

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DESCELULARIZADAS ASSOCIADAS À
TERAPIA CELULAR NO REPARO DE HÉRNIAS INCISIONAIS DE PEQUENOS
ANIMAIS**

Silvana Bellini Vidor

Acadêmica da Faculdade de Veterinária

PORTO ALEGRE

2012/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS DESCELULARIZADAS ASSOCIADAS À
TERAPIA CELULAR NO REPARO DE HÉRNIAS INCISIONAIS DE PEQUENOS
ANIMAIS**

Autor: Silvana Bellini Vidor

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para
obtenção de Graduação em Medicina
Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientadora: M.V. Msc. Tuane Nerissa Alves
Garcez

PORTO ALEGRE

2012/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Mestre Segyu Choepel Rinpoche pela inspiração na busca pelo caminho correto. Ofereço estes méritos a todos os Budas e Bodisatvas, seres sagrados e seres sencientes e ao objetivo último da Iluminação, para o benefício de todos os seres sencientes.

À Júlia, minha filha amada, só pelo simples fato de existir. Eu te amo, docinho.

Agradeço às duas pessoas que acreditaram, muitas vezes, mais do que eu mesma, que eu poderia chegar ao fim desta caminhada, meu marido Daniel e minha mãe Maria Elsi. Amo muito vocês.

A meu pai João, minha irmã Angela, meu cunhado Leonardo e meu afilhado Francisco por perdoarem as ausências impostas pelas tarefas da Faculdade. Amo muito vocês.

À professora Enefer Rosana Oberst pelo carinho e orientação desde o início até o final do curso.

Ao meu querido professor orientador, Prof. Dr. Emerson A. Contesini, pelos ensinamentos e orientações, pelo carinho durante estes últimos anos.

À minha querida co-orientadora, M. V. Msc. Tuane Nerissa Alves Garcez sempre disposta a ajudar e a compartilhar seus conhecimentos.

Às mestrandas que acompanhei, Tuane, Viviam, Lanucha, Janete e Priscila, pelos ensinamentos de perseverança, paciência, dedicação e bom humor.

Às colegas e amigas que me receberam sempre tão amorosamente nas turmas em que fui me juntando.

Aos professores, funcionários e residentes do HCV-UFRGS pelo exemplo de dedicação e amor aos animais e à vida

E, por fim, agradeço a todos os animais que me ensinaram o respeito à vida, qualquer que seja ela. Em especial, ao Bono Boxer, cão mais amoroso do mundo que me concedeu 12 anos de amizade e palhaçadas e agora se prepara para morrer. Desejo que você renasça como uma pessoa e tenha contato com o Dharma.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo Da Vinci

RESUMO

As hérnias incisionais são problemas comuns na Medicina Veterinária e na Medicina humana. O tratamento dessas afecções é cirúrgico e encontra dificuldades como altas taxas de recorrência, infecções, aderências de vísceras e dor. Existem diversas técnicas e materiais para o reparo das hérnias incisionais, porém todos eles continuam apresentando alta incidência de recidiva. As telas sintéticas são utilizadas há muitos anos e, apesar de possibilitarem a diminuição das complicações pós-operatórias, continuam sendo significativas. Desde a década de 1960, várias membranas biológicas vêm sendo testadas, demonstrando superioridade sobre as telas sintéticas, pois diminuem a ocorrência de aderência e de reação de corpo estranho, a excessiva reação inflamatória e consequente fibrose e dor. Essas membranas de origem animal são processadas a fim de retirar sua porção imunogênica e proporcionar um material biocompatível aos tecidos dos receptores. São um grande avanço no sentido da biocompatibilidade e da resistência mecânica, mas os resultados ainda não são positivos quanto à proliferação celular para a eficiente regeneração muscular. Para solucionar este problema, a engenharia de tecidos acrescentou às membranas biológicas a utilização de células-tronco ou de mioblastos, responsáveis pela proliferação e diferenciação celular em tecido muscular sobre o suporte oferecido pelas membranas naturais. Apesar de ser necessário gerar ainda um grande volume de pesquisas e de dados nesta área, os resultados obtidos até o momento apontam para o desenvolvimento de tratamentos eficazes para pacientes com grandes perdas musculares. O objetivo deste trabalho é revisar as bibliografias recentes e relevantes sobre a utilização de membranas descelularizadas no reparo de hérnias abdominais incisionais e a possibilidade de associá-las às células-tronco e aos mioblastos para obter não apenas a cicatrização adequada, mas também a regeneração muscular.

Palavras Chave: engenharia de tecidos, membranas biológicas, músculo, cicatrização, veterinária

ABSTRACT

Incisional hernias are common issues in veterinary medicine and in the human medicine. The treatment of these disorders is surgical and has difficulties such as high rates of recurrence, infection, visceral adhesions and pain. There are various techniques and materials for the incisional hernias repair, however they all continue presenting high incidence of recurrence. The synthetic meshes are used for years and although they permit the reduction of postoperative complications, continue to be significant. Since de Decade of 1960, various membranes are being tested, demonstrating superiority over synthetic meshes, because it decreases the occurrence of grip and foreign body reaction, excessive inflammatory reaction and resultant fibrosis and pain. These animal membranes are processed in order to remove its immunogenic portion and provide a biocompatible material for meshes receivers. They are a major advance in the direction of biocompatibility and mechanical resistance, but the results are still not efficient for the muscle regeneration. To solve this problem, tissue engineering added stem cells or myoblasts to biological membranes, in order to cell proliferation and differentiation into muscle tissue on the support offered by the natural membranes. Despite being necessary still generate a large volume of data and research in this area, the results obtained so far point to the development of effective treatments for patients with large muscle loss. The aim of this paper is to review the recent and relevant bibliographies about the use of acellular membranes to the incisional hernias repair and the ability to associate them to the stem cells and myoblasts to get not only the wound healing, but also muscle regeneration.

Keywords: tissue engineering, biological membrane, muscle, wound repair, veterinary.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Desenho ilustrativo da estrutura da fibra muscular. Fonte: MILLIS, 2004. (adaptado por VIDOR, S. B. 2012).....12
- FIGURA 2 - Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular. FONTE: PARK & BARBUL, 2004 (adaptado por GARCEZ, TNA. 2012).....15
- FIGURA 3 - Desenho esquemático de hérnia abdominal e seus componentes e de reparo feito com tela. Fonte KIM, BRUEN, VARGO, 2006. (Adaptado por VIDOR, S. B., 2012).....24
- FIGURA 4 - Pericárdio bovino, previamente conservado em glicerina a 98 %, sendo reidratado antes de sua utilização em cirurgia reconstrutiva. Fonte: OLIVEIRA et al, 2009.....34
- FIGURA 5 - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco. Fonte: ZAGO & COVAS, 2006.....41
- FIGURA 6 - Origens alternativas de mioblastos no tecido muscular. Fonte: GROUNDS, 2002. (Adaptado por VIDOR, S. B., 2012).....48
- FIGURA 7 - Implante de membrana de pele descelularizada com células-tronco. (a) defeito realizado cirurgicamente (2 cm X 3 cm); (b) implante de pele descelularizada posicionado; (c) implante suturado com padrao simpls contínuo. Fonte: ZHAO et al, 2011.51

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REGENERAÇÃO MUSCULAR	12
3.	HÉRNIAS ABDOMINAIS	17
3.1	Hérmias Incisionais	18
3.1.1	Patogenia	19
3.1.2	Sinais clínicos e diagnóstico.....	20
4.	O TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS HÉRNIAS	22
4.1	O tratamento das hérnias incisionais	23
4.1.1	Emergência nas hérnias evisceradas e encarceradas	26
4.1.2	Tratamento das hérnias incisionais crônicas	27
4.2	Tratamento das hérnias incisionais com telas.....	28
5.	MEMBRANAS DESCELULARIZADAS.....	31
5.1	Tipos de membranas mais utilizados.....	32
5.1.1	Peritônio bovino	33
5.1.2	Pericárdio bovino.....	34
5.1.3	Diafragma	34
5.1.4	Matriz dérmica acelular humana	34
5.1.5	Matrigel	35
5.2	Soluções de conservação	35
5.2.1	Glicerina	36
5.2.2	Glutaraldeído	38
5.2.3	Solução supersaturada de açúcar	38
5.2.4	Solução supersaturada de sal	39
5.2.5	Solução de polivinilpirrolidona	39
5.2.6	Preservação por congelamento	39
5.2.7	Processo enzimático	39
6.	CÉLULAS-TRONCO	41
7.	MIOBLASTOS.....	46
8.	MEMBRANAS BIOLÓGICAS DESCELULARIZADAS ASSOCIADAS À TERAPIA CELULAR.....	48
8.1	Membranas biológicas associadas a mioblastos	49
8.1.1	Túnica vaginal bovina com mioblastos	49

8.1.2 Matriz muscular descelularizada com mioblastos	50
8.2 Membranas biológicas associadas a células-tronco mesenquimais.....	51
8.2.1 Pele descelularizada com células-tronco mesenquimais	51
9. CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Hérnias abdominais podem ocorrer por trauma (mordedura, incisão cirúrgica ou trauma contuso) e ocasionalmente por defeito congênito. A hérnia incisional é uma complicação importante da cirurgia abdominal e consiste na ruptura do fechamento cirúrgico dessa cavidade. O reparo de hérnias abdominais ocupa lugar importante na rotina cirúrgica, tanto veterinária, quanto humana. Seu propósito é retornar o conteúdo viável para sua cavidade, ocluir as bordas musculares com segurança, obliterar o tecido redundante no saco herniário e utilizar os tecidos do próprio paciente quando possível.

Desde a década de 60 até a atualidade, muitos estudos empregando membranas biológicas descelularizadas, obtidas de diferentes fontes, têm sido publicados em busca de materiais adequados para a hernioplastia. Entre muitos estudos, pode-se citar o peritônio bovino, conservado em glicerina 98%, na correção de hérnia ventral em ratos (BASTOS, 2005); o centro frênico canino, conservado em solução hipersaturada de sal ou de glicerina a 98%, utilizado na reparação de defeitos musculares de ratos Wistar (BRUN, 2004); o centro frênico equino, conservado em glicerina 98%, como implante para hernioplastia abdominal em felino (CONTESINI; SCHOSSLER, 2003); o implante de cartilagem auricular homóloga conservada em glutaraldeído a 4%, para hernioplastia umbilical em bovino (SILVA, 2005); a submucosa de intestino delgado de suíno no reparo de defeito em parede abdominal de ratos (GRECA, 2004); a túnica vaginal bovina congelada para redução de hérnia abdominal induzida em coelhos (AYELE, 2010); o peritônio, liofilizado e esterelizado, na correção de hérnia abdominal de coelhos (ZHAO, 2011).

O uso de membranas naturais descelularizadas pode diminuir a quantidade de complicações cirúrgicas relacionadas ao uso de membranas sintéticas, tais como infecção, fístulação, deiscência e aderência abdominal. As membranas naturais apresentam boa resistência à pressão abdominal, mesmo após seu tratamento de descelularização, seja enzimático ou químico. Enquanto membranas descelularizadas parecem demonstrar boa biocompatibilidade e propriedades biomecânicas, membranas sintéticas podem causar excesso de fibrose, consequência da produção excessiva de colágeno.

O transplante de células-tronco adultas tem sido uma alternativa real para a medicina humana desde a década de 1950, quando iniciaram os transplantes de medula óssea. A medicina regenerativa consiste na utilização de células, fatores de proliferação e biomateriais, que permitem ao próprio organismo reparar tecidos e órgãos lesados. O uso de células-tronco,

mioblastos e outros tipos celulares para a regeneração ou reparo de tecidos é uma das áreas promissoras na pesquisa biomédica e a proposta da medicina regenerativa baseada em células do próprio paciente é de crescente interesse. Recentemente, a bioengenharia vem associando o uso de membranas naturais à terapia com células-tronco ou mioblastos, a fim de proporcionar um ambiente celular favorável à regeneração do tecido muscular e à redução das complicações pós-operatórias, diminuindo o risco de infecções da ferida cirúrgica e a formação de aderências.

Este trabalho objetiva revisar pesquisas recentes e relevantes sobre a utilização de membranas descelularizadas no reparo de hérnias abdominais incisionais e a possibilidade de associá-las às células-tronco e aos mioblastos para obter não apenas a cicatrização adequada, mas também a regeneração muscular.

2. REGENERAÇÃO MUSCULAR

O músculo esquelético é formado por agregações celulares chamadas miofibrilas, que contém múltiplos núcleos, um citoplasma chamado sarcoplasma e sua membrana, que recebe o nome de sarcolema. As miofibras, por sua vez, são compostas de várias miofibrilas unidas por tecido conectivo, formando feixes. O epimísio, formado por tecido conectivo denso, envolve o músculo todo, enquanto o perimísio envolve grupos de miofibras e o endomísio envolve cada miofibrila. Capilares, nervos e vasos linfáticos atravessam as fibras musculares através das bainhas desse tecido conectivo, eventualmente atingindo o endomísio, onde uma rica rede de capilares sensível ao tônus vasomotor simpático circunda as miofibras (HOSGOOD, 2002; FOSSUM, 2005; MILLIS et al, 2004; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

As miofibrilas são compostas de filamentos grossos (miosina) e finos (actina), troponina e tropomiosina, que exercem a função de contração do músculo. São cercadas pelo retículo sarcoplasmático, que armazena e libera cálcio para a contração muscular (FIGURA 1). Variações na composição das miofibrilas e do retículo sarcoplasmático geram tipos diferentes de fibras (rápidas ou lentas) para diferentes funções e resistência (HOSGOOD, 2002; MILLIS et al, 2004).

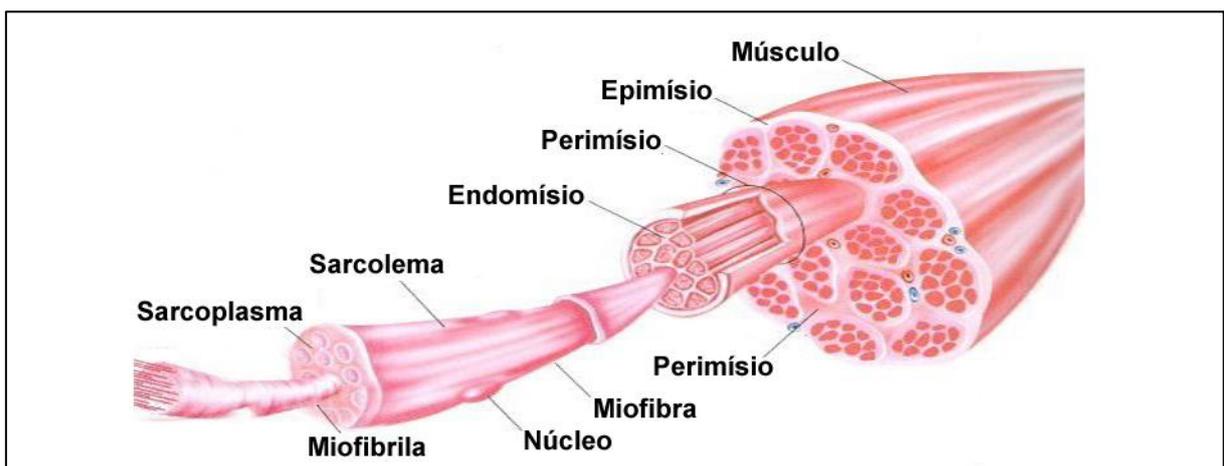


Figura 1 - Desenho ilustrativo da estrutura da fibra muscular. Fonte: MILLIS, 2004. (adaptado por VIDOR, S. B. 2012).

Regeneração é a reposição do tecido lesado por células do mesmo tipo, mantendo a estrutura e a função características do tecido ou órgão original, podendo, por vezes, não deixar traços da injúria ocorrida. Reparo é a substituição por tecido conectivo, também chamada fibrose, que constitui uma cicatriz permanente (VIDINSKY et al, 2006).

Lesões musculares ocorrem por lacerações, contusões, rupturas, isquemias e avulsões. Podem ser agudas ou crônicas e sua gravidade pode variar de uma lesão leve a sua completa ruptura (MILLIS et al, 2004). É possível haver regeneração do tecido muscular (HOSGOOD, 2002; BONDAN; LALLO, 2006), contudo a regeneração das fibras musculares esqueléticas é limitada (RAISER, 1995; HOSGOOD, 2002). No indivíduo adulto, a capacidade de regeneração muscular depende do tipo de tecido muscular envolvido e do grau de desarranjo do sarcolema e do endomísio (BANKS, 1992; HOSGOOD, 2002).

O processo de cicatrização do músculo estriado possui o mesmo padrão da cicatrização de feridas (FIGURA 2), em três fases - a fase inflamatória, a proliferativa e a de remodelamento (MILLIS et al, 2004; VIDINSKY et al, 2006).

A fase inflamatória inicia com a hemostasia (MILLIS et al, 2004) e continua com a remoção de debris pelos macrófagos e neutrófilos, durante um período que varia de 24 horas a 72 horas (MILLIS et al, 2004; MANN et al, 2011). A duração e a intensidade desta fase podem influenciar na regeneração muscular ou em sua fibrose (MANN et al, 2011). Nessa fase, há uma relação entre a penetração de macrófagos e a regeneração das miofibras (MILLIS et al, 2004; MANN et al, 2011). As principais células inflamatórias desta fase são os monócitos (que se diferenciam em macrófagos) e os macrófagos, responsáveis pela remoção do debris celular, pela apresentação de antígeno ao sistema imune e pela secreção de citocinas inflamatórias.

Recentemente, descobriu-se que há uma população heterogênea, com dois tipos de macrófagos. Os macrófagos pró-inflamatórios, ou M1, produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, e os macrófagos M2, considerados anti-inflamatórios, desativando o fenótipo dos M1 e secretando citocinas anti-inflamatórias, determinando então maior regeneração do que fibrose do tecido muscular. Enquanto os M1 são encontrados nas fases iniciais da resposta inflamatória, os M2 são abundantes nas fases de proliferação do tecido (MANN et al, 2011). *In vitro*, os M1 têm uma influência positiva sobre a proliferação de mioblastos e negativa sobre a diferenciação destas células. Pelo contrário, os M2 estimulam a diferenciação e a fusão dos mioblastos. A depleção *in vivo* dos monócitos, células precursoras de M1 e M2, afeta negativamente o processo de reparo muscular (MANN et al, 2011).

A fase de proliferação que segue é um processo competitivo entre a regeneração das fibras funcionais e a produção de tecido cicatricial, que depende da severidade da lesão e do tamanho da falha muscular (MILLIS et al, 2004). Quando o músculo esquelético é

seccionado, o sarcoplasma retrai-se por uma curta distância para o interior do sarcolema (BANKS, 1992). A capacidade intrínseca de regeneração das miofibrilas só ocorre se as células sarcolêmicas sobrevivem, se o tecido conjuntivo endomisial não for destruído e se as extremidades seccionadas forem mantidas intimamente unidas, para que sejam diminuídos os efeitos obstrutivos do tecido conjuntivo interveniente (RAISER, 1995; PROBST, 1998; HOSGOOD, 2002).

Dessa forma, se houver uma perda significativa de massa muscular, ou a porção final da fibra seccionada não for corretamente posicionada, a união das fibras ocorrerá pelo tecido fibroso (HOSGOOD, 2002), o que pode limitar, reduzir ou obliterar a função do músculo, não permitindo o retorno à totalidade da função (BANKS, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; JOHNSON; HULSE, 2005). O reparo pela produção de tecido cicatricial não é desejável, porque haverá alta chance de deiscência, e a contração muscular será diminuída em aproximadamente 50% (MILLIS et al, 2004).

A fase de proliferação continua com a produção de matriz extracelular pelos fibroblastos, incluindo fibronectina, proteoglicanos e colágeno. O colágeno tipo III é encontrado no sítio da lesão em cerca de três dias e geralmente precede a produção de uma fibra mais espessa e organizada de colágeno tipo I. Essa matriz extracelular produz um arcabouço para a regeneração das miofibras de um lado a outro da ferida (MILLIS et al, 2004). As células-satélites, responsáveis pela regeneração muscular como precursoras de mioblastos, permanecem em estado quiescente, adjacentes às miofibras, sob a lâmina basal (RAISER, 1995; HOSGOOD, 2002; MILLIS et al, 2004; JACKSON; NESTI; TUAN, 2010; MANN et al, 2011), e, por ocasião de uma lesão, migram para a porção viável de miofibras e alinham-se ao redor da falha, criando um caminho para os miotúbulos atravessarem o local da lesão e repararem a miofibra (MILLIS et al, 2004).

As células-satélites são células multipotentes e dividem-se assimetricamente em resposta à injúria muscular; embora a maioria destas esteja comprometida com a linhagem miogênica, 0,5% dessa população também pode expressar marcadores endoteliais e estão associadas à neovascularização e a diferenciação osteogênica e adipogênica (JACKSON; NESTI; TUAN, 2010). Outras células multipotentes são os periócitos, células intimamente associadas a capilares e microvasos, que contribuem para a manutenção do sistema vascular. Periócitos estão presentes em quase todos os tipos de tecidos do corpo e são capazes de

regenerar o tecido muscular *in vivo* e podem diferenciar-se em miócitos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (JACKSON; NESTI; TUAN, 2010).

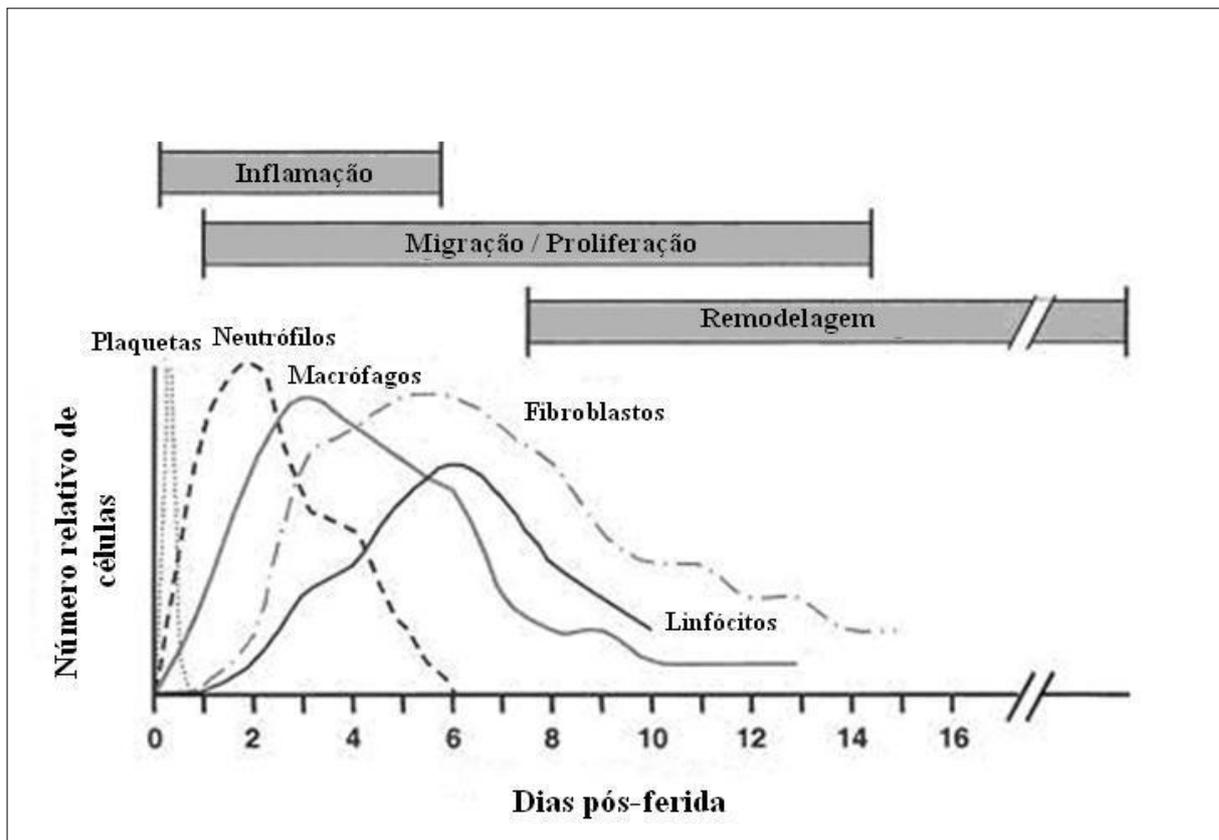


Figura 2 - Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular. FONTE: PARK; BARBUL, 2004 (adaptado por GARCEZ, TNA, 2012).

A cicatrização pela formação de tecido fibroso ocorre quando temos uma origem inadequada de mioblastos, vascularização ou inervação inadequadas ou estresse ao longo da lesão, criando uma grande falha. Nesta situação, a deposição excessiva de colágeno e atividade de fibroblastos levarão à formação de tecido fibroso no local. O resultado será uma barreira que impedirá as miofibras de cruzarem a lesão e uma consequente função anormal do músculo (MILLIS et al, 2004). Nas lesões severas do tecido muscular, a atividade regenerativa das células-satélites compete com a atividade dos fibroblastos (VIDINSKY et al, 2006; JACKSON; NESTI; TUAN, 2010).

Quando o tecido é lesado, os fibroblastos migram para o local e começam a produzir e remodelar a matriz extra-celular em resposta a citocinas pró-fibróticas como TGF β . Os fibroblastos estromais produzem citocinas, fatores de crescimento e proteases que desencadeiam e mantêm as condições inflamatórias/pró-fibróticas crônicas e agudas. Dessa forma, o fibroblasto é fundamental para a homeostase do tecido e reparo da ferida. O

fibroblasto ativado espessa proteínas de contratibilidade, formando os miofibroblastos, que possivelmente produzem componentes da matriz extra-celular (MANN et al, 2011).

Um dos fatores que determina qual tipo de célula será preponderante no processo de cicatrização é a taxa de TGF- β 1 e TGF- β 3. O TGF- β 1 estimula os fibroblastos a secretarem desorganizadamente as proteínas da matriz extracelular, levando à maior deposição de tecido fibroso que, por sua vez, vai impedir as células-satélites de regenerar o tecido. O TGF- β 3, produzido em grande quantidade pelo músculo lesado, parece manter um balanço de citocinas, a fim de promover a regeneração muscular (JACKSON; NESTI; TUAN, 2010).

Um dos grandes obstáculos para o desenvolvimento do novo tecido é a falta de um suporte adequado para a expansão das células-satélites. Para a resolução desse problema, existem muitas pesquisas para o desenvolvimento de sistemas de suporte sintéticos ou biológicos adequados para as células implantadas (AYELE et al, 2010).

3. HÉRNIAS ABDOMINAIS

Hérnia é a protrusão - ou projeção - de um órgão ou de parte dele através de um defeito da cavidade anatômica onde está situado, ocorrendo através da parede abdominal, do diafragma ou do peritônio (FOSSUM, 2005; RAISER, 1999; READ; BELLENGER, 2002). Os três componentes de uma hérnia são: o anel, o saco e o conteúdo. O saco é formado pelos tecidos que revestem o conteúdo herniário. Por sua vez, o conteúdo da hérnia é formado pelos tecidos ou órgãos que ocupam essa posição anormal. O anel é o próprio defeito na parede da cavidade, podendo possuir um espessamento na borda causado pelo processo cicatricial de maturação do colágeno. Frequentemente, as hérnias causadas por traumatismo apresentam este mecanismo de retração cicatricial, podendo apresentar inclusive estrangulamento do seu conteúdo (READ; BELLENGER, 2002).

Os tipos de hérnias podem ser classificados de acordo com a localização (abdominal, diafragmática e perineal) ou de acordo com o tipo de tecido herniado (intestino, bexiga, útero ou omento) (READ; BELLENGER, 2002; FOSSUM, 2005). De acordo com a origem, as hérnias congênitas já estão presentes desde o nascimento, mesmo apresentando sinais em uma fase tardia da vida, enquanto as hérnias adquiridas podem ocorrer por traumatismo contuso (nos acidentes automobilísticos), por traumatismo cirúrgico (na ruptura da ferida cirúrgica), ou por degeneração (na hérnia perineal) (READ; BELLENGER, 2002).

Quanto à redutibilidade do conteúdo herniado, as hérnias redutíveis permitem que o conteúdo seja recolocado na cavidade ao ser manipulado. As hérnias irreduzíveis possuem seu conteúdo fixado na posição anormal pela formação de aderências entre o conteúdo e o tecido circunjacente. A hérnia é considerada estrangulada quando o encarceramento causa a obstrução da irrigação vascular do órgão e eventualmente pode resultar em necrose tecidual. O encarceramento da víscera oca, como o intestino ou a bexiga, pode causar também a obstrução do seu lúmen e as diversas complicações advindas desta alteração (READ; BELLENGER, 2002).

As hérnias incisionais, assim como todas as outras hérnias traumáticas, são denominadas falsas hérnias, pois lhes falta o saco herniário. Assim como afetam pequenos e grandes animais, as hérnias incisionais afetam também pacientes humanos. A sua ocorrência em humanos varia conforme o caso. Nas situações de cicatrização primária, essas taxas ficam entre 1% e 2%. Já nos casos de infecção da ferida cirúrgica, observa-se um aumento que pode

chegar a 10%. Finalmente, temos uma incidência de 43% de herniação nos casos de reparo de hérnia incisional (READ; BELLENGER, 2002).

No Murdoch University Veterinary Hospital, as hernias que mais afetam os cães são as hérnias perineais, umbilicais e diafragmáticas (READ; BELLENGER, 2002). Dos casos de hérnia atendidos na Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo entre os anos de 1988 e 2007, as hérnias perineais representaram 42% dos casos (968 casos); as hérnias inguinais, 23% (512 casos); as hérnias diafragmáticas, 18% (419 casos); as eventrações, 11% (253 casos); as hérnias umbilicais, 5% (106 casos); as hérnias inguino-escrotais, as peritoneo-pericárdicas, as hiatais e os casos de herniorrafias não identificadas representaram valores inferiores a 1% (11, 5, 5, 5 casos respectivamente). A maioria das ocorrências foi associada à espécie canina com 82% dos casos (1.876), enquanto apenas 18% foi associada à espécie felina (408 casos) (PINTO, 2007).

O principal sinal clínico da hérnia é a tumefação (RAISER, 1999; READ; BELLENGER, 2002; FOSSUM, 2005). A palpação geralmente não causa dor nas hérnias não complicadas, e a sua consistência depende do tipo do conteúdo herniado. É necessário cuidado no diagnóstico, pois, às vezes, o aumento de volume pode não corresponder ao tamanho da hérnia (READ; BELLENGER, 2002; FOSSUM, 2005).

Para o diagnóstico, a observação e a palpação são importantes, porém cada tipo de hérnia pode apresentar aspectos específicos (READ; BELLENGER, 2002). A presença de estruturas abdominais no espaço subcutâneo ou entre músculos, geralmente causam assimetria do contorno abdominal. Por isso, deve-se atentar para os diagnósticos diferenciais da enfermidade: abscessos, celulites, hematomas, seromas e neoplasias (FOSSUM, 2005).

3.1 Hérnias Incisionais

Hérnias incisionais são adquiridas quando há ruptura de uma cavidade fechada por meio de cirurgia. Sua prevalência é de 6,5% em cães e gatos e 16% em grandes animais (SMEAK, 2002; RAISER, 1999; SMEAK, 2002). Em humanos, a ocorrência de hérnias incisionais após a laparotomia continua sendo um desafio, pois possui uma taxa de prevalência de 2% a 20% (GEORGE; ELLIS, 1986; RAISER, 1999; SMEAK, 2002; MILLIKAN, 2003; KIM, 2006). Esse problema comumente encontrado pelos médicos cirurgiões, apresenta uma taxa de recorrência de 10% a 60% no reparo primário (SUKKAR et

al, 2001; MILLIKAN, 2003; ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006; MAZZOCHI et al, 2010; ZAFAR et al, 2012).

Muitos pacientes humanos com grandes hérnias apresentam sintomas invalidantes, como grandes abaulamentos da cavidade abdominal, feridas crônicas, falta de mobilidade, dores nas costas (MAZZOCHI et al, 2011), conforme o quadro vai agravando, os pacientes sofrem com o afastamento de seu trabalho e de suas atividades diárias e com alteração estética (MILLIKAN, 2003).

As hérnias incisionais podem ser agudas, até os sete dias de pós-operatório, ou crônicas, notadas semanas ou anos mais tarde (RAISER, 1999; SMEAK, 2002). A evisceração através da deiscência é mais comum em hérnias agudas. O omento ou ligamento falciforme protrui primeiro, seguido por alças intestinais. É comum haver auto-mutilação, mesmo quando a evolução é de minutos. Pode haver severa perda de sangue e septicemia, podendo levar ao choque e ao óbito (RAISER, 1999; SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005).

3.1.1 Patogenia

As hérnias incisionais são resultado de forças excessivas atuando sobre a incisão abdominal ou de fixação insuficiente da ferida suturada. Os fatores de risco para a hérnia incisional aguda são: pressão intra-abdominal causada pela dor, tecido adiposo retido entre as bordas da sutura, material de sutura inadequado, infecção, tratamento crônico por esteróides e cuidados pós-operatórios insuficientes (CHEVREL; RATH, 2000; SMEAK, 2002; ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006). Aumentam o risco: atividade excessivamente vigorosa do animal, episódios violentos de tosse ou esforço de defecação no período pós-operatório, obesidade, gestação ou distensão de órgãos em decorrência de obstrução (HAGE; IWASAKI, 2002; READ; BELLENGER, 2002; SMEAK, 2002;).

O erro técnico durante a cirurgia é a causa mais comum de ruptura aguda da ferida cirúrgica, sendo as complicações locais, especialmente a infecção, a causa predisponente mais importante (RAISER, 1999; READ; BELLENGER, 2002; FOSSUM, 2005), atingindo um valor aproximado de 50% de casos (RAISER, 1999). Outras possibilidades são a ruptura da sutura, deslizamento ou afrouxamento dos nós e o corte do tecido pelo fio da sutura (RAISER, 1999; FOSSUM, 2005). É importante lembrar que a maioria das hérnias incisionais ocorre até cinco dias de pós-operatório, momento no qual a ferida conta com a resistência da sutura como suporte, antes da síntese de colágeno iniciar (RAISER, 1999).

O processo de cura das feridas cirúrgicas pode ser retardado em pacientes debilitados, muito jovens ou muito idosos, ou que apresentam hipoproteinemia (FOSSUM, 2007). A ocorrência mais rara de deiscência pode ser vista em animais com desequilíbrios hídrico-eletrólitos, anemia, hipoproteinemia, doença metabólica, imunossupressão, distensão abdominal, naqueles que foram tratados com corticosteróides, agentes quimioterápicos ou radiação (RAISER, 1999; FOSSUM, 2005).

Em humanos, os fatores de risco para hérnia incisionais são: infecção da ferida, complicações pulmonares, distensão abdominal, obesidade, procedimentos de emergência, reintervenção prematura, insuficiência hepática, processo patológico concorrente, tipo de fechamento da ferida, material e tipo de sutura. As situações que causam estresse à sutura no pós-operatório e aumentam o risco de hérnia incisional são: tosse, vômito, ileo paralítico e repetidas cateterizações urinárias (CHEVREL; RATH, 2000; MILLIKAN, 2003). Os fatores de risco associados à idade avançada e ao sexo masculino são controversos (MILLIKAN, 2003). Alguns estudos apontam que quando os pacientes são padronizados quanto a sexo, idade e indicação cirúrgica, aqueles com hipoproteinemia e desnutrição apresentam preponderância na ocorrência de deiscência de sutura (MAKELA, 1995; CHEVREL; RATH, 2000). A incidência de hérnia incisional é de 15% a 20% após cirurgia bariátrica, e 23% em pacientes com infecção da ferida cirúrgica (MILLIKAN, 2003).

Obesidade é o maior fator predisponente das hérnias incisionais em humanos, e quando associada com complicações pulmonares ou infecção da ferida, esse quadro é ainda mais dramático. É recomendado que antes da cirurgia de reparo os pacientes percam peso, deixem de fumar, controlem o diabetes e evitem medicamentos que interfiram no processo cicatricial. Todos esses cuidados objetivam diminuir possíveis complicações como infecções e deiscências de sutura e minimizar causas para o enfraquecimento dos tecidos que levam à formação de hérnias. A infecção da ferida cirúrgica está associada, na maioria dos casos, a obstruções pulmonares crônicas, vômitos repetitivos e condições sistêmicas como: desnutrição, ascite, hematoma pós-operatório, diálise peritoneal, gestação, sepse, anemia, uremia, falência renal, diabetes, uso de medicamentos esteroidais ou quimioterápicos (ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006; KIM; BRUEN; VARGO, 2006).

3.1.2 Sinais clínicos e diagnóstico

Sinais de edema e inflamação, com aumento de volume local e exsudato serosanguinolento da cicatriz cirúrgica nos primeiros cinco dias após a celiorrafia são sinais

consistentes de deiscência da sutura e necessitam de rápido diagnóstico e ação corretiva (RAISER, 1999; SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). Seromas, hematomas, celulite, neoplasia e a excessiva resposta do tipo corpo estranho ao material de sutura são diagnósticos diferenciais (SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). Para o diagnóstico definitivo, podem ser necessários exames complementares como radiografia, ultra-sonografia e biópsia aspirativa por agulha fina (SMEAK, 2002).

Mais da metade das hérnias incisionais manifestam-se nos primeiros dois anos da cirurgia original; no entanto, uma porcentagem significativa pode ocorrer após muitos anos (SMEAK, 2002; MILLIKAN, 2003). A dor não é uma queixa normal no quadro inicial, mas após o aparecimento do aumento de volume, esta ocorre por ocasião de esforço ou atividade vigorosa. Com o passar do tempo e o aumento de tamanho da hérnia, o paciente passa a apresentar dor ao movimento, na tosse ou quando o esforço é mais frequente. Sinais agudos de vômito, obstipação e dor severa são pouco comuns, porém quando presentes indicam encarceramento ou estrangulamento de estruturas intestinais, que necessitam tratamento cirúrgico de emergência (MILLIKAN, 2003).

Em humanos, o diagnóstico pelo exame clínico pode ser difícil em pacientes obesos ou que sofreram múltiplas intervenções cirúrgicas no abdômen. Como exames complementares, é indicada a tomografia computadorizada abdominal, a ultrassonografia e as séries com contraste gastrointestinal. A laparotomia, apesar de invasiva, é útil em pacientes cujo diagnóstico continua sem confirmação. Alguns achados do exame físico podem complicar o diagnóstico, tais como: diástase do músculo reto abdominal, que pode ocorrer no pós-parto, ou relaxamento da musculatura abdominal secundária a lesões nervosas, que ocorrem em doenças da coluna vertebral. Uma vez detectada a hérnia incisional, deve-se repará-la, a menos que exista alguma doença concomitante que impeça o reparo cirúrgico imediato (MILLIKAN, 2003).

4. O TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS HÉRNIAS

Os quatro objetivos da herniorrafia são: (1) retorno do conteúdo viável para sua localização; (2) oclusão segura das bordas para evitar a recidiva; (3) obliteração do tecido redundante do saco; (4) uso dos tecidos do próprio paciente quando possível. A melhor abordagem é a incisão sobre o saco ou anel herniário, com atenção a uma exposição cirúrgica e acesso adequados, pois os tecidos podem estar friáveis. Pode ser necessário ainda o alargamento do anel herniário para um acesso razoável. Os tecidos desvitalizados devem ser excisados e as aderências devem ser desfeitas por divulsão ou dissecação (READ; BELLENGER, 2002).

A oclusão do anel é realizada pela aproximação direta dos tecidos locais com sutura em estruturas com força de retenção suficiente para resistir à ruptura. A mobilidade dos tecidos pode ser aumentada pela dissecação local ou pela criação de retalhos musculares ou fascias locais. Também podem ser utilizados retalhos de tecido autógeno, como a fáscia lata ou a pele. Quando a aproximação dos tecidos sem tensão exagerada é impossível pela extensão do defeito, podem ser utilizados implantes de material sintético ou natural (READ; BELLENGER, 2002).

Os cuidados pós-operatórios devem minimizar a carga sobre a ferida cirúrgica. Deve ser evitada qualquer causa de aumento de pressão intra-abdominal, como episódios de vômito, latidos excessivos e tenesmo (READ; BELLENGER, 2002; MILLIKAN, 2003; FOSSUM, 2005). Entre as causas de recidiva pode-se ter: infecção, tensão exagerada, nutrição inadequada dos tecidos e falhas de técnica como o uso de materiais incorretos ou de camadas de tecido inadequadas (RAISER, 1999; READ; BELLENGER, 2002; MILLIKAN, 2003; FOSSUM, 2005). O fio de sutura deve suportar as pressões intra-abdominais até que a cicatriz adquira resistência suficiente. No entanto, a cicatriz adquire 40% da resistência tensil em seis semanas de pós-operatório e 80% da resistência em seis meses, nunca chegando aos 100% da resistência do tecido original (GIANLUPI; TRINDADE, 2004).

Quando há estrangulamento intestinal, obstrução urinária ou lesão a algum outro órgão, a correção cirúrgica é emergencial. No entanto, a extensão da desvitalização do tecido pode não ser aparente imediatamente, assim em pacientes estáveis, é melhor aguardar o momento em que as lesões musculares podem ser todas visíveis. Hérnias abdominais secundárias a mordidas de cães normalmente são contaminadas e é comum haver infecção da ferida e/ou deiscência da sutura. O tratamento de feridas infeccionadas inclui cultura

microbiológica, antibioticoterapia e drenagem. Deve ser realizada uma exploração abdominal por lesões concorrentes em outros órgãos, como avulsão mesentérica, perfuração gástrica ou intestinal, hérnia diafragmática e ruptura de bexiga (FOSSUM, 2005).

4.1 O tratamento das hérnias incisionais

Os objetivos da reconstrução da parede abdominal, no tratamento de hérnia incisional, são (1) reestabelecer o suporte estrutural; (2) estabelecer cobertura suficiente de tecidos moles; (3) otimizar a aparência estética; (4) minimizar morbidade e a incapacitação dos pacientes (MAZZOCCHI et al, 2011).

A escolha da técnica e do material a serem empregados é muito importante para restaurar a integridade, a resistência e o contorno da parede abdominal. Este deve ser suficientemente resistente para evitar recidivas (GIANLUPI; TRINDADE, 2004). A escolha da técnica a ser utilizada depende das técnicas que foram empregadas no reparo inicial: se foram realizadas incisões de relaxamento, se foi utilizada prótese de tela ou membrana, de que forma a tela foi utilizada ou se foi utilizado flape muscular (MILLIKAN, 2003).

A definição do tipo de hérnia do paciente também é importante para estabelecer o seu tratamento, pois as hérnias terão comportamentos diferenciados de acordo com seu local, tamanho e número de recorrências (CHEVREL; RATH, 2000).

Na medicina, estudos sobre a prevalência de hérnia incisional são realizados em busca da melhor técnica de incisão, do melhor padrão de sutura e método de sutura. No entanto, não existe um consenso sobre esses procedimentos. Essa dificuldade ocorre porque a maioria dos estudos utilizam técnicas variadas de fechamento da cavidade abdominal e em processos patológicos não padronizados (MILLIKAN, 2003; SILVEIRA et al, 2012). As opções dos cirurgiões para o reparo das hérnias incisionais são o reparo primário aberto, o reparo com tela aberto, o reparo por laparotomia ou a mobilização de tecido autólogo (MAZZOCCHI et al, 2011).

O reparo primário é apropriado para a hérnia aguda sem muita contaminação ou lesão em tecidos. Se houver contaminação ou lesões dos tecidos superficiais, deve-se realizar a oclusão de rotina, mas as camadas superficiais devem ser deixadas abertas para a drenagem e o debridamento tangencial. Feridas profundas e contaminadas gravemente devem ser tratadas com técnicas de drenagem peritoneal aberta (SMEAK, 2002).

Em humanos, para defeitos menores que cinco centímetros de diâmetro e sem recorrência, pode-se utilizar uma técnica simples, aproximando as bordas com uma sutura contínua ou interrompida, com material não absorvível (CHEVREL; RATH, 2000; MILLIKAN, 2003). Contudo, mesmo essas pequenas hérnias apresentam uma recorrência de 50%, pois em qualquer tamanho de defeito, vai ocorrer sempre tensão no reparo (MILLIKAN, 2003; SILVEIRA et al, 2012). Essa tensão pode ser atenuada com incisões de relaxamento ou suturas de retenção internas (CHEVREL; RATH, 2000; MILLIKAN, 2003). Para hérnias recorrentes, dos mesmos tamanhos, é indicado o uso de prótese (CHEVREL; RATH, 2000).

Para as hérnias de 10 a 15 cm e para as maiores de 15 cm, em humanos, a reconstrução poderia ser realizada com flape muscular reforçado por prótese. Para hérnias incisionais laterais, seria interessante utilizar uma prótese entre duas camadas musculares com a possibilidade de uma segunda tela, reforçando o arranjo. Quando não é possível uma reconstituição anatômica da parede abdominal, pode-se utilizar uma prótese absorvível fixada nas margens da falha muscular paralela a uma prótese não absorvível mais externa (FIGURA 3) (CHEVREL; RATH, 2000). Para pacientes humanos com grandes defeitos na linha média ventral ou infecção na ferida, fica descartada a possibilidade de utilização de telas (MILLIKAN, 2003).

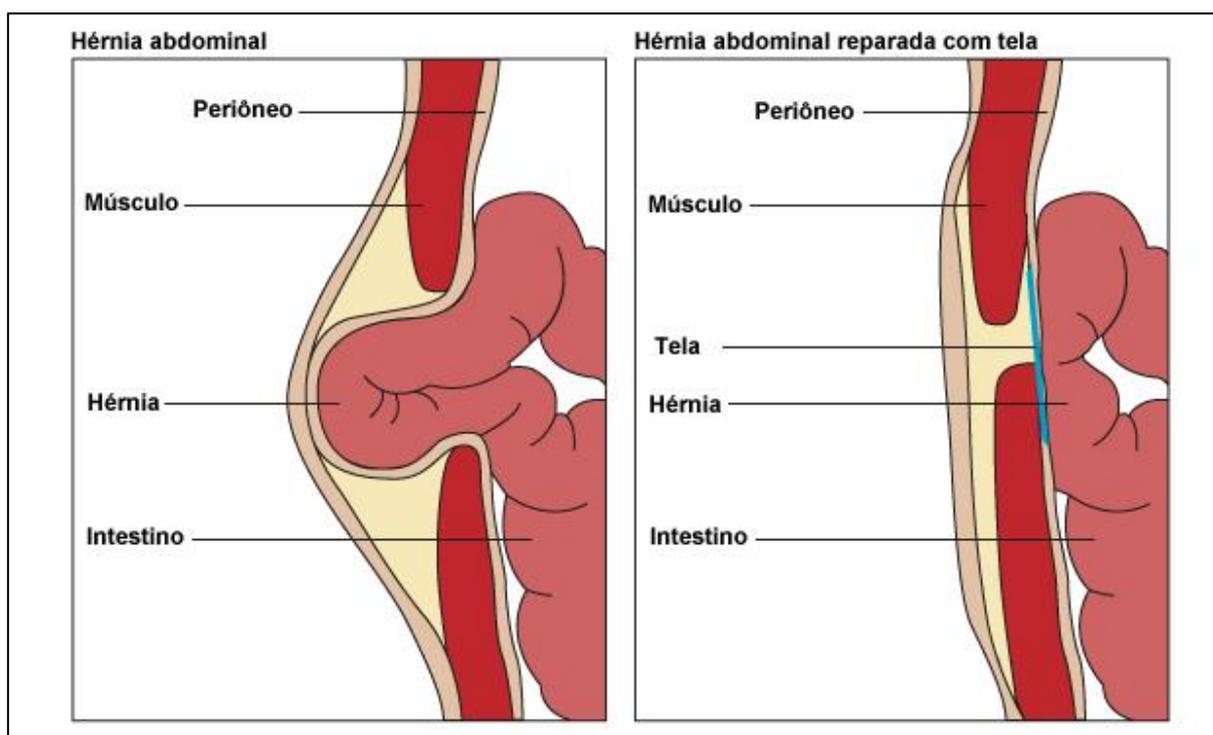


Figura 3 - Desenho esquemático de hérnia abdominal e seus componentes e de reparo feito com tela. Fonte KIM, BRUEN, VARGO, 2006. (Adaptado por VIDOR, S. B., 2012)

Cirurgiões devem evitar a utilização de telas não absorvíveis em hérnias infectadas ou com alto risco de infecção (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; KIM; BRUEN; VARGO, 2006). A suscetibilidade dessas telas para colonização bacteriana e infecção crônica ocorre porque as bactérias aderem aos polímeros da tela e geram um biofilme que as protege das defesas imonológicas do hospedeiro a da ações dos antibióticos (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006).

As taxas de recidiva de hérnias incisionais variam de 10% a 50% após o reparo primário e, de 3% a 17% quando há utilização de telas ou membranas, reforçando a idéia de que o melhor método de tratamento de hérnias complexas é a utilização de próteses. No reparo de hérnias incisionais de médio e grande porte é possível utilizar de um grande número de técnicas com a utilização de telas ou membranas, que podem ser colocadas entre os folhetos aponeuróticos (em contato com o saco herniário), como reforço após aproximação dos mesmos ou preenchendo o espaço de incisões relaxadoras (GIANLUPI; TRINDADE, 2004).

Os fios não absorvíveis são vistos como nichos de infecção e como possibilidade de corte da fáscia a longo prazo que poderiam predispor a hérnias tardias. Por outro lado, desde a década de 80, os fios monofilamentares absorvíveis lentamente tornaram-se o material de escolha para as suturas contínuas, e os multifilamentares foram eleitos para as suturas interrompidas (RAISER, 1999; MILLIKAN, 2003). Embora os fios absorvíveis sejam adequados às celiorrafias, os fios inabsorvíveis ou os fios absorvíveis sintéticos são preferíveis para a rafia da linha alba, pois o tecido fibroso necessita da sustentação da sutura por um período mais prolongado (RAISER, 1999).

A escolha entre a sutura contínua ou interrompida também é controversa, pois a sutura contínua é mais rápida e distribui a tensão igualmente ao longo do fechamento, porém muitos estudos revelam não haver diferença entre as duas técnicas de fechamento (RAISER, 1999; MILLIKAN, 2003). Os pontos de sutura não devem ficar a menos de 5 mm das bordas da incisão nos tecidos identificados como mais robustos (RAISER, 1999; SMEAK, 2002).

Fechamento em massa ou em camadas é outra questão controversa (MILLIKAN, 2003). A rafia da parede abdominal, em cães e gatos, deve ser feita em um plano único, envolvendo apenas peritônio e bainhas superficial e profunda dos músculos retos do abdômen que se unem para formar a linha alba, sem incluir as fibras desses músculos. Onde há inclusão das fibras dos músculos, pode-se verificar áreas adjacentes espessadas ou necróticas. Os pontos

da linha mediana podem possuir margem suficiente de tecido fibroso sem incluir a massa muscular (RAISER, 1999).

Pacientes com reparo de hérnias agudas recebem as mesmas prescrições de pacientes de cirurgias abdominais eletivas. O exercício deve ser restrito no mínimo durante duas semanas, a ferida cirúrgica deve ser observada cuidadosamente para encontrar sinais precoces de infecção. Caso haja infecção, então as suturas de pele e do espaço subcutâneo serão removidas para que a ferida fique aberta para drenagem. Nos casos de evisceração, a fluidoterapia será importante para repor a perda de líquidos, os antibióticos e a drenagem serão importantes para debelar a infecção, e a nutrição será igualmente importante para determinar o prognóstico (RAISER, 1999; SMEAK, 2002).

4.1.1 Emergência nas hérnias evisceradas e encarceradas

Deve haver a hospitalização e intervenção cirúrgica imediata nos casos de hérnias evisceradas. Quando há peritonite, deve-se estabilizar o paciente antes de qualquer procedimento anestésico-cirúrgico. Deve-se instituir a fluidoterapia com ringer lactato e a antibioticoterapia parenteral, associando cefalexina ou ampicilina sódica com metronidazole, até o resultado do antibiograma. A antibioticoterapia deve continuar por mais sete dias de pós-operatório por via oral e deve ser prescrito repouso, uso de bandagem e retorno em 10 dias para avaliação e retirada de pontos (RAISER, 1999; SMEAK, 2002).

Quando há evisceração, os órgãos expostos devem ser cobertos com bandagens esterilizadas para reduzir a contaminação e os danos aos tecidos enquanto são feitos os exames vitais e o paciente é estabilizado para entrar em cirurgia. Deve-se prestar atenção para não permitir que o animal se mutila, pois o resultado será o choque pela perda de sangue e de líquidos. Quando ocorre a lesão nas alças intestinais, poderá ocorrer contaminação grave da ferida. A fluidoterapia, a hemoterapia e a antibioticoterapia serão importantes para a estabilização do paciente (SMEAK, 2002).

O acesso geralmente é feito sobre a incisão original. Nas hérnias agudas evisceradas, se há suspeita de problemas com a sutura, ela deve ser toda retirada e refeita. O debridamento das bordas viáveis e sem necrose não é necessário e pode diminuir o tempo de recuperação. O intestino deve ser inspecionado cuidadosamente para avaliar sua viabilidade e receção das porções comprometidas (SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). Havendo necrose das bordas da ferida, deve-se proceder o reavivamento das bordas, além de remover todos os tecidos

desvitalizados, as aderências, os coágulos, os restos de fios de sutura e as sujidades, utilizando a curetagem, a excisão, o debridamento e a irrigação (RAISER, 1999).

A cavidade abdominal deve ser lavada copiosamente com solução salina estéril aquecida. Pode-se considerar a possibilidade de deixar um dreno se houver peritonite generalizada (SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). Porém, é importante considerar que a pressão negativa da cavidade abdominal dificulta a drenagem e que os drenos sofrem obstrução por fibrina ou pelo omento, ficando viáveis por aproximadamente seis horas (RAISER, 1999).

Nas cirurgias de emergência com encarceramento e obstrução intestinal, os cirurgiões enfrentam um grande desafio, pois trabalham em um campo cirúrgico contaminado, com tecidos edemaciados, inflamados e friáveis. Nessa cirurgia com altas taxas de recorrência, deve-se remover a origem da contaminação e reconstruir a parede abdominal. Possivelmente haverá a necessidade de ressecção de parte do intestino, o que aumenta ainda mais as chances de complicações infecciosas no pós-cirúrgico. Adicionalmente, mais da metade dos pacientes com essa afecção possui hérnias múltiplas ou muito grandes para a utilização das técnicas de reparo primário (ZAFAR et al, 2012).

4.1.2 Tratamento das hérnias incisionais crônicas

A abertura da ferida cirúrgica de 10 a 21 dias geralmente causa hérnias sem evisceração, pela suficiente força do saco herniário e da pele suprajacente, por isso é possível o tratamento com cirurgia eletiva (SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). O tratamento conservador de pequenas hérnias assintomáticas pode ser considerado apenas nos casos em que os proprietários do animal monitorem seu estado diariamente. Já, se houver aderências a órgãos herniados, a indicação será de cirurgia imediata, pois estas podem causar torção e obstrução vascular do tecido retido (SMEAK, 2002).

A abordagem deve ser feita sobre a área da incisão original. A correção ocorre, na maioria dos casos por aproximação das bordas da ferida com a sutura (MAZZANTI, 2000; SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005). A dissecação cirúrgica e a identificação do tecido de sustentação nas margens da hérnia são essenciais para um reparo eficaz, pois se o tecido cicatricial não for extensamente excisado, haverá recidiva (RAISER, 1999; READ; BELLENGER, 2002). As bordas musculares podem retrair-se, produzindo uma perda funcional da parede abdominal. Dessa forma, a tensão excessiva durante o reparo aumenta o risco de recorrência, o que explica que 30% dos casos de recidivas nos reparos de hérnia

incisional em humanos ocorrem se não for utilizado um retalho de prótese (DALECK et al, 1988; SMEAK, 2002; FOSSUM, 2005).

Na cirurgia reconstrutiva, defeitos grandes podem exigir a mobilização de um tecido a partir de outros locais. Flapes pediculados são tecidos parcialmente avulsionados, a partir de um local doador e mobilizados para cobrir um defeito. Podem ser criados para facilitar uma herniorrafia, recobrir defeitos de tecidos moles, contribuir para circulação em fraturas e combater infecções. Na rotina do reparo das hérnias abdominais, pode-se utilizar flapes do músculo oblíquo abdominal (FOSSUM et al., 2005; ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006). Contudo, esta técnica oferece uma significativa morbidade no local de origem do tecido transferido (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; AYELE et al, 2010).

Hérnias muito grandes são um desafio, pois podem apresentar uma taxa de recorrência maior que 50%. O seu tratamento segue as mesmas regras da cirurgia reconstrutiva: oferecer suporte estrutural para os tecidos locais ou para as próteses e recobrí-los com tecido vascularizado (SUKKAR et al, 2001).

Nas hérnias extensas, pode ser impossível a oclusão primária do defeito. Esta condição é explicada pelo fenômeno conhecido como “perda de domínio”, que ocorre quando a cavidade abdominal “acostuma-se” a abrigar um conteúdo de pequeno volume. Forçar a volta de todo conteúdo abdominal para dentro da cavidade gera, não só a tensão excessiva aplicada à sutura, como também uma disfunção pulmonar aguda, consequência da restrição dos movimentos do diafragma (READ; BELLENGER, 2002; FOSSUM, 2005). Nesses casos utiliza-se adicionalmente técnicas de expansão de tecido e incisões de relaxamento (MILLIKAN, 2003).

4.2 Tratamento das hérnias incisionais com telas

Na década de 70, Liechtenstein, desenvolveu o conceito de diminuição da tensão com o uso de tela de polipropileno durante a cirurgia. Nessa época, iniciou a utilização de próteses com o objetivo de reforçar a parede abdominal (ARAÚJO et al, 2010). O uso das telas reduziu as taxas de recorrência das hérnias incisionais de 30% a 40% para 5% a 10% (CHEVREL; RATH, 2000; GIANLUPI; TRINDADE, 2004; ARAÚJO et al, 2010).

As telas, ou malhas, podem ser utilizadas de duas maneiras no reparo das hérnias incisionais. A primeira ocorre durante o reparo primário, a fim de reforçá-lo. Após o fechamento fascial, a tela é suturada sobre o músculo. Dessa forma, a tela fica separada dos

órgãos abdominais pela fáscia e pelo músculo. A desvantagem desta técnica é a tensão, a dissecação de uma grande área subcutânea (que predispõe à formação de seroma) e a infecção da tela, caso a ferida cirúrgica seja infectada. A segunda forma, na impossibilidade de aproximação das bordas musculares e/ou grande perda tecidual, é a utilização da tela como um substituto, inserindo-a diretamente no defeito. Essa técnica permite a diminuição da tensão sobre o reparo, porém haverá a possibilidade de deiscência das suturas de fixação da tela pela pressão fisiológica exercida sobre a mesma (MILLIKAN, 2003).

As controvérsias atuais versam sobre o acesso cirúrgico aberto versus a videolaparoscopia (MILLIKAN, 2003). Há estimativas que demonstram que o acesso via videolaparoscopia reduz de 15% para 1% a incidência de infecção do reparo com tela (MEFIRE; GUIFO, 2011). Algumas outras manobras poderiam aumentar o sucesso do uso de tela como a difusão diária de solução antisséptica, a irrigação com solução antibiótica e a aspiração da secreção. Somente a drenagem da ferida já aumenta para 76% a taxa de sucesso nos casos de implante de tela de polipropileno (MEFIRE; GUIFO, 2011).

Existem mais de 80 tipos de telas para o reparo das hérnias abdominais. Os materiais sintéticos inabsorvíveis mais utilizados são os derivados do polipropileno (Marlex®, Prolene®, Surgipro®) e os derivados do politetrafluoretileno expandido (Gor-etex®, Trelex®). Dos materiais sintéticos absorvíveis, destacam-se os derivados de ácido glicólico (Dexon®) e da poliglactina (Vicryl®). As telas de polipropileno podem ser monofilamentares (Marlex®), bifilamentares (Prolene®) ou multifilamentares (Surgipro®). A tela Marlex® foi a primeira e continua sendo a tela mais utilizada. As telas de politetrafluoretileno expandido são flexíveis e microporosas e vêm chamando a atenção pela mínima reação inflamatória e pela menor quantidade de aderências (MILLIKAN, 2003; PUTTINI, 2006). A tela de polipropileno é o material mais utilizado para esse fim (MILLIKAN, 2003; GIANLUPI; TRINDADE, 2004; ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006; PUTTINI, 2006; ARAÚJO et al, 2010). E o segundo colocado desse *ranking* é o politetrafluoretileno (ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006; PUTTINI, 2006).

As malhas absorvíveis (Vicryl® e Dexon®) são utilizadas nos casos em que há grande risco de infecção da tela e o reparo primário não é indicado (MILLIKAN, 2003). Há contraindicação do uso de telas na colocação intra-abdominal, pois pode haver a formação de aderências, fístulas enterocutâneas e até mesmo oclusão intestinal. O poliéster tem apresentado uma ocorrência alta de fistulação, infecção e recorrência, quando comparado com

Márlex®, Prolene® e Gore-Tex®. Assim como o polipropileno, o politetrafluoroetileno apresenta as menores taxas de complicações intestinais (MILLIKAN, 2003; ARAÚJO et al, 2010).

Mais recentemente criadas, as telas de dupla composição com a barreira anti-aderência proporcionam adequada força tênsil aos tecidos sem a formação de aderências: polipropileno dupla Composix®, e politetrafluoroetileno (Davol®), politetrafluoroetileno Dual® e Sepramesh®, Sepra film® e polipropileno (MILLIKAN, 2003; ARAÚJO et al, 2010; DOLCE et al, 2010). As telas de dupla composição têm uma face que, em contato com a musculatura, induz reação inflamatória para manter a força tênsil dos tecidos e evitar a recidiva da hérnia. A outra face fica em contato com as vísceras e necessita, pelo contrário, evitar a formação de aderências (ARAÚJO et al, 2010).

As pesquisas sobre a formação de aderências das diferentes telas necessitam avaliar não apenas os materiais que as compõem, como também o diâmetro de seus poros, a sua estrutura tridimensional e o seu peso molecular (ARAÚJO et al, 2010).

Há muitas evidências de que a utilização de telas prostéticas permanentes no reparo de hérnias incisionais reduz o risco de recorrência (MILLIKAN, 2003; GIANLUPI; TRINDADE, 2004; ACAMPORA; JOLI; TRAMONTE, 2006; ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; NGO et al, 2011). As taxas de recidiva de hérnias incisionais variam de 10% a 50% após o reparo primário e, de 3% a 17% quando há utilização de telas ou membranas (MILLIKAN, 2003; GIANLUPI; TRINDADE, 2004), reforçando a idéia de que o melhor método de tratamento de hérnias complexas é a utilização de próteses. No entanto, materiais sintéticos permanentes apresentam um grande potencial de complicações como a infecção, extrusão da tela, dor crônica, aderência intestinal, obstrução e formação de fístula, causas de recorrência da hérnia (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; KIM; BRUEN; VARGO, 2006; LIMPert et al, 2009; NGO et al, 2011).

5. MEMBRANAS DESCELULARIZADAS

Os biomateriais são quaisquer substâncias de origem natural ou sintética que podem ser utilizados, por qualquer período de tempo, como a totalidade ou parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo. O nome biomaterial é atribuído apenas pela vontade do cirurgião de impô-lo ao organismo que necessita do tratamento. Assim, todos os tipo de implantes são biomateriais (ROUSH, 2002).

Membranas biológicas são tecidos de origem biológica que, ao contrário das telas sintéticas, não estão suscetíveis a infecções agudas ou crônicas e inflamações crônicas. Os enxertos com as membranas biológicas podem ser xenógenos ou alógenos. Enquanto o enxerto alógeno tem origem na mesma espécie animal, o xenógeno têm origem de uma espécie animal diferente. A nomenclatura utilizada ainda pode ser: xenoenxerto ou aloenxerto (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006).

Os materiais absorvíveis de origem animal, como xenoenxertos ou aloenxertos, são melhores do que os materiais sintéticos, pois induzem a cicatrização pela transformação da matriz celular e não pela reação de corpo estranho, como as próteses sintéticas fazem. Essa diferença do mecanismo de cicatrização é muito importante para diminuir o risco de infecção (ARAÚJO, 2010), e preservar (em diferentes proporções) a estrutura e a funcionalidade tecidual. O material da tela implantada é importante, pois tem a função de propiciar a reação inflamatória e a posterior fibrose local (ARAÚJO, 2010), funcionando como um arcabouço para o desenvolvimento do novo tecido (BRUN, 2004; GUIMARÃES et al 2007). A matriz extracelular, por sua vez, é importante para a adesão, o alinhamento e a diferenciação celular (LIAO; ZHOU, 2009).

As membranas biológicas se aproximam do conceito de tela ideal por apresentarem resistência à colonização bacteriana e à infecção crônica; por serem inertes ao sistema imune e não serem carcinogênicas; serem atóxicas; terem alta disponibilidade e custos aceitáveis; terem resistência mecânica durante um longo período de tempo; não causarem dor adicional após implante; e por não causarem aderência às vísceras (GAMBA et al, 2002; ROUSH, 2002; ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; SINGH et al, 2008; AYELE et al, 2010; DOLCE et al, 2010; ZHAO et al, 2011).

A tela ideal necessita ainda prover um suporte físico adequado para a adesão celular e uma sinalização adequada para o crescimento e a diferenciação celular (GAMBA et al, 2002;

ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; AYELE et al, 2010; DOLCE et al, 2010). Ao mesmo tempo, deve degradar-se lentamente, enquanto o novo tecido se fortalece com a deposição de colágeno. Assim, a degradação e a substituição do enxerto pelo tecido do paciente deve ocorrer de forma a manter ou aumentar a resistência do reparo (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; DOLCE et al, 2010). Contudo, se o paciente não deposita colágeno adequadamente na membrana, esta não se degradará (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006).

A biocompatibilidade de um implante não depende apenas de sua composição química, mas também da composição química e topográfica de sua superfície, seu tamanho, forma, energia, elasticidade e método de esterilização. Os testes de biocompatibilidade de novos materiais desenvolvidos são avaliações de (1) toxicidade, quando seus componentes químicos são testados *in vitro* e *in vivo*; (2) compatibilidade com componentes sanguíneos, como proteínas do plasma, indução de trombos, deterioração de elementos sanguíneos (3) estabilidade do material em diferentes soluções fisiológicas existentes; (4) testes das características físicas e químicas do material (5) testes de resposta dos tecidos *in vivo*, como inflamação aguda ou crônica, leve ou acentuada (ROUSH, 2002).

O material ideal precisa ainda poder ser prontamente utilizado e ter vida de prateleira aceitável (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006). Deve ser de fácil esterilização e utilização, resistente à manipulação, hipoalergênico, não corrosivo, não teratogênico, continuar no corpo apenas durante a necessidade por ser absorvível ou retirada sem morbidade (ROUSH, 2002) e ainda deve ser moldável para se adaptar ao local de aplicação (OLIVEIRA et al, 2009).

Nenhum implante sintético apresenta essas características (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006;). E até o momento, não existe membrana que possua todas essas características, já que ainda não foi desenvolvida uma membrana ideal para todas as situações clínicas (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; PUTTINI, 2006).

5.1 Tipos de membranas mais utilizados

As membranas biológicas são implantes biológicos inertes, compostos quase somente de colágeno, apresentando por isso baixa toxicidade (SINGH et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009). O processo de descelularização remove proteínas não estruturais (SINGH et al, 2008; LIAO; ZHOU, 2009). Dessa forma não só transforma o tecido em acelular como também em tecido imunologicamente inerte (LIAO; ZHOU, 2009; ZHAO et al, 2011), o que dispensa a

necessidade de utilização de fármacos imunossupressores durante o período trans e pós-cirúrgico (BRUN et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2009).

Existem aproximadamente dez marcas de membranas biológicas comerciais disponíveis para uso em humanos nos Estados Unidos da América, sendo que apenas dois deles apresentam dados completos a respeito de fatores de crescimento, potencial de transmissão de doenças, resposta celular e imune, crescimento vascular, características bioquímicas, degradação e suscetibilidade a infecções (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; DOLCE et al, 2010).

A utilização de membranas biológicas como material de implante na reparação de órgãos e tecidos na Veterinária é realizada no Brasil desde a década de 1960 com o trabalho pioneiro de Pigossi. Em 1967, Pigossi utilizou dura-máter homogênea, conservada em glicerina, na substituição do segmento dural de cães (GUIMARÃES et al 2007; OLIVEIRA et al, 2008).

Atualmente, dentre as membranas biológicas estudadas na Medicina e na Medicina Veterinária, destacam-se o centro tendíneo diafragmático, a dura-máter, a fâscia lata, o pericárdio e o peritônio, que constituem-se quase que exclusivamente de colágeno (GUIMARÃES et al 2007). Outros tecidos utilizados são centro frênico (BRUN et al, 2004), válvulas aórticas (STAINKI et al, 2001) cordão umbilical bovino, enxerto vascular, pele (SINGH et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009), túnica vaginal (AYELE et al, 2010), pele bexiga e diafragma (SINGH et al, 2008) que podem ser retirados de diversas espécies animais, como bovinos, suínos, equinos, coelhos, ratos e até mesmo humanos (STAINKI et al, 2001; BRUN et al, 2004; KIM; BRUEN; VARGO, 2006; GUIMARÃES et al 2007; SINGH et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2009; AYELE et al, 2010; NGO et al, 2011; ZHAO et al, 2011).

5.1.1. Peritônio bovino

O peritônio consiste em uma membrana de origem animal, composta em sua maior parte de colágeno, possuindo assim baixa antigenicidade e possibilidade de atuar como arcabouço para o crescimento e a diferenciação celular do animal receptor. Esse material apresenta baixo custo, fácil obtenção e estocagem, pode ser esterilizado e oferece fácil manuseio. O peritônio conservado em glicerina 98% por mais de 30 dias tem sua textura, elasticidade e resistência preservadas (OLIVEIRA et al, 2008;).

5.1.2. Pericárdio bovino

Um estudo retrospectivo verificou a utilização de implante de pericárdio bovino (FIGURA 4) (Veritas collagen matrix da empresa Synovis Life Technologies) em 26 pacientes humanos com hérnias recorrentes de 20 cm² a 600 cm², sendo 16 recorrências por infecção. O estudo registrou a diminuição da taxa de recorrência para 19% e a não ocorrência de fístula (LAMPERT et al, 2009).



Figura 4 - Pericárdio bovino, previamente conservado em glicerina a 98 %, sendo reidratado antes de sua utilização em cirurgia reconstrutiva. Fonte: OLIVEIRA et al, 2009.

5.1.3. Diafragma

Coelhos Nova Zelândia tiveram suas hérnias experimentais reparadas com diafragma homólogo descelularizado através de processo enzimático. As membranas apresentaram migração de fibroblastos, colágeno neoformado e neovascularização. Não houve crescimento de células musculares, porém também não houve sinais de necrose (GAMBA et al, 2002).

5.1.4. Matriz dérmica acelular humana

A matriz dérmica acelular humana é uma membrana biológica formada de derme humana separada da epiderme e dos seus constituintes celulares com a utilização de detergentes enzimáticos. Suas características de resistência mecânica e à infecção a tornam uma alternativa para o reparo de hérnias complexas, principalmente quando o paciente apresenta predisposição à hérnia incisional. Também em paciente obesos, com doenças concomitantes que aumentam o risco de infecção no pós-cirúrgico, e pacientes com infecções crônicas (KIM; BRUEN; VARGO, 2006).

Os enxertos dérmicos são incorporados no tecido do paciente por um mecanismo bioquímico de absorção enzimática, neovascularização e infiltração celular. A posterior etapa de remodelamento necessita da incorporação e proliferação de fibroblastos no tecido implantado enquanto ele é reabsorvido (KIM; BRUEN; VARGO, 2006; NGO et al, 2011). Sua indicação para reparos de hérnias infeccionadas ou com alto risco de infecção ocorre pela sua alta tolerância à infecção sobreposta sem sofrer perdas de resistência ou em sua continuidade. Em um estudo retrospectivo, na Faculdade de Medicina da Universidade de Utah, dos 29 pacientes humanos que apresentavam a indicação para reparo com a matriz dérmica acelular humana, 26 obtiveram sucesso neste tratamento (KIM; BRUEN; VARGO, 2006).

5.1.5. Matrigel

Matrigel é extraído de sarcoma de rato e contém várias proteínas e fatores de crescimento em concentrações ainda não definidas. Ele pode modificar os genes expressados pelas células e promove a diferenciação em mioblastos. Pode ser usado associado ao colágeno como scaffold em três dimensões, mas por causa de sua origem só é admitido seu uso em modelos experimentais e não no uso clínico (LIAO; ZHOU, 2009).

5.2 Soluções de conservação

Enxertos de tecidos biológicos podem ser produzidos a partir de vários métodos de fabricação e preservação para ser utilizados como materiais descelularizados que funcionam como arcabouços para a repopulação celular e revascularização do tecido a ser reparado (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006). As técnicas de preparação e de recuperação podem alterar os resultados do tratamento. Diferenças do processamento podem alterar a manipulação e a performance *in vivo* como tempo de infiltração celular (NGO et al, 2011). As membranas podem ainda ser preparadas de forma especial para cada paciente com a adição de mioblastos ou células-tronco (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006).

Muitos estudos são realizados a fim de descobrir o melhor meio de descelularização e preservação das membranas biológicas. O meio de conservação ideal deve manter a integridade tecidual; atenuar a ação antigênica; aumentar a resistência à tração; atuar por longo período; manter sua assepsia; ter baixo custo e ser de fácil utilização (GUIMARÃES, 2007; OLIVEIRA et al, 2009). Os implantes naturais não são eliminados pelo paciente e sim substituídos pelo seu tecido. Este padrão vem sendo verificado após a implantação desses materiais conservados em diferentes meios como a glicerina, o mel não processado e as

soluções hipersaturadas de sal e de açúcar. A manutenção desses implantes durante os sete primeiros dias de pós-operatório demonstram a ausência de reação hiperaguda (BRUN et al, 2004; SILVA et al, 2009). A ausência de vasculite leucocitária no implante demonstra não haver rejeição do tipo humoral, assim como a falta de vasculite linfonuclear demonstra também não haver rejeição do tipo celular. Assim pode-se concluir que as soluções de conservação diminuem a antigenicidade do tecido do implante (BRUN et al, 2004).

A glicerina é o meio mais estudado e utilizado na Medicina Veterinária (BRUN et al, 2004; GUIMARÃES, 2007; OLIVEIRA et al, 2009), enquanto o glutaraldeído é o meio mais utilizado na Medicina Humana, nas membranas utilizadas comercialmente (OLIVEIRA et al, 2009). Outros meios de conservação comumente utilizados são: solução alcoólica de tiomersal (1:1000), congelamento, álcool absoluto, vaselina, solução supersaturada de açúcar (300%), solução supersaturada de sal e polivinilpirrolidona a 5% (GUIMARÃES, 2007).

As soluções de glicerina e as soluções supersaturadas de sal e de açúcar têm ação antimicrobiana pelo mecanismo de desidratação do tecido, sem ter eficácia contra vírus e formas esporuladas de bactérias. Assim como também as membranas conservadas nessas soluções devem ser reidratadas antes de sua utilização (GUIMARÃES, 2007; OLIVEIRA et al, 2009).

5.2.1 Glicerina

A glicerina preserva o arcabouço tecidual, é de fácil utilização e baixo custo. Seu poder antisséptico ocorre por sua grande hidrofília (BRUN et al, 2004; GUIMARÃES et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2009), resultado de suas ligações covalentes com as moléculas de hidrogênio. O contato da glicerina com a água das células ocorre porque as moléculas da glicerina são muito pequenas e são capazes de entrar nas células pelos poros de suas membranas (GUIMARÃES et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2009). Este meio de conservação não induz à antigenicidade do receptor à membrana nele conservada (BRUN et al, 2004; GUIMARÃES et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2009) e ainda permite o armazenamento do material à temperatura ambiente, dessa forma não há formação de cristais intra e extracelulares e nem alterações das concentrações iônicas que alteram as células e a matriz celular (BRUN et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2009).

É possível armazenar pericárdio equino em glicerina 98% durante 11 anos em temperatura ambiente, sem crescimento de fungos e bactérias e sem perda da maleabilidade

da membrana (OLIVEIRA et al, 2009). O tempo mínimo de conservação do material na glicerina é de 30 dias, completamente imerso no meio (GUIMARÃES et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2009). Este tempo mínimo de conservação garante a atenuação imunogênica e o efeito antimicrobiano, importante para evitar a rejeição do enxerto pelo receptor (OLIVEIRA et al, 2009). A reidratação não necessita de adição de antimicrobiano e pode ser realizada entre 15 (BRUN et al, 2004) e 25 minutos (OLIVEIRA et al, 2009). Até o presente, os materiais conservadas com sucesso em glicerina 98% foram: centro frênico canino, dura-máter canina, centro tendíneo diafragmático bovino, cordão umbilical bovino, pericárdio equino (OLIVEIRA et al, 2009) peritônio, dura-máter e pericárdio bovinos (GUIMARÃES et al, 2007, OLIVEIRA et al, 2009).

Na avaliação da conservação de seis membranas naturais (centro tendíneo, dura-máter, fáschia lata, pericárdio, peritônio e túnica vaginal) em glicerina 98%, todas elas apresentaram a mesma constituição estrutural original, mesmo após 90 dias. (GUIMARÃES et al, 2007). Contudo, a conservação prolongada de tendões causou uma desidratação que não pôde se compensada, mas isso não afetou o resultado dos implantes. A musculatura lisa intestinal conservada com glicerina 98% apresentou danos celulares como a ruptura na membrana citoplasmática e núcleos dilatados com desagregação da cromatina (OLIVEIRA et al, 2009).

Stainki e colaboradores testaram os enxertos de aorta canina e de fáschia lata canina, conservado em glicerina 98% para reconstrução de esôfago cervical de ovinos. Nesse experimento, as membranas vedaram o esôfago e suportaram satisfatoriamente a pressão da passagem dos alimentos, oferecendo também as condições para regeneração epitelial completa do esôfago em 45 dias. Não houve deiscência de sutura e nem estenose esofágica (STAINKI et al, 2001).

O implante de centro frênico canino conservado em solução hipersaturada de sal na proporção de 1,5 g de sal comercial para 1 mL de água tridestilada apresentou resultados de capacidade de conservação semelhantes à glicerina 98%. Ambas as soluções mostraram características antissépticas e anti-imunogênicas e permitiram que o implante atuasse como suporte para o tecido em reparação muscular de ratos Wistar. Ambos os implantes não foram contaminados por fungos e bactérias, apresentaram o mesmo grau de inflamação e foram substituídos por tecido conjuntivo fibroso na mesma velocidade, a partir do 15º dia de pós-operatório (BRUN et al, 2004).

A citoplastia experimental em coelhos, utilizando pericárdio bovino conservado em glicerina a 98% não apresentou reação de corpo estranho ou sinais de rejeição, porém apresentou aderência a estruturas adjacentes e formação de cálculos vesicais. Apresentou também intensa reação inflamatória, neovascularização e fibroplastia. No entanto, aos 60 dias de avaliação, o implante já havia sido substituído pelos tecidos do receptor, com completo reparo de todas as camadas vesicais, provando ser um bom arcabouço para o desenvolvimento dos tecidos da bexiga (OLIVEIRA et al, 2008).

5.2.2. Glutaraldeído

O glutaraldeído, utilizado em biopróteses comerciais, tem boa ação bactericida e aumenta a resistência tecidual, permitindo uma melhor incorporação biológica do tecido. Contudo, apresenta um processo de calcificação, provavelmente por possuir núcleos de ancoragem de cálcio. É econômico, facilmente encontrado e age rapidamente na preservação dos tecidos. As válvulas cardíacas fabricadas a partir de válvulas aórticas suínas e de pericárdio bovino são tratadas normalmente com soluções com baixas concentrações de glutaraldeído. O glutaraldeído na concentração de 4% é eficiente na conservação de cartilagem auricular de bovino, centro tendíneo diafragmático bovino e enxerto vascular homólogo de equinos (OLIVEIRA et al, 2009).

Em estudo de hernioplastia em coelhos, com cartilagem auricular bovina, conservada em glutaraldeído a 4%, durante 30 dias, foi possível verificar a manutenção histomorfológica da cartilagem. O material implantado mostrou boa integração tecidual, sem a ocorrência da eliminação do implante. Também foi possível verificar neovascularização e intensa proliferação fibroblástica, indicando evolução cicatricial (SILVA et al, 2009).

5.2.3. Solução supersaturada de açúcar

A solução de açúcar a 300% - 300 g de açúcar cristalizado para 100 mL de água tridestilada – mantém a resistência e as estruturas morfológicas do tecido, sem sinais de infecção ou rejeição (OLIVEIRA et al, 2009). O açúcar atua na solução diminuindo sua atividade de água, o que inibe o crescimento bacteriano (BRUN et al, 2002). A solução pode armazenar membranas por 45 dias em temperatura ambiente, desde que seja trocada a cada dois dias.

5.2.4. Solução supersaturada de sal

A solução supersaturada de sal tem ação antibacteriana e antifúngica, baseada na diminuição da atividade de água, porém há possibilidade de que o iodo, encontrado no sal comercial, tenha também alguma ação conservante (BRUN et al, 2002; OLIVEIRA et al, 2009). Provavelmente a solução apresente propriedades antiimunogênicas como a glicerina, descartando a necessidade de uso de imunossupressores (BRUN et al, 2002).

Essa solução permite a conservação de membranas por 30 dias, à temperatura ambiente. As membranas conservadas nessa solução permanecem maleáveis e não apresentam reação de corpo estranho, nem eliminação da membrana por parte do receptor do implante (OLIVEIRA et al, 2009).

O pericárdio canino conservado em solução supersaturada de sal por 90 dias para reparo do músculo reto abdominal de ratos Wistar manteve as características estruturais do tecido e mostrou propriedade anti-sépticas. Não apresentou reações do tipo corpo estranho ou a eliminação do implante. Manteve-se maleável e permitiu a neovascularização e a sua substituição por tecido fibroso aos 30 dias de pós-cirúrgico (BRUN et al, 2002).

5.2.5. Solução de polivinilpirrolidona

A solução de polivinilpirrolidona tem excelente ação antimicrobiana e permite o armazenamento das membranas durante 45 dias, contudo observa-se a ruptura das células e a destruição dos seus núcleos, com o extravazamento da cromatina (OLIVEIRA et al, 2009).

5.2.6. Preservação por congelamento

O congelamento a -16° por 45 dias do material imerso em solução fisiológica, com ou sem antimicrobiano não é um bom método de conservação. O congelamento causa lise celular com acentuado aumento do espaço intersticial, causando grande alteração nos tecidos (OLIVEIRA et al, 2009).

5.2.7. Processo enzimático

A vantagem deste processo é ser relativamente rápido, levando apenas algumas horas com a extração das proteínas antigênicas do tecido, quase que eliminando a possibilidade de inflamação exacerbada e de rejeição (GAMBA et al, 2002; SINGH et al, 2008; ZHAO et al, 2011). No entanto, partes do diafragma de coelho, que GAMBA e colaboradores (2002) utilizaram no processamento detergente-enzimático, apresentaram lacunas de células na

histologia e uma estrutura menos compacta do que a existente no tecido original. Ainda, alguns detergentes não iônicos, utilizados em membranas disponíveis comercialmente, podem causar uma reação alérgica (ZHAO et al, 2011).

Estudos que utilizam membranas biológicas reportaram a redução da dor no pós-cirúrgico, redução do tempo de recuperação e do número de recorrências e transformação da membrana estudada em tecido fibroso dos animais pesquisados. Contudo, sem obter recuperação do tecido muscular, principal componente da parede abdominal, ou uma cicatriz resistente. Para este propósito há necessidade de adicionar aos scaffolds biológicos células-satélites (AYELE et al, 2010), como por exemplo, as células-tronco mesenquimais.

6. CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são um tipo especial de célula que possui capacidade de proliferação, auto-renovação, produção de diferentes linhagens celulares e regeneração de tecidos (CIRNE-LIMA, 2007; OKAMOTO e YARAK, 2010; PIGNONE, 2011). Apresentam uma divisão assimétrica, em que a célula-mãe produz duas células. Uma delas será indiferenciada como a célula-mãe enquanto a outra sofrerá um processo de diferenciação, perdendo sua capacidade de plasticidade para passar a apresentar o funcionamento específico do tipo celular em que se transformou (FIGURA 5). Este mecanismo permite explicar a existência de células-tronco em tecidos adultos (CIRNE-LIMA, 2007; OKAMOTO e YARAK, 2010; PIGNONE, 2011). São responsáveis pela homeostase, repondo as células perdidas na maturação, no envelhecimento ou no trauma. (OKAMOTO; YARAK, 2010).

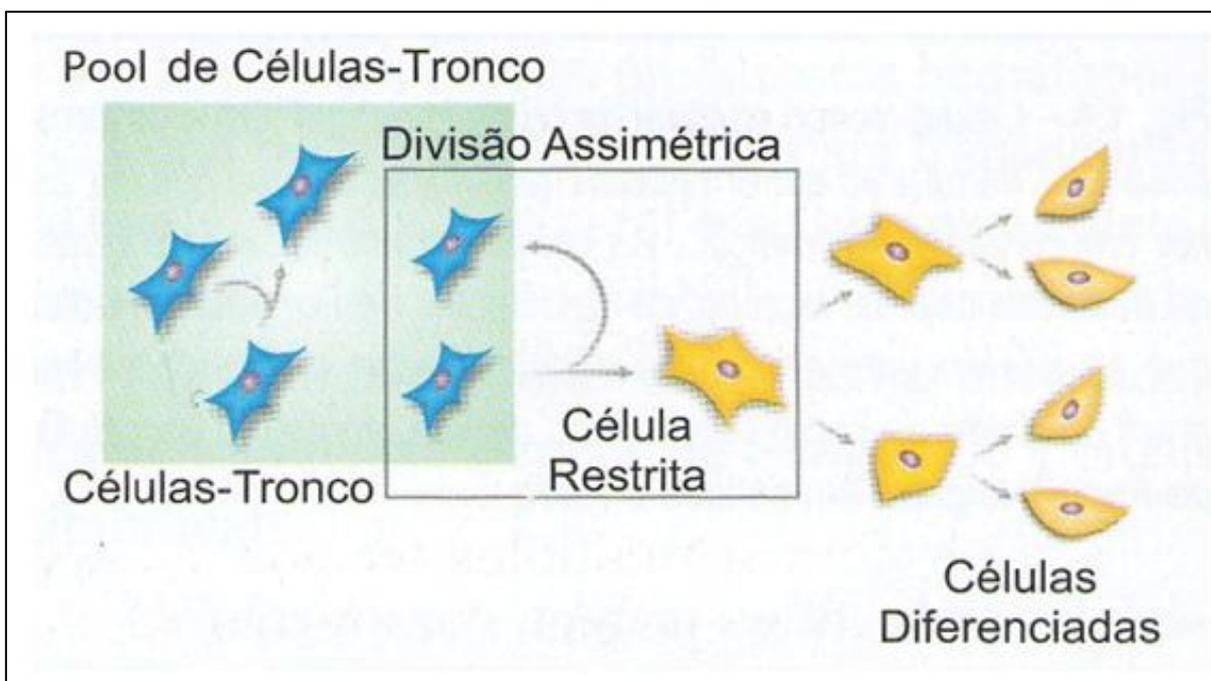


Figura 5 - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco. Fonte: ZAGO & COVAS, 2006.

Quanto à sua origem, podem ser embrionárias ou adultas (CIRNE-LIMA, 2007; OKAMOTO; YARAK, 2010; GIANOTTI, 2011; PIGNONE, 2011). De acordo com sua plasticidade, as células-tronco são classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes são células indiferenciadas capazes de gerar um novo organismo. Correspondem à fase do embrião recém formado e podem gerar tanto os tecidos embrionários, como os extra-embrionários. Células-tronco pluripotentes podem gerar todos os tipos de células de um indivíduo adulto, ou seja de todos os três folhetos embrionários:

ectoderma (tecidos epidérmicos e nervosos), mesoderma (músculos, ossos e sangue) e endoderma (fígado, pâncreas, trato gastrointestinal e pulmões). Contudo, células pluripotentes não formam tecidos embrionários, não tendo então a capacidade de gerar um indivíduo completo. Células multipotentes apresentam menor plasticidade, sendo capazes de gerar uma quantidade limitada de tipos de células (CIRNE-LIMA, 2007; OKAMOTO e YARAK, 2010; GIANOTTI, 2011).

As células-tronco adultas mais estudadas são as células-tronco hematopoiéticas, que, correspondendo a 0,1–1% do total de células da medula óssea. São encontradas no sangue periférico e no sangue de cordão umbilical e expressam proteínas de membrana específicas como CD34 e CD133. Outro tipo de célula-tronco multipotente, as células-tronco mesenquimais, são capazes de se diferenciar em condroblastos, fibroblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos e osteoblastos (JAISWAL et al., 1997; ZAGO; COVAS, 2006).

Em laboratório, as células-tronco fetais e adultas não apresentam cultivo permanente, pois tendem a morrer após alguns repiques ou a diferenciar-se em linhagens celulares específicas de acordo com sua origem. Alguns tipos de células-tronco adultas, como as células mesenquimais, no entanto, podem ser mantidas em cultura durante longo período, mantendo sua indiferenciação (GIANOTTI, 2011; CIRNE-LIMA, 2007). Diversos órgãos e tecidos possuem o seu compartimento de células-tronco mesenquimais, podendo ser isoladas da medula óssea, do tecido adiposo, rim, fígado, baço, pulmão, pâncreas, tendões, membrana sinovial, fluido amniótico, placenta, cordão umbilical e poupa dentária (NARDI; MEIRELLES, 2006; SEONG et al., 2010). *In vitro*, estas células crescem aderidas à superfície do frasco de cultura, expressam antígenos específicos como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e não expressam antígenos hematopoiéticos ou leucocitários, como CD34, CD14 e CD45 (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007, CHEN et al, 2012). As células-tronco mesenquimais aderem às placas de cultivo, semelhantemente a fibroblastos, e formam colônias após um tempo. Todas as células diferenciadas do cultivo morrem e as aderentes que sobrevivem são as células-tronco mesenquimais (OKAMOTO; CAMPOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; PHINNEY, 1999; PIGNONE, 2011; GIANOTTI, 2011).

Consideradas promissoras para aplicação em terapia celular, as células-tronco mesenquimais, preenchem diversos requisitos para essa utilização: (1) são de fácil obtenção; (2) podem ser obtidas a partir do próprio paciente; (3) possuem alta capacidade de multiplicação *in vitro*; (4) são capazes de diferenciação celular multipotente; (5) são

facilmente manipuladas em laboratório; (6) são pouco imunogênicas; (7) apresentam habilidade de integração no tecido do hospedeiro e interação com o tecido circunjacente (OKAMOTO; CAMPOS, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; PHINNEY, 1999). No entanto, é necessário ainda conhecer os fatores envolvidos no controle de autorrenovação e diferenciação celular e os efeitos crônico *in vivo* decorrentes da sua administração (OKAMOTO; CAMPOS, 2004). Assim, segundo Schuster (2008), as células-tronco mesenquimais são a modalidade clínica inicial mais provável para aplicação em terapia celular.

O tecido adiposo tem sido apontado como uma fonte alternativa de células-tronco. Estas células têm sido citadas em experimentos que visam desenvolver tratamento para doenças crônicas degenerativas, reconstruções cirúrgicas, de origem traumática ou não, lipoatrofias congênitas ou adquiridas, entre outras. Parecem ser uma fonte abundante de células para transplantes autólogos, facilmente obtidas por lipoaspiração, método mais barato e menos invasivo do que a punção da medula óssea. Além disso, sua viabilidade parece não ser alterada após a criopreservação do material aspirado (OKAMOTO e YARAK, 2010).

Recentemente, os cientistas sugeriram a idade como fator limitante para a utilização das células-tronco mesenquimais. Acredita-se que, com o avanço da idade, a senescência e a apoptose, mecanismos responsáveis pela supressão do desenvolvimento dos cânceres, podem induzir o declínio da função multiplicativa das células-tronco (OKAMOTO e YARAK, 2010).

Ainda há pouco conhecimento a respeito dos mecanismos de ação e dos benefícios do transplante de células-tronco na regeneração, especialmente muscular. Muitos trabalhos de bioengenharia focam-se em determinar o mecanismo de ação *in vivo* das células-tronco na regeneração de tecidos lesionados (CIRNE-LIMA, 2007). De fato, três mecanismos possíveis tem sido investigados: a secreção de fatores de crescimento e citocinas importantes para a regeneração tecidual, a transdiferenciação (principalmente em miofibroblastos e queratinócitos) e consequente integração no tecido lesado (GIANOTTI, 2011) e a fusão das células do doador com as do receptor, mantendo o número correto de cromossomos (CIRNE-LIMA, 2007).

No processo de reparo induzido pela ação parácrina, acredita-se que ocorra a sinalização celular através de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento alterando as características do nicho em que são transplantadas (CIRNE-LIMA, 2007; CRISOSTOMO,

2008). Através dessa sinalização celular, (1) a angiogênese do tecido isquêmico e a consequente perfusão local da inflamação são incrementadas; (2) ocorre uma regulação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, modulando a inflamação para reduzir a lesão e a extensão do infarto tecidual. (3) A expressão de genes de reparo do DNA e de secreção de enzimas anti-oxidantes aumentam a multiplicação e reduzem a apoptose celular. (4) Essa sinalização age ainda na matriz celular, favorecendo o remodelamento do tecido e a resistência da cicatriz; (5) Além disso, induz a atividade das células-tronco dos tecidos vizinhos no local da inflamação (CRISOSTOMO, 2008).

Nos processos de transdiferenciação, acredita-se que, a célula-tronco poderia diferenciar-se em um tipo específico de célula em resposta aos sinais do microambiente e os fatores produzidos no local da lesão. De qualquer forma, o microambiente que define a autorrenovação e a diferenciação celular das células-tronco por meio de sinais transmitidos por mediadores celulares e não celulares é denominado nicho. Esses fatores circunjacentes às células-tronco (fatores internos e externos) são extremamente importantes para a sua manutenção, porém até o momento, os cientistas desconhecem os mecanismos exatos que estabelecem os nichos (OKAMOTO e YARAK, 2010).

No modelo de fusão proposto em alguns experimentos, as células regeneradas apresentaram, ao mesmo tempo, marcadores do receptor e do doador, sugerindo assim que as células-tronco do doador poderiam se fundir com as do receptor. No entanto as células mantêm o número correto de cromossomos da espécie o que contraria a possibilidade de ocorrência de fusão celular. Assim, não há consenso sobre este mecanismo de funcionamento, mas também não há registro de resultado negativo ou deletério (CIRNE-LIMA, 2007). Sabe-se apenas que deve ser estabelecido um protocolo de tratamento adequado para cada doença/situação levando-se em consideração as possíveis vias de ação estudadas até o momento.

As células-tronco mesenquimais possuem características imunomoduladoras e imunossupressoras, que ampliam as possibilidades de utilização terapêutica. Elas secretam uma grande variedade de citocinas pró e antiinflamatórias e fatores de crescimento. Por meio dessas moléculas bioativas, proporcionam a modulação da resposta inflamatória, o restabelecimento do suprimento vascular e a reparação adequada do tecido, contribuindo para a homeostasia tissular e imunológica. São, ainda, capazes de inibir alguns tipos de linfócitos-T e lhes falta certas moléculas co-estimuladoras, como antígenos de compatibilidade classe II,

CD40 e CTLA-419, provavelmente pela secreção parácrina de fatores como fator de crescimento tumoral-beta (TGF-beta) ou fator de crescimento de hepatócitos (HGF), diminuindo o número de componentes de imunorreconhecimento no nível celular. Dessa forma, possibilitam a administração de um produto alogênico sem a necessidade de terapia supressora. Em consequência disso, poderia ser criado um banco de células de doadores jovens e saudáveis, caracterizadas e processadas de forma uniforme e validadas quanto a sua potência e segurança. Para atingir esse objetivo, é importante direcionar as pesquisas para a homogeneidade e a reprodutibilidade lote a lote (SCHUSTER, 2008).

Para compreender melhor a utilização de células-tronco na reparação de tecidos, é preciso ainda estudar o funcionamento das células-tronco *in-vivo*. Os métodos utilizados até o momento incluem a marcação celular com a utilização de nanopartículas ultramagnéticas, marcadores radioativos, marcador orgânico carreado pela célula e proteínas fluorescentes expressas pelas células. Porém a estabilidade desses marcadores ainda é comprometida por reações químicas e metabólicas. Outra alternativa em estudo para a localização e verificação das células transplantadas durante os experimentos é a utilização de células-tronco de um doador macho, que apresentará um cromossomo Y, no tratamento de fêmeas, cujos cromossomos são XX (GIANOTTI, 2011).

7. MIOBLASTOS

O sucesso da regeneração depende da extensão e da natureza da lesão. No entanto, em todas as situações o processo envolve: revascularização; infiltração de células inflamatórias; remoção dos componentes celulares através da fagocitose; proliferação, em seguida de fusão das células satélites para a formação de novos miotúbulos e fibras musculares; e finalmente a reinervação e a recuperação da função muscular (FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004; MOURA; RICCI, 2006).

As células-satélites, células responsáveis pela regeneração muscular, são mononucleadas e fusiformes e estão dispostas paralelamente às fibras musculares, dentro da lâmina basal que as envolve. Consideradas mioblastos inativos, após uma lesão ou outro estímulo como crescimento ou remodelamento, as células-satélites tornam-se ativas, proliferam por divisão mitótica e expressam marcadores da linhagem miogênica. Estas também entram em mitose, quando o músculo é submetido a exercício intenso, neste caso elas se fundem com as fibras musculares preexistentes, contribuindo para a hipertrofia do músculo (BISCHOFF, 1990; GROUNDS et al, 2002; MONTARRAS, 2005).

Nos mamíferos, as células-satélites constituem cerca de 30% dos núcleos no músculo do neonato e decrescem para cerca de 4% no adulto e 2% no idoso. Com o envelhecimento ocorre aumento do número de mionúcleos e decréscimo no número de células-satélites, sendo que este número também depende da espécie e do tipo de fibra muscular (GROUNDS, 2002; FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004). Em animais velhos, ocorre diminuição da capacidade de cicatrização das fibras musculares, demonstrando que existe uma diminuição do potencial de regeneração com o avanço da idade (MONTARRAS, 2005; SHI; GARRY, 2006; JACKSON; NESTI; TUAN, 2010).

Além das células-satélites, o músculo estriado esquelético possui outra população de células-tronco que é capaz de gerar miócitos ou células-satélites após transplante intramuscular, mas não conseguem fazê-lo *in vitro*. Esta hipótese é sustentada primeiramente pela capacidade de formação de músculo, após transplante de células-tronco músculo-derivadas em camundongos. Além disto, estas células se encontram em posições de células-satélites nas fibras musculares receptoras. São denominadas células periféricas, expressam um marcador de células-tronco hematopoiéticas, e após serem transplantadas podem se diferenciar em fibras musculares, células hematopoiéticas ou células satélites, participando

desta forma da regeneração muscular (ASAKURA, 2002; ZAMMIT et al., 2004; SHI; GARRY, 2006; JACKSON; NESTI; TUAN, 2010).

Pelo seu importante papel na regeneração muscular, os mioblastos são isolados, cultivados e transplantados *in vivo* para tratamento de grandes defeitos musculares. Essas células precursoras também estão sendo utilizadas na engenharia de tecidos para construção de músculos artificiais *ex vivo*, com o objetivo de transplantá-los (GROUNDS et al., 2002).

Há duas formas de condução dos estudos na engenharia de tecido muscular. Na primeira, as células-satélite autólogas são recolhidas por biópsia, expandidas e diferenciadas em um ambiente com três dimensões *in vitro*, em um biorreator artificial e, após a diferenciação, são reimplantadas no novo tecido (engenharia de tecido *in vitro*) (LIAO; ZHOU, 2009). A segunda forma gera e expande as células-satélites *in vitro* e as recoloca no organismo em uma matriz de transporte que permitirá a diferenciação em miotúbulos *in vivo* (terapia de transferência de mioblastos) (LIAO; ZHOU, 2009; AYELE et al, 2010).

O processo de formação da nova musculatura requer que os mioblastos tornem-se ativos, proliferem, diferenciem-se e fundam-se para formar as novas células musculares multinucleadas, chamadas miotúbulos. Por sua vez, os miotúbulos vão sofrer uma nova diferenciação e, ao serem inervados formarão o músculo funcional (GROUNDS et al, 2002).

8. MEMBRANAS BIOLÓGICAS DESCELULARIZADAS ASSOCIADAS À TERAPIA CELULAR

A engenharia de tecidos é uma área científica multidisciplinar que pretende mimetizar a geração de órgãos, utilizando a cultura de células para a reconstrução da estrutura de um tecido (LIAO; ZHOU, 2009; AYELE et al, 2010). Doenças como a distrofia muscular, assim como lesões traumáticas, ablações agressivas de tumores, atrofia muscular espinhal e denervações prolongadas resultam em grande perda muscular e a consequente necessidade de reconstrução cirúrgica (ALDER; BELLOWS; HELTON, 2006; LIAO; ZHOU, 2009; AYELE et al, 2010). Enquanto a restauração de tecidos como pele, cartilagem e osso já é utilizada na prática clínica, a criação de tecido muscular promete ser uma realidade futura (LIAO; ZHOU, 2009) e constitui uma alternativa para o tratamento de uma grande variedade de afecções deste tecido.

Para o desenvolvimento do tecido muscular, é necessário respeitar características estruturais e funcionais deste tecido, como alinhamento paralelo das miofibrilas com filamentos de miosina e actina, armazenamento celular de cálcio e receptores de acetilcolina, que são necessários para criar força direcionada e funcionalidade. O novo tecido deve ser biocompatível, integrar e regenerar o tecido perdido e deve ser inervado e vascularizado (LIAO; ZHOU, 2009).

Assim, é possível utilizar várias fontes de células precursoras da musculatura como (1) células-satélites de miofibras; (2) vários tipos de células de origem externa à miofibrila, como as células-tronco mesenquimais; (3) mionúcleos “pós-mitóticos” do interior do sarcoplasma de miofibras que entrarão novamente no ciclo da célula (FIGURA 6) (GROUNDS, 2002).

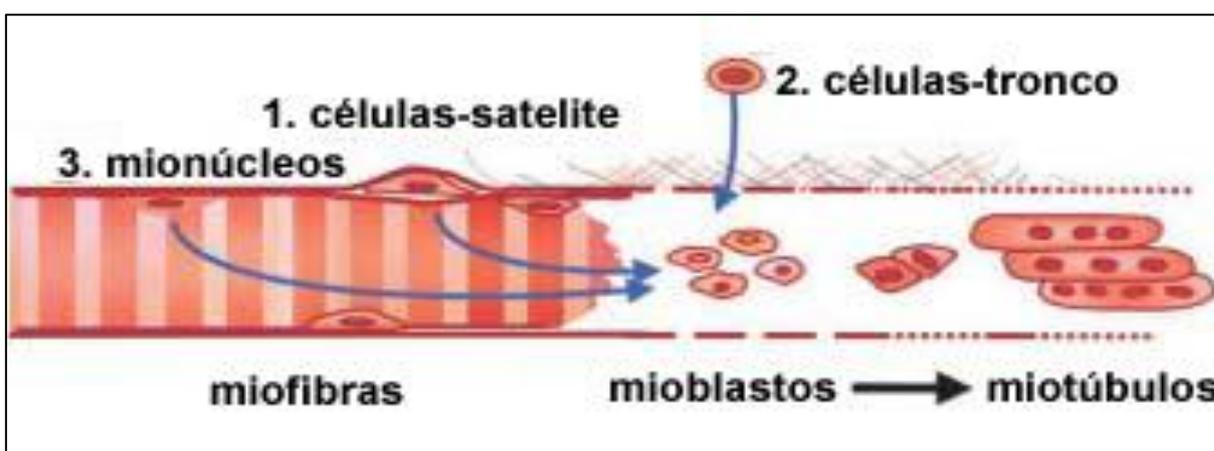


Figura 6 - Origens alternativas de mioblastos no tecido muscular. Fonte: GROUNDS, 2002. (Adaptado por VIDOR, S. B., 2012)

Um dos grandes obstáculos para a formação do novo tecido muscular é a falta de um suporte adequado para as células expandidas. Um ponto crítico na engenharia do músculo esquelético é a identificação desse arcabouço ótimo, capaz de promover a diferenciação e a maturação dos mioblastos em miotúbulos e em miofibras. Para solucionar este problema, várias pesquisas tentam desenvolver suportes sintéticos ou biológicos para as células implantadas (CONCONI et al, 2004).

Materiais sintéticos, como o politetrafluoretileno, são utilizados na rotina de reparo da parede abdominal. Contudo, esses materiais não permitem o crescimento celular e, nos casos de falhas congênitas, não seguem o crescimento dos pacientes. Por outro lado, as evidências comprovam que os materiais biológicos podem servir como suporte *in vivo* e *in vitro* para a adesão e a proliferação das células (CONCONI et al, 2004).

Vários estudos avaliam a utilização de membranas biológicas no reparo de defeitos da parede abdominal relatando resultados interessantes, como: diminuição da dor no pós-operatório, do tempo de recuperação e da taxa de recorrência. Estas membranas também possibilitam a substituição do implante por tecido fibroso, contudo sem haver regeneração do tecido muscular. Para isto, é necessário contar com a tecnologia da engenharia de tecidos, ou seja, possibilitar a regeneração do músculo esquelético, combinando células precursoras, como as células-satélites, os mioblastos e as células-tronco com os arcabouços naturais (AYELE et al, 2010).

8.1 Membranas biológicas associadas a mioblastos

8.1.1 Túnica vaginal bovina com mioblastos

Ayele e colaboradores (2010) utilizaram mioblastos associados à túnica vaginal bovina para reparo da parede abdominal de coelhos. As membranas foram descelularizadas com processo de congelamento, a -80o C e a -40 o C, e posteriormente esterilizada por raios gama. Os mioblastos utilizados foram marcados com vermelho fluorescente PKH26 (Sigma, EUA) e cultivados *in vitro* com túnica vaginal bovina durante cinco dias. Para ter certeza do sucesso do co-cultivo, os mioblastos foram escaneados no 1º, 3º e 5º dias deste processo (AYELE et al, 2010).

O grupo tratado com mioblastos apresentou neoperitonialização mais cedo que o grupo controle, neovascularização muito superior e melhores propriedades mecânicas da parede abdominal. Não houve aderência nas membranas do grupo de tratamento, o que

poderia ser explicado pela rápida peritonialização. A resposta inflamatória foi grande nos primeiros sete dias, correspondendo à fase inflamatória da regeneração muscular. Após este tempo, a reação inflamatória diminui progressivamente. Também não houve reação de corpo estranho no grupo tratado, o que sugere a biocompatibilidade do implante (AYELE et al, 2010).

Os mioblastos marcados foram encontrados em toda superfície do implante aos sete dias de pós-operatório. No 14º dia, foram detectados miotúbulos multinucleados e no 30º dia, foi encontrado o dobro de células marcadas, o que demonstra que houve desenvolvimento dos mioblastos semeados no implante in vivo (AYELE et al, 2010).

8.1.2 Matriz muscular descelularizada com mioblastos

Já que a matriz muscular descelularizada já suporta o crescimento e a diferenciação de mioblastos in vitro, Conconi e colaboradores testaram esta membrana enzimaticamente descelularizada, semeada com mioblastos e posicionada entre os músculos abdominais oblíquos de ratos de um dia de idade. Trinta dias após as cirurgias, as membranas haviam sido completamente substituídas por tecido fibroso in vivo, com neovascularização e formação de miotúbulos com atividade elétrica, semelhantemente a Ayele et al (2010) e Zhao et al (2011). Até os 60 dias de pós-cirúrgico, a estrutura de mioblastos semeados manteve-se e muitas células multinucleadas foram observadas. Além disso, a presença de unidades motoras, isoladas ou agrupadas, responsivas a descargas elétricas, pode sugerir o desenvolvimento de miofibras (CONCONI et al, 2004).

No terceiro mês, contudo, houve uma perda das fibras contráteis e o arranjo funcional e morfológico das células implantadas involuíram, indicando uma provável perda de miofibras. Essas alterações podem ser explicadas por vários fatores. O músculo é um tecido muito bem organizado, composto por longos feixes de fibras densas e orientadas. Apresenta uma rede de capilares muito rica e muito importante para o suprimento de oxigênio e de nutrientes, fundamentais para o metabolismo das miofibras (CONCONI et al, 2004).

Outros autores já haviam relatado que, com o aumento da densidade celular e do tamanho das células, a taxa de consumo de oxigênio do novo tecido aumenta, enquanto a difusão do oxigênio não acompanha esse crescimento. Sem o suprimento adicional pela rede de capilares, o resultado deste processo é a necrose de áreas do novo tecido. Assim Conconi e colaboradores atribuem a perda de tecido muscular, aos 90 dias de pós-cirúrgico, ao

insuficiente crescimento da rede de capilares sanguíneos. Outra hipótese levantada grupo de pesquisa seria a regeneração inadequada do tecido nervoso e consequente atrofia das novas miofibras (CONCONI, 2002).

8.2 Membranas biológicas associadas a células-tronco mesenquimais

8.2.1 Pele descelularizada com células-tronco mesenquimais

Como as telas sintéticas podem ser facilmente infectadas, não se constituem em um bom ambiente para crescimento celular e estão associadas a altas taxas de recorrência. Assim, ZHAO e colaboradores optaram pela utilização de um biomaterial absorvível que vem sendo testado na Medicina humana, a pele descelularizada, no reparo de hérnia abdominal induzida em coelhos (ZHAO et al, 2011).

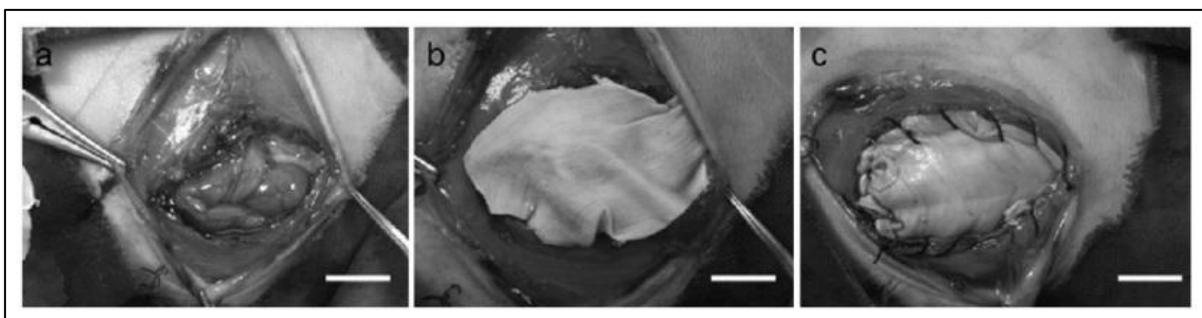


Figura 7 - Implante de membrana de pele descelularizada com células-tronco. (a) defeito realizado cirurgicamente (2 cm X 3 cm); (b) implante de pele descelularizada posicionado; (c) implante suturado com padrao simpls contínuo. Fonte: ZHAO et al, 2011.

O grupo de pesquisa optou por associar células-tronco mesenquimais à pele descelularizada, porque os estudos indicam a melhor regeneração do tecido quando estas células são adicionadas ao implante natural. Já que células-tronco mesenquimais apresentam uma grande capacidade de replicação e são capazes de diferenciar-se em vários fenótipos como osso, cartilagem, músculo e outros tecidos conectivos, podem auxiliar no processo de regeneração proposto (ZHAO et al, 2011).

A descelularização das membranas, assim como Ayele e colaboradores, foi realizada com congelamento a -80°C , com adicional tratamento enzimático e liofilização. As membranas foram co-cultivadas com as células-tronco mesenquimais durante sete dias. As células foram adicionadas às membranas em três momentos diferentes (ZHAO et al, 2011).

Aos 60 dias, nenhum dos animais que recebeu o implante com células-tronco apresentou herniação, ao contrário de todos os animais do grupo controle. Como em estudo de

Ayele e colaboradores (2010), os animais do grupo de tratamento também apresentaram menos aderências entre a parede abdominal e a pele e entre o implante e as vísceras. Enquanto o grupo controle apresentou aderência de toda superfície do implante. A resistência mecânica foi menor do que a musculatura normal da parede abdominal, porém foi maior que a do implante do grupo sem células (ZHAO et al, 2011).

No grupo com células, o peritônio mostrou-se totalmente regenerado aos 60 dias, enquanto o grupo sem células apresentou uma formação peritonial pobre. No grupo com células houve regeneração e infiltração das células-tronco no implante e adicionalmente foi registrada a formação de feixes musculares. Assim como Ayele e colaboradores, a neovascularização foi significativamente maior no grupo de tratamento e as células marcadas foram encontradas do tecido regenerado até dois meses após o implante (ZHAO et al, 2011).

A membrana construída apresentou boa compatibilidade e propriedades biomecânicas com regeneração tecidual, não havendo ocorrência de hérnia. Não houve complicações, como as relacionadas à utilização de telas sintéticas: infecção, fistulação, falha do reparo, aderência ou fibrose acentuada. A não ocorrência de reação de corpo estranho comprova que descellularização ocorreu eficientemente (ZHAO et al, 2011).

Parece ser consenso que as membranas naturais apresentam biocompatibilidade com o organismo dos animais que recebem os implantes, porém essas mostram-se incapazes de estimular a proliferação celular suficiente para a regeneração do tecido muscular. A adição de células precursoras a esses implantes biológicos vem completar a sua funcionalidade, contribuindo positivamente na proliferação das células musculares. Assim, os resultados apontam para a necessidade de continuidade com esses estudos, a fim de compreender e desenvolver novos tratamentos que possam ser utilizados na reparação de grandes perdas musculares.

9. CONCLUSÃO

As hérnias incisionais são afecções importantes tanto pela dificuldade de seu tratamento, com altas taxas de insucesso, quanto pela incapacitação imposta aos pacientes. O uso de telas ou próteses pode diminuir a taxa de recorrência dos reparos das hérnias incisionais. No entanto, a utilização de materiais sintéticos é passível de complicações como a formação de aderências, dor e infecções crônicas. A utilização alternativa de implantes compostos de membranas naturais pode diminuir estas complicações. Porém, este tratamento não é suficiente para alcançar a regeneração muscular, causando apenas a cicatrização pela deposição de tecido conjuntivo fibroso.

As células-tronco mesenquimais, por sua natureza multipotente, sua plasticidade e a sua característica anti-imunogênica são capazes de reduzir a reação inflamatória ao implante e subsequentemente todas as consequências da inflamação exacerbada, como a aderência, a fibrose e a dor pós-operatória.

A multiplicação e a diferenciação das células adicionadas aos implantes, sejam elas mioblastos ou células-tronco mesenquimais, torna real a possibilidade de obtermos nos próximos anos uma reconstrução muscular efetiva. Ainda, a potencialização da atividade angiogênica, também induzida pelas células-tronco, permite a eficiente remoção dos debris celulares, a oxigenação e a nutrição do novo tecido e a eficiente infiltração das células de defesa para prevenção de infecção.

A engenharia de tecidos, com a utilização de membranas biológicas associadas a células-tronco, demonstra ser capaz de criar no futuro um implante absorvível com um grande número de células com capacidade regenerativa. E dessa forma, possibilitar o tratamento mais apurado das hérnias e de outras doenças ou lesões traumáticas que apresentem grande perda de massa muscular.

Para atingir esses objetivos, ainda são necessárias novas investigações e padronização na experimentação com esses biomateriais, a fim de definirmos, quem sabe, um padrão de protocolos de descelularização das membranas, de detecção das células implantadas e dos tipos de membranas testadas. Ainda, apesar de haverem diversos estudos sobre a terapia celular, principalmente quando se refere às doenças sem ou de difícil tratamento, o problema de pesquisa é amplo e envolve muitas variáveis como a origem e o tipo de células da terapia, a

quantidade, os mecanismos de ação envolvidos, os cenários clínicos ideais e as complicações a longo prazo.

Ainda não são conhecidos todos os fatores envolvidos no controle da autorrenovação e da diferenciação celular e seus efeitos crônicos in vivo. Desta forma, é importante investir na experimentação animal exaustiva para atingir segurança e eficácia dos procedimentos clínicos futuros na medicina e na medicina veterinária.

REFERÊNCIAS

- ACAMPORA, A. J., JOLI, F. S., TRAMONTE, R. Expanded polytetrafluoroethylene and polypropylene in the repairing of abdominal wall defects in Wistar rats. Comparative study. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 409 – 415, 2006
- AYELE, T. Tissue engineering approach to repair abdominal wall defects using cell-seeded bovine tunica vaginalis in a rabbit model. **J Mater Sci : Mater Med.** n. 21, p. 1721-1730, 2010.
- ALDER, A.; BELLOWS, C. F.; HELTON, W. S. Abdominal wall reconstruction using biological grafts: present status and future opportunities. **Expert Review of Medical Devices**, v. 3, n. 5, p.657 – 681, 2006
- ARAÚJO U. R. M. et al. Escolha do material da tela para disposição intra-peritoneal na correção cirúrgica de defeitos herniários da parede abdominal. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.** v. 22, n. 2, p. 118 – 121, 2010
- AVELLA, D. et al. Human acellular dermal matrix: na innovative tool for diaphragmatic reconstruction in patients with large intra-abdominal tumors. **The American Journal of Surgery**, v. 199, p. 12 – 16, 2010
- ASAKURA, A. et al. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. **The Journal of Cell Biology.** v. 159, n. 1, p. 123-134, 2002.
- BANKS W. J., In: Banks, W.J. **Histologia veterinária Aplicada.** São Paulo: Manole, 1992.
- BASTOS, E. L. S. et al . Peritônio bovino conservado na correção de hérnia ventral em ratos: uma alternativa para tela cirúrgica biológica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.** v. 32, n. 5, p. 256-260, Sept./Oct. 2005.
- BONDAN, E.F.; LALLO, M.A. Fisiologia da contração muscular esquelética. In: **Fisioterapia Veterinária.** São Paulo: Manole, 2006. 242p. Cap. 5. p.34-48.
- BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; DE OLIVEIRA, A. P. E; DEFFUNE, E. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea **Acta Ortop Bras.** v. 14, n. 1, p. 22-24, 2006.
- BISCHOFF, R. Interaction between satellite cells and skeletal muscle fibers. **Development.** v. 109, n. 4, p. 943-952, 1990.
- BRUN, M.V. ; et al. Solução hipersaturada de sal como conservante de pericárdio canino utilizado na reparação do músculo reto abdominal de ratos Wistar. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.1019-1025, 2002
- BRUN, M.V. et al. 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**, vol.34, no.1, p.147-153, 2004.

- CARVALHO, Z. M. et al . Incisional hernia: an experimental model in rabbits. **Acta Cir. Bras.** São Paulo, v. 16, n. 2, 2001.
- CIRNE-LIMA, E. O. Stem Cells. **Rev. HCPA**, Porto Alegre, v. 27, n. 3, p. 66 -73, 2007
- CUNNINGHAM, J.G.;KLEIN, B.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 4ª ed., 2008. Cap.6, p.81 – 83.
- CHEVREL, J. P, RATH, A. M. Classification of incisional hernias of the abdominal wall. **Hernia**, 2000, n. 4, p. 7-11.
- CONCONI M. T. et al. Homologous muscle acellular matrix seeded with autologous myoblasts as a tissue-engineering approach to abdominal wall-defect repair. **Biomaterials**, v. 26, p. 2567 – 2574, 2005
- CONTESINI, E. A., et al. Implante de traquéia de Gallus domesticus na microanastomose arterial em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 32, n. 2, p.89-95, 2004
- CONTESINI, E.A.; SCHOSSLER, J.E.W. Hernioplastia abdominal com implante de centro frênico heterólogo em felino-relato de caso. **Arquivo Ciência Veterinária Zoologia**, v.6, n.2, p.145-148, 2003.
- CONTESINI, E. A. et al. Aspectos clínicos e macroscópicos da palatoplastia imediata com implante de cartilagem da pina articular, conservada em glicerina a 98%, após indução experimental de fenda palatina em cães. **Ciência Rural**, v. 33, n. 1, p. 103-108, 2003.
- CONTESINI, E.A. et al. Reparação traqueal em cães: transplante autógeno vs implante homogêneo conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pina. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 633-637, 2001.
- CRISOSTOMO, P. R.; et al. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. **Surgery**. n. 143, v. 5, p. 577–581, 2008.
- DALECK, C.R. et al. Esofagoplastia cervical no cão com peritônio autólogo ou homólogo conservado em glicerina: estudo experimental. **Ciênc. Vet.**, v.2, p.1-2, 1988
- DOLCE, C. J.; et al. Pushing the envelope in biomaterial research: inicial results os prosthetic coating with stem cells in a rat model. **Surg. Endosc.** n. 24, p.2687-2693, 2010.
- FOSCHINI, R. M. S. A., RAMALHO, F. S. e BICAS, H. E. A. Células satélites musculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**. v. 67, n. 4, p. 681-867, 2004.
- FOSSUM, T. W. Cirurgia da cavidade abdominal – Hérnias umbilicais e abdominais. In: Fossum, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. Roca: São Paulo, 2 ed., 2005. cap. 15, p. 205-208.
- GAMBA, P. G. et al. Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. **Pediatr Surg Int**, v. 18, p. 327 – 331, 2002

GEORGE, C. D; ELLIS, H. The results of incisional hernia repair: A twelve-year review. **Ann R Coll Surg Engl**, 68 (1986), pp. 185–187

GIANLUPI A., TRINDADE, M. R. M. Comparação entre o uso do 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**. São Paulo, v. 19, n.2, p. 145 – 156, 2004

GIANOTTI, W. K. B. **Células-tronco mesenquimais e eletro acupuntura na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos**. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011

GRECA, F. H. et al. Submucosa de intestino delgado no reparo de defeito em parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**. vol. 19, n. 5, p. 471-477, 2004.

GUIMARÃES G. C. et al. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Biosci. J.**, Uberlândia, v.23, n.3, p.120 – 127, jul./set., 2007

HOSGOOD, D. G. Wound repair and specific tissue response. In: Slatter, D. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 3 ed.,2002. cap. 4, p. 66-86

KIM, H.; BRUEN, K.; VARGO, D. Acellular matrix in the management of high-risk abdominal wall defects. **The American Journal of Surgery**, n. 192, p. 705 – 709, abr. 2006

KRAUS, K. H. Hérnias In: Bojrab, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 3 ed., 1996. cap. 34, p. 410-424.

JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Potencial therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. **Expert Opin Biol**, 2010, v. 10, n.4, p. 505-517, abr. 2010

JOHNSON, A.L.; HULSE, D.A. Tratamento de Lesões ou Doenças Musculares e Tendinosas. In: **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2005. 1390p. Cap. 36. p. 1149-1159.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO J., In: Junqueira & Carneiro. **Histologia básica**. São Paulo: Guanabara Koogan, 9 ed., 1999.

KRAUS, K. H. Hérnias In: Bojrab, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 3 ed., 1996. cap. 34, p. 410-424.

LAMPERT, J. N. et al. Repair of abdominal wall defects with bovine pericardium. **The American Journal of Surgery**, n. 198, p. 60 – 65, 2009

LIAO, H.; ZHOU, G. Q. Development and progress of engineering of skeletal muscle tissue. **Tissue engineering**. 15 (3): 319 – 331, 2009

- MAKELA J. T. et al. Factors influencing wound deiscence after midline laparotomy. **Am J Surg**, 1995; 170: 387-90
- MANN, C. J. et al. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v. 10, p. 1- 21, 2011
- MAZZANTI, A.; et al. Reparação do diafragma de cães com segmento muscular homólogo ortotópico conservado em solução supersaturada de açúcar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53 n.1, 2001.
- MAZZOCHI, M., et al. “Component separation” technique and panniculectomy for repair of incisional hernia. **American Journal of Surgery**. v. 201, n. 6, p. 776 – 783, jun, 2011
- MEFIRE, A. C.; GUIFO, M. L. Don't be scared: insert a mesh. **Pan African Medical Journal**. V. 10, n. 18, 2011
- MONTARRAS, D. et al. Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. **Science**. v. 309, p. 264-267, 2005.
- MOURA, N. L., RICCI, M. C. Estudo teórico do processo de regeneração do tecido muscular esquelético lesionado. **Anais de trabalhos completos - X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba. 2006, p. 764-767.
- MILLIKAN, K. M. Incisional hernia repair. **Surg Clin N Am**, 2003; 83: 1223-1234
- MILLIS, D.L.; LEVINE, D.; TAYLOR R.A. Canine rehabilitation Physical Therapy**. St. Luis: Elsevier, 2004. 526 p. 105 - 116
- NARDIN B., MEIRELLES L.S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. In: Wobus, A. m.; Boheler, K. **Stem cell**, 2006, 174 p. 249–282.
- NESTI, L.J; et al. Differentiation potencial of multipotent progenitor cells derived from war-traumatized muscle tissue. **J Bone Join Surg Am**. n. 90, p. 2390-2398, 2008
- NGO, M. D. et al. Evaluation of human acellular dermis versus porcine acellular dermis in na in vivo model for incisional hernia repair. **Cell Tissue Bank**, v. 12, p. 135 – 145, 2011
- OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A.H., Perspectivas em terapia células: células-tronco. **Einstein** v.2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- OKAMOTO, O. K., YARAK S. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **An Bras Dermatol**. v. 5, n.85, p. 647-56, 2010.
- PAULO, D. N. S. et al . Experimental models of longitudinal abdominal incisional hernia in rats. **Acta Cir. Bras.** , São Paulo, v. 12, n. 4, 1997.
- OLIVEIRA, L. L. et al. Métodos de preservação de membranas biológicas para uso cirúrgico. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.2, n.3, p. 175 – 188, 2009

OLIVEIRA, T. C. et al, Citoplastia experimental em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com peritônio bovino conservado em glicerol a 98%. **Ciência Rural**, Snata Maria, v. 38, n. 8, p. 2218 – 2224, nov, 2008

Phinney DG, Kopen G, Righter W et al. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. **J Cell Biochem** 1999;75:424–436

PINTO, C. E. C. **Análise da casuística das afecções cirúrgicas observadas, segundo o aparelho corpóreo analisado, no período de 1988 a 2007 na clínica cirúrgica de pequenos animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 2009. 108 f. Dissertação (Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, 2009

PROBST, C.W. Cicatrização das Feridas e Regeneração de Tecidos Específicos. In: **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 1998. xxp. Cap. 4. p. 66-78.

PUTTINI, S. M. B. **Avaliação da resposta inflamatória desencadeada pelas telas de polipropileno e politetrafluoretileno expandido implantadas no espaço intraperitoneal. Estudo experimental em camundongos**. 2006. 79 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2006

RAISER, A.G. Regeneração tecidual. In: **Patologia Clínica Veterinária**. Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1995. Cap. 5. p. 115-195.

RAISER, A. G. Hérnia pós-incisão em cães e gatos. **Ciência Rural**. v. 29, n. 4, p. 689-695, 1999.

READ, R. A.; BELLENGER, C. R. Hérnias. In: Slatter, D. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 3 ed.,2002. cap. 31, p. 529-533.

ROUSH, J. K. Biomateriais e implantes cirúrgicos. In: Slatter, D. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 3 ed.,2002. cap. 9, p. 141-148.

SHI, X.; GARRY, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. **Genes & Development**. v. 20, n. 13, p. 1692-1708, 2006.

SILVA, L. A. F. et al. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 61, n. 3, p. 606 – 612, 2009

SILVEIRA et al. Cadaver as na experimental model for the study of midline incisional hernia. **Acta Cir. Bras**, 2012. vol. 26, n. 4.

SINGH, J. et al. Acellular biomaterials of porcine origin for the reconstruction of abdominal wall defects in rabbits. Trends Biomater. **Artif. Organs**, v. 22, n. 1, 2008

SUKKAR et al. Challenging abdominal wall defects. **The American Journal of Surgery**, 2001. vol. 181, p. 115-121.

SMEAK, D. D. Hérnias Abdominais. In: Slatter, D. **Textbook of small animal surgery**. Philadelphia: Saunders, 3 ed., 2002. cap. 36, p. 533-559.

STAINKI, D. R. et al. Emprego de enxerto biológico na reconstrução de ferida experimental no esôfago cervical de ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 53, n. 4, ago, 2001

VIDINSKY B. et al. Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. **Acta Vet.**, 2006, n. 75, p. 197 - 202

ZAFAR et al. Emergency incisional hernia repair: a difficult problem waiting for a solution. **Ann Surg Innov Res**. 2012; 6:1

ZAMMIT, P. S. et al. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?. **The Journal of Cell Biology**. v. 166, n. 3, p. 347-357, 2004.

ZHAO, Yilin; et al. Abdominal hernia repair with a decellularized dermal scaffold seed with autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Artificial Organs**. n. 10, p. 1525-1594, 2011.

ZIMMERMANN, M.; et al. Membranas de látex natural na herniorrafia diafragmática experimental em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1476-1483, 2008.

YOSHIMOTO, M. et al. Two Different Roles of Purified CD45⁺c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻ Cells After Transplantation in Muscles. **Stem Cells**. v. 23, p. 610-618, 2005.