

HISTOPATHOLOGICAL ALTERATIONS RESULTING FROM SUBCUTANEOUS IMPLANT OF COLLAGEN AND AUTOLOGOUS APONEUROTIC FASCIA: A COMPARATIVE STUDY IN DOGS

PAULO C.R. PALMA, PAULO C. MARQUES, BENEDICTO C. VIDAL,
CÁSSIO L.Z. RICCETTO, MÍRIAM DAMBROS, NELSON R. NETTO JR.

Division of Urology, School of Medicine, State University of Campinas, Unicamp, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Objective: To compare the tissue reaction when a collagen strip and an autologous aponeurotic fascia are subcutaneously implanted in dogs.

Materials and Methods: An experimental study was conducted on six female adult dogs. Three fragments of the aponeurotic fascia measuring 1.5 cm x 0.5 cm was removed from the dog and subcutaneously implanted in the abdominal wall of the same animal along with three collagen strip having the same measurements. Collagen type I was produced in this institution's Biology Laboratory from bovine tendons and underwent high purification in order to eliminate immunogenic telopeptide portions. The implant receptor regions underwent biopsy at 7, 30 and 90 days after the procedure and were histologically assessed using hematoxylin and eosin stained slides to verify the presence of inflammatory cells and to conduct a birefringent study to check for evidence of neoformed collagen.

Results: Seven days after implant, a histological assessment showed the presence of mononuclear and histiocytic cells in both the collagen and autologous fascia receptor regions. Thirty days later, neovascularization was observed proximal to the collagen fragment and neof ormation of collagen had taken place. Intense fibroblastic infiltration was observed in the autologous fascia region. After 90 days, the implanted collagen was totally substituted by fibrous tissue (the birefringent study did not indicate the presence of collagen fibers) and the aponeurotic fascia was partially absorbed leaving an identifiable aponeurotic strip surrounded by fibrosis.

Conclusion: The data obtained demonstrated that purified type I collagen presented low inflammatory reaction with the implant being totally reabsorbed after 90 days and substituted by fibrous tissue. After the same period of observation, the autologous fascia was also surrounded by fibrosis but the implant did not totally disappear.

Key words: prostheses and implants; sling; collagen; histology

Braz J Urol, 27: 171-177, 2001

INTRODUÇÃO

A incontinência urinária de esforço na mulher é patologia freqüente, afetando principalmente mulheres após a menopausa (1). As opções terapêuticas cirúrgicas apresentam resultados diversos, variando de acordo com as características do grupo avaliado. Várias técnicas, inicialmente utilizadas com entusiasmo, entraram em desuso devido a complicações e recidiva da incontinência (2).

A correção cirúrgica da incontinência urinária de esforço através do sling pubovaginal, utilizando-se diferentes materiais autólogos ou artificiais, tem sido utilizada desde 1910 (3). Diferentes séries têm demonstrado resultados duradouros utilizando-se esta modalidade terapêutica (4-6).

A utilização de material autólogo para confecção do sling pubovaginal, embora com resultados satisfatórios (7), pode apresentar dificuldades na sua obtenção. Eventualmente, torna-se necessá-

ria uma incisão abdominal ampla, principalmente nas pacientes com várias incisões prévias no abdome inferior, aumentando assim a dor no pós-operatório. Para conferir características minimamente invasivas a este procedimento cirúrgico, surgiram os materiais sintéticos que incluem a utilização de polipropileno, dacron, silastic e material animal não sintético como a derme de porco e fáschia de boi (1). Entretanto, o uso destes materiais tem sido associado ao aumento dos índices de infecção e erosão na bexiga e uretra (8).

Os autores propõem a utilização de uma faixa derivada do colágeno, com propriedades biológicas similares à aponeurose muscular. Neste estudo demonstramos a reação tecidual local com faixa de colágeno em comparação à aponeurose autóloga.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo prospectivo, envolvendo 6 cães fêmeas, de raça indefinida, com idade média de 12 meses (variando de 10 a 14 meses). Os animais foram mantidos no biotério da Instituição, sob as mesmas condições climáticas (temperatura média de 22°C) e recebendo a dieta própria para idade.

Na véspera dos procedimentos cirúrgicos, todos os cães foram submetidos a banho e jejum de 12 horas. A anestesia foi realizada através da injeção intramuscular de solução de cloridrato de ketamina, na dose de 5 mg/Kg de peso. Os animais foram mantidos sob ventilação espontânea, com cateter de oxigênio nasal com fluxo de 2 l/min (9). Foi realizada imobilização do animal em decúbito dorsal, com abdução dos 4 membros, proporcionando exposição ideal do abdome. Imediatamente antes do procedimento realizou-se tricotomia do abdome e anti-sepsia cutânea, utilizando-se solução alcoólica de polivinil pirrolidona-iodo a 10%, seguida de colocação de campos estéreis delimitando a região a ser abordada.

O experimento constitui-se no implante de 6 fragmentos no subcutâneo da parede abdominal dos animais (Figure-1). Os fragmentos mediram aproximadamente 1.5 x 0.5 x 0.2 cm, sendo que 3 eram formados por colágeno preparado na Instituição e 3 oriundos de aponeurose do músculo reto do abdome retirado da região suprapúbica do animal. Para o im-

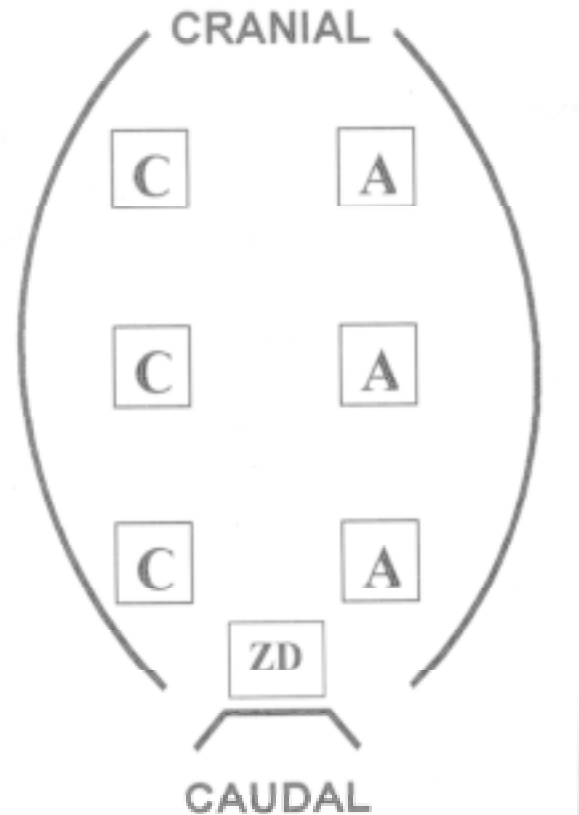


Figure 1 - Schematic drawing depicting the local of graft implantation in the subcutaneous abdominal wall of the dogs. C = collagen implant, A = autologous aponeurotic graft, ZD = donation zone of rectus abdominis aponeurosis.

plante do material foram feitas 6 pequenas incisões na pele do abdome e dissecado o tecido subcutâneo para colocação dos fragmentos que foram fixados no local através de um ponto, em uma das extremidades da faixa, com fio inabsorvível, para posterior identificação do local.

O colágeno utilizado neste estudo foi produzido no Laboratório de Biologia dos Colágenos I e II e Morfometria do Instituto de Biologia da Instituição, de acordo com técnica já descrita na literatura (10).

O preparado era composto de colágeno do tipo I obtido de tendões bovinos, constituído por duas cadeias alfa-1 e uma cadeia alfa-2, tratado através de técnica de alta purificação com a finalidade de eliminarem-se as porções imunogênicas telopeptídicas.

O processo de solubilização do preparado de colágeno consistiu na refrigeração por período de 24

Table 1 - Presence of lymph monocyte inflammatory process in different moments of biopsy after collagen and autologous fascia implantation.

Grade of Inflammation	Implanted Tissue					
	7 days	Collagen 30 days	90 days	Autologous Fascia 7 days	30 days	90 days
Absent						
Low		+	+		+	+
Moderate	+			+		
Intense						

+ = predominant cellular aspect in the histological analysis.

horas, dos tendões dissecados imersos em solução aquosa, contendo 0.01% de ácido clorídrico e 1 mg de pepsina por grama de tecido. O colágeno obtido era então reconstituído pela adição de solução de NaCl 0.9% até a concentração final de 5%. A seguir, esta solução era estabilizada através de diálise prolongada em água destilada, por período de 5 a 7 dias.

O objetivo deste procedimento foi obter um gel de colágeno com características biológicas, que visavam facilitar sua adesão ao endotélio e o preenchimento vascular completo, além de permitirem a injeção através de cateteres de fino calibre.

A esterilização do colágeno foi realizada através do método de irradiação com raios gama na dose de 2.5 Mrads, com o objetivo de preservar a estabilidade estrutural das moléculas (11).

Em 3 momentos diferentes, 7, 30 e 90 dias após o implante cirúrgico dos fragmentos, foram realizadas duas biópsias (duas regiões diferentes em cada procedimento), sendo uma delas em um dos locais receptor do colágeno e outra em um dos lo-

cais receptor da aponeurose. O material retirado foi fixado através da imersão imediata em formalina a 10%, por um período de 12 horas e, após cortes transversais de 3 mm de espessura, os fragmentos foram progressivamente desidratados com soluções de etanol em concentrações crescentes (70% até 100%) e a seguir imersos em solução de xilol e incluídos em parafina. Após esta etapa foram confeccionadas lâminas com 5 µm de espessura, coradas com hematoxilina e eosina.

A análise histológica teve por objetivo avaliar os seguintes parâmetros: presença de processo inflamatório linfomonocitário e granulomatoso e áreas de fibrose cicatrizais, a fim de detectar-se a biocompatibilidade do enxerto de colágeno e a indução de fibrose após o implante dos materiais. Para tanto, os parâmetros anatomopatológicos foram divididos em: ausente, leve, moderado e intenso, de acordo com a intensidade destes processos em cada animal. A fim de avaliar-se a presença de neoformação de colágeno nos materiais examina-

Table 2 - Presence of granulomatous inflammatory process in different moments of biopsy after collagen and autologous fascia implantation.

Grade of Inflammation	Implanted Tissue					
	7 days	Collagen 30 days	90 days	Autologous Fascia 7 days	30 days	90 days
Absent	+	+	+	+	+	+
Low						
Moderate						
Intense						

+ = predominant cellular aspect in the histological analysis.

Table 3 - Presence of scar fibrosis in different moments of biopsy after collagen and autologous fascia implantation.

Grade of Inflammation	Implanted Tissue					
	7 days	Collagen 30 days	90 days	7 days	Autologous Fascia 30 days	90 days
Absent						
Low						
Moderate	+	+		+	+	
Intense			+			+

+ = predominant cellular aspect in the histological analysis.

dos, foi utilizado análise dos mesmos através de birrefringência, com microscópio de luz polarizada, que possibilitou a identificação de colágeno neoformado.

RESULTADOS

Os resultados da análise microscópica dos parâmetros padronizados, relativos a cada área estudada nos diferentes momentos, encontram-se descritos nas Tables-1,2,3.

A análise histológica das amostras teciduais obtidas após 7 dias do implante, revelou um padrão celular semelhante na área receptora de colágeno e na receptora da fásia autóloga. Os tecidos implantados apresentaram migração moderada de células redondas, presença de partículas de hemossiderina no interior dos macrófagos, resultantes da fagocitose de hemácias e a presença, em todos os animais, de

células mononucleares, histiócitos e fibroblastos de intensidade moderada (Figures-2,3).

A avaliação da área receptora de colágeno, biopsiada após 30 dias do implante, detectou intensa neovascularização e moderada presença de fibroblastos e histiócitos nas proximidades do enxerto (Figure-4). Avaliação com microscópio de luz polarizada mostrou birrefringência, acusando neoformação de colágeno autólogo. Não se detectou presença de polimorfonucleares, necrose e células gigantes, demonstrando a biocompatibilidade do enxerto e ausência de resposta do tipo corpo estranho. A avaliação do local receptor da aponeurose evidenciou infiltração moderada de fibroblastos (Figure-5). Em ambas regiões não foram detectadas células relacionadas com processo inflamatório crônico.

O material coletado 90 dias após o implante do material evidenciou, na área com colágeno, completa substituição do implante por fibroblastos e va-

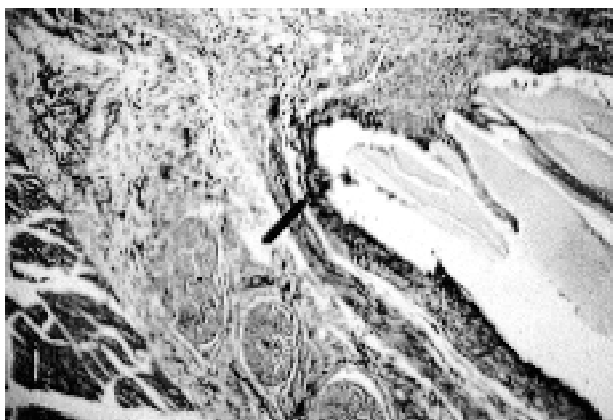


Figure 2 - The arrow points a region with round cells migration and absence of leucocytes – initial process of inflammation (HE, X100).



Figure 3 - Presence of round cells penetrating the region close to autologous fascia implantation (HE, X40).

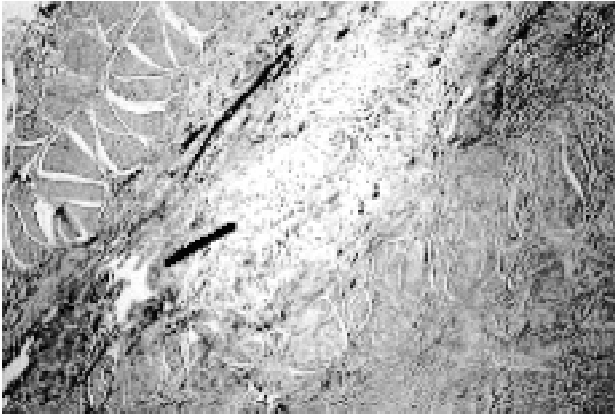


Figure 4 - The arrow points an area with fibroblasts and histiocytes – developing inflammatory reaction (HE, X400).

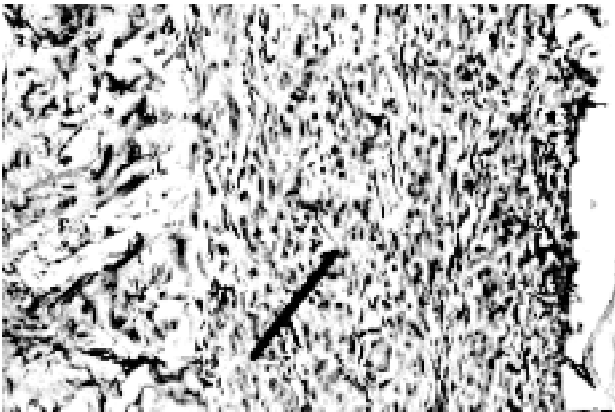


Figure 5 - Presence of fibroblasts, characterizing inflammatory reaction (HE, X100).

tos neoformados (Figure-6). A birrefringência não detectou partículas colagênicas, caracterizando absorção total do material implantado no subcutâneo. No local com aponeurose observou-se intensa fibrose circundando o enxerto, entretanto, ainda observou-se áreas onde se identificou aponeurose implantada, demonstrando que a substituição por fibrose foi mais intensa na área receptora do colágeno (Figure-7).

DISCUSSÃO

Uma ampla variedade de materiais tem sido utilizada para confecção do sling pubovaginal (1). Encontram-se descritos na literatura o uso de fásia lata, aponeurose do músculo reto do abdome, polipropileno, derme de porco, mersilene, todos com resultados iniciais favoráveis, porém com relatos de

complicações (8,12,13). A utilização de mersilene pode levar a erosão uretral com conseqüente formação de fístula uretro-vaginal ou ainda estar associado à formação de cálculos (14). Foram descritos infecção da ferida operatória utilizando a derme de porco (8) e formação de granuloma e erosão vaginal com o uso de mersilene (15). Foi encontrada rejeição ao dacron em 19.3% dos pacientes e ao Goretex em 30% (16). Recentemente, Martucci et al. (17) demonstraram 90% de complicações pós-operatórias com a utilização do sling de pericárdio bovino. Algumas teorias foram propostas para explicar o mecanismo da rejeição induzida pelos materiais sintéticos: presença de infecção e reação do tipo corpo estranho, sendo que a rejeição pode ser um fator de rejeição precoce (16). A utilização de material rígido pode levar a formação de úlcera facilitando a infecção secundária

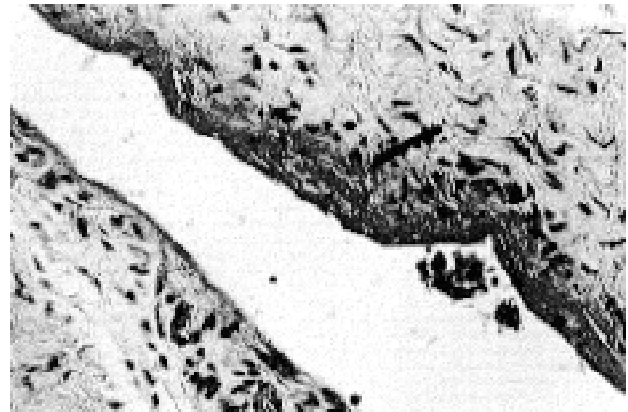


Figure 6 - The arrow points where the graft was substituted by fibrosis (HE, X40).



Figure 7 - Presence of fibrosis encircling the graft (HE, X100).

ria. O material sintético desencadeia uma reação tecidual, promovendo uma reação imune de hipersensibilidade tardia, sendo esta resposta maior ou menor na dependência da biocompatibilidade do material utilizado (16).

Quando se opta pela utilização do material sintético para a confecção do sling, o uso de um material que leve a mínima reação do tipo corpo estranho, pequeno risco de infecção, rejeição e erosão são necessárias para o sucesso da correção cirúrgica.

Desenvolvemos um estudo a fim de comparar as reações teciduais provocadas pelo enxerto livre de aponeurose, semelhante ao material retirado da região suprapúbica das pacientes quando submetidas ao sling pubovaginal e de uma faixa de colágeno do tipo I, purificado e polimerizado, implantados no subcutâneo de cães.

Na década de 80, o colágeno bovino foi introduzido para fins cosméticos, particularmente a correção de pequenos defeitos em tecidos moles. Resultados temporários (aproximadamente 6 a 18 meses) limitaram seu uso, em consequência da reabsorção precoce do material injetado (18).

Uma segunda geração de colágeno associado a 0.0075% de glutaraldeído tornou-se posteriormente disponível, com o objetivo de prolongar a sobrevivência do enxerto e diminuir a resposta imune celular do hospedeiro. Kligman & Armstrong (19) puderam demonstrar, em estudos in vivo, que o material implantado é capaz de estimular a neoformação de colágeno endógeno, produzindo assim um efeito mais permanente. Nosso estudo demonstrou, através da birrefringência, a presença de neoformação de colágeno, já nos primeiros 30 dias após o implante do colágeno, no subcutâneo da parede abdominal dos cães. Entretanto, este foi totalmente substituído por fibrose 90 dias após o implante. A região receptora de tecido autólogo igualmente promoveu o desenvolvimento de fibrose, embora em menor intensidade, após o mesmo tempo de observação. Estes dados sugerem que a fibrose proporciona um importante apoio ao colo vesical e a uretra média, em pacientes incontinentes submetidas ao sling pubovaginal.

Preparações com colágeno bovino tem sido utilizada extensivamente em cirurgia plástica, otorrinolaringologia e cirurgia geral (20). Este material tem-se demonstrado seguro e efetivo, sendo que, ocasionalmente, ocorre resposta inflamatória local

mínima no implante de colágeno na região suburetral da bexiga de coelhos (21). Nossa pesquisa comprova esta observação, já que a avaliação histológica demonstrou mínima reação inflamatória, com ausência de células responsáveis pela reação tipo corpo estranho, demonstrando a biocompatibilidade dos materiais implantados.

O uso do colágeno para correção de defeitos na derme, não tem demonstrado formação de granulomas ou reação tipo corpo estranho nos primeiros meses pós-implante (2). Assim como a injeção suburetral detectou apenas mínima resposta inflamatória, neovascularização e presença de fibroblastos (21). Este mesmo estudo não constatou alteração do colágeno implantado com o tempo: a aparência era semelhante logo após o procedimento até 12 meses após (21).

O enxerto de colágeno no subcutâneo de cães levou a formação de fibrose, com total substituição do material implantado, após noventa dias do procedimento. Ocorreu mínima reação inflamatória tipo corpo estranho, semelhante à resposta produzida pelo enxerto de fásia autóloga. Portanto, este estudo demonstra a biocompatibilidade do colágeno, evidenciada pela ausência de polimorfonucleares, necrose, liquefação e células gigantes e a capacidade do enxerto de colágeno de levar a formação de neocolágeno e posterior fibrose, sugerindo tratar-se de material seguro e resistente para confecção de sling pubovaginal.

CONCLUSÕES

Nossos dados permitem-nos concluir que o colágeno do tipo I, purificado, apresenta reação inflamatória mínima, sendo o implante totalmente reabsorvido após 90 dias e substituído por tecido fibroso. A fásia autóloga igualmente é envolta por fibrose, entretanto, o processo ocorre mais lentamente, pois ainda permanecem locais onde se pode encontrar aponeurose implantada, após o mesmo período de observação.

A despeito do presente estudo tratar-se de pesquisa experimental, pode-se inferir que o uso do colágeno, na confecção dos slings pubo vaginais, é capaz de proporcionar suporte uretral adequado, pois leva a formação de fibrose que por sua vez é responsável pela continência obtida nestes procedimentos cirúrgicos.

REFERÊNCIAS

1. McGuire EJ, O'Connell HE: Surgical treatment of intrinsic urethral dysfunction. *Urol Clin North Am*, 22: 657-664, 1995.
2. Shortliffe LMD, Freiha FS, Kessler R, Stamey TA, Constantinou CE: Treatment of urinary incontinence by the periurethral implantation of glutaraldehyde cross-linked collagen. *J Urol*, 141: 538-541, 1989.
3. Blaivas JG, Jacobs BZ: Pubovaginal fascial slings for the treatment of complicated stress urinary incontinence. *J Urol*, 145: 1214-1216, 1991.
4. Beck RP, McCormick S, Nordstrom L: The fascia lata sling procedure for treating recurrent genuine stress incontinence of urine. *Obstet Gynecol*, 72: 699-703, 1988.
5. Morgan JE, Farrow GA, Stewart FE: The Marlex sling operation for the treatment of recurrent stress incontinence: a 16-year review. *Am J Obstet Gynecol*, 151: 224-226, 1985.
6. Petrou SP, Baracat F: Experiência da clínica Mayo com o "sling" pubovaginal. *J Bras Urol*, 21: 1-7, 1995.
7. Rodrigues P, Campagnari JC, D'Império M, Srougi M: Avaliação inicial dos resultados da correção da Incontinência Urinária de Esforço, utilizando-se fragmento de aponeurose. *J Bras Urol*, 22: 110-114, 1996.
8. McGuire EJ, Lytton B: Experience with pubovaginal slings for urinary incontinence at the University of Michigan. *J Urol*, 138: 525-526, 1987.
9. Eisele PH: Anesthesia for Laboratory Animal: Practical Considerations and Techniques. In: Rollin BE & Kesel LM. *The Experimental Animal in Biomedical Research*. Boca Raton, CRC Press Inc, 1: 298-300, 1990.
10. Vidal BC: From collagen type I solution to fibers with a helical pattern: a self-assembly phenomenon. *CR Acad Sci Paris, Sciences de la vie*, 318: 831-836, 1995.
11. Chvapil M, Kronenthal RL, VanWinkle W: Medical and surgical applications of collagen. *Int Ver Conn Tissue Res*, 6: 1-15, 1973.
12. Juma S, Little NA, Raz S: Vaginal wall sling: four years later. *Urology*, 39: 424-428, 1992.
13. Iosif CS: Porcine corium sling in the treatment of urinary stress incontinence. *Arch Gynecol*, 240: 131-136, 1987.
14. Melnick I, Lee RE: Delayed transection of the urethra by mersilene tape. *Urology* 8: 580-582, 1976.
15. Myers DI, LaSala CA: Conservative surgical management of Mersilene mesh suburethral sling erosion. *Am J Obst Gynecol*, 179: 1424-1428, 1998.
16. Debodinance P, Cosson M, Burlet G: Tolerance of synthetic tissues in touch with vaginal scars: review to the point of 287 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 87: 23-30, 1999.
17. Martucci RC, Ambrogini A, Calado AA, Zerati M, Muller MEA: Pubovaginal sling with bovine pericardium for treatment of stress urinary incontinence. *Braz J Urol*, 26: 208-214, 2000.
18. Castrow FF, Krull EA: Injectable collagen implant-update. *J Am Acad Dermatol*, 9: 889-893, 1983.
19. Kligman AM, Armstrong RC: Histologic response to intradermal Zyderm and Zylplast (glutaraldehyde cross-linked) collagen in humans. *J Dermatol Surg Oncol*, 12: 351-357, 1986.
20. Ford CN, Martin DW, Warner TF: Injectable collagen in laryngeal rehabilitation. *Laryngoscope*, 94: 513-516, 1984.
21. Leonard MP, Canning DA, Epstein JI, Gearhart JP, Jeffs RD: Local tissue reaction to the suburethral injection of glutaraldehyde cross-linked bovine collagen in humans. *J Urol*, 143: 1209-1212, 1990.

Received: May 23, 2000

Accepted after revision: March 30, 2001

Correspondence address:

Dra. Míriam Dambros
 Rua Antônio Augusto de Almeida, 1347
 Cidade Universitária, Distrito de Barão Geraldo
 Campinas, SP, 13084-070, Brazil
 E-mail: miriamdambros@hotmail.com