L. & Prockop D.J. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 72(4): 570-585.
- 30 Quitzan J.G., Rahal S.C., Rocha N.S. & Crocci A.J. 2003. Comparação entre pericárdio bovino preservado em glicerina e malha de poliéster no reparo de falhas da parede abdominal em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(4): 297-301.
- 31 Raiser A.G. 1999. Hérnia pós-incisional em cães e gatos. *Ciência Rural*. 29(4): 689-695
- 32 Roth J.S., Dexter D.D., Lumpkins K. & Bochicchio G.V. 2009. Hydrated vs. freeze-dried human acellular dermal matrix for hernia repair: a comparison in a rabbit model. *Hernia*. 13(2): 201-207.
- 33 Silva W., Fagundes D.J., Seidel A.C. & Taha M.O. 2009. Animal model for chronic abdominal hernia in rabbit. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 24(4): 256-261.
- 34 Silva L.A.F., Franco L.G., Menezes L.B., Moura V.M.B.D., Bernardes K.M. & Souza M.A. 2009. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(3): 606-612.
- 35 Silveira R.A.B., Nahas F.X., Hochman B., Bazzano F.C.O., Amorim C.R. & Ferreira L.M. 2011. Cadaver as an experimental model for the study of midline incisional hernia. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 26(4): 310-313.
- 36 Singh J., Kumar N., Sharma A.K., Maiti S.K., Goswami T.K. & Sharma A.K. 2008. A cellular biomaterials of porcine origin for the reconstruction of abdominal wall defects in rabbits. *Artificial Organs*. 22(1): 34-44.
- 37 Vidinsky B., Gal P., Toporcer T., Longuer F., Lenhardt L., Borbrov N. & Sabo J. 2006. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. *Acta Veterinaria BRNO*. 75: 197-202
- 38 Zhao Y., Zhang Z., Wang J., Yin P., Zhou J., Zhen M., Cui W., Xu G., Yang D. & Liu Z. 2011. Abdominal hernia repair with a decellularized dermal scaffold seed with autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Artificial Organs*. 10: 1525-1594.
- 39 Zimmermann M., Raiser A.G., Braga F.V.A., Trindade A.L.B. & Lopes S.T.A. 2008. Membranas de látex natural na herniorrafia diafragmática experimental em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60(6): 1476-1483.