



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**Elaine Bronzatto**

**Avaliação imunohistoquímica de Interleucina-1, Fator de  
Necrose Tumoral Alfa, Metaloproteinase 2 e Metaloproteinase 3  
na integração experimental de telas de polipropileno de alta e  
baixa densidade**

**CAMPINAS**

**2016**

**Elaine Bronzatto**

**Avaliação imunohistoquímica de Interleucina-1, Fator de  
Necrose Tumoral Alfa, Metaloproteinase 2 e Metaloproteinase 3  
na integração experimental de telas de polipropileno de alta e  
baixa densidade**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual  
de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra  
em Ciências

Este exemplar corresponde à versão final da  
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna  
Elaine Bronzatto, e orientada pelo Prof. Dr. Cássio  
Luís Zanettini Riccetto

**Campinas  
2016**



**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** Não se aplica.

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Bronzatto, Elaine, 1976-  
B789a Avaliação imunohistoquímica de interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa, metaloproteinase 2 e metaloproteinase 3 na integração experimental de telas de polipropileno de alta e baixa densidade / Elaine Bronzatto. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Cássio Luís Zanettini Riccetto.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Telas cirúrgicas. 2. Polipropilenos. 3. Metaloproteases. I. Riccetto, Cássio Luís Zanettini. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Immunohistochemical evaluation of interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, metalloproteinase 2 and metalloproteinase 3 in the experimental integration of high and low density polypropylene meshes

**Palavras-chave em inglês:**

Surgical mesh

Polypropylenes

Metalloproteases

**Área de concentração:** Fisiopatologia Cirúrgica

**Titulação:** Mestra em Ciências

**Banca examinadora:**

Cássio Luís Zanettini Riccetto [Orientador]

Ricardo Destro Saade

José Tadeu Nunes Tamanini

**Data de defesa:** 22-11-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Cirurgia

---

# **BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO**

**ELÂINE BRONZATTO**

---

---

**ORIENTADOR: Cássio Luís Zanettini Riccetto**

---

---

## **MEMBROS:**

**1. PROF. DR. Cássio Luís Zanettini Riccetto**

**2. PROF. DR. Ricardo Destro Saade**

**3. PROF. DR. José Tadeu Nunes Tamanini**

---

Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA CIRURGIA da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

---

**DATA DA DEFESA 22/11/2016**

---

***Dedico este trabalho...***

***Aos meus pais Elizeo e Valquíria que são meus alicerces.  
Aos meus irmãos Ellen, Elizeo Filho e Ernanni, que são  
meus melhores amigos e apoiadores. Ao professor  
Cassio pelos ensinamentos e por sempre acreditar. A  
meu esposo Paulo, companheiro sempre, que me apoia  
em todas as minhas escolhas.***

# *Agradecimentos*

---

Agradeço ao professor Cássio Luís Zanettini Riccetto, um exemplo como professor e orientador dedicado e, acima de tudo, um grande cientista e cirurgião, sempre acreditando e incentivando seus alunos.

Agradeço também ao professor Paulo Cesar Rodrigues Palma que com sua empolgação e criatividade despertou o meu interesse pela Uroginecologia.

Ao amigo Alessandro Prudente, que me auxiliou na parte experimental do estudo e compartilhou seus conhecimentos nesta área.

Aos biólogos Ana Cristina de Moraes e Willian Adalberto Silva, do Laboratório de Técnica Cirúrgico Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, que colaboraram nos procedimentos experimentais e no cuidado dos animais.

Ao Professor José Vassalo e Professor Paulo Latoff Filho, do Laboratório de Anatomia Patológica e do CIPED por todo apoio.

À Sueli Chaves, pela sua competência e carinho, que corrigiu essa tese.

Aos professores Ricardo Destro Saade e Leonardo Oliveira Reis pelas revisões, correções e sugestões.

À minha mãe e a meu pai que sempre me deixaram livre para tomar minhas decisões.

A meus irmãos Ellen, Elizeo e Ernanni, que são meus grandes amigos e iluminam meu caminho.

Ao meu esposo, Paulo, que está do meu lado e me apoia nas minhas escolhas.

À minha amiga Juliane Tiecher, que me acompanha e me enriquece nos estudos e ideias profissionais.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que forneceu recursos para aquisição dos reagentes para os testes imuno-histoquímicos.

# Resumo

---

**Introdução:** Telas de polipropileno (PP) têm sido cada vez mais empregadas em cirurgias para correção de prolapso de órgãos pélvicos (POP) devido às menores taxas de recidiva, quando comparadas às cirurgias sem emprego de próteses. O uso do PP na forma de *sling* para tratamento da incontinência urinária é considerada o padrão ouro. Quanto ao seu emprego nos POP, complicações como exposição da tela para a vagina, erosão para outros órgãos e dor local ainda são desafios relevantes. O estudo da interação do PP com o leito receptor do hospedeiro pode auxiliar a compreender esses eventos adversos e contribuir para o desenvolvimento de materiais que tenham melhor biocompatibilidade e, conseqüentemente, menores taxas de complicações.

**Objetivo:** Estudar, de forma comparativa, a quantificação imunohistoquímica das metaloproteinases de colágeno (MMP-2 e MMP-3) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF-alfa) em implantes experimentais de telas de polipropileno de baixa densidade (16g/m<sup>2</sup>) (BD) e de alta densidade (72g/m<sup>2</sup>)

(AD) no subcutâneo de ratas. **Materiais e métodos:** Utilizou-se 20 ratas adultas da raça Wistar, que foram submetidas ao implante de dois fragmentos de tela de polipropileno monofilamentar retangular (20mm x 10mm) no tecido subcutâneo abdominal. As telas implantadas apresentavam 16 g/m<sup>2</sup> e 72g/m<sup>2</sup>, designadas respectivamente de baixa densidade (BD) e alta densidade (AD).

As ratas foram divididas em dois grupos de 10 animais, que foram eutanasiados aos quatro e 30 dias após o implante. Foram confeccionadas lâminas que foram coradas com reagentes para identificação imunohistoquímica dos antígenos MMP-2, MMP-3, TNF-α e IL-1. Três campos

de cada lâmina foram fotografados com aumento de 400 vezes e a densidade e a área *percentual* dos marcadores inflamatórios em questão foram quantificados através do programa AxioVison (Carl Zeiss, Alemanha).

**Resultados:** Não foram verificadas diferenças significativas na expressão dos mediadores inflamatórios IL-1 e TNF- $\alpha$ , porém houve aumento de IL-1 nos grupos eutanasiados após 30 dias (30 dias > 4 dias,  $p=0,0269$ ). Em relação às metaloproteinase MMP-2, não houve diferença significativa entre os grupos AD e BD, porém observou-se maior expressão no grupo BD eutanasiado após 30 dias (BD: 30dias > 4 dias,  $p<0,0001$ ). De forma semelhante, não foi observada diferença entre os grupos AD e BD quanto à imunoreatividade para MMP3, porém observou-se aumento significativo nos grupos eutanasiados após 30 dias (30dias > 4 dias,  $p=0,02$ ). **Conclusão:** Não foram identificadas diferenças significativas entre as telas de alta e baixa densidade quanto à imunoreatividade para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- $\alpha$  e metaloproteinases 2 e 3 nos períodos estudados. Entretanto, observou-se aumento da imunoreatividade para IL-1, MMP-2 e MMP-3 ao longo do tempo (30 dias>4dias) em ambos tipos de implantes (AD e BD), evidenciando que a resposta inflamatória perdura de forma subaguda após o implante. Infere-se que a ocorrência de eventos adversos após implante de próteses de PP pode ser influenciada por outros fatores, não exclusivamente relacionados à densidade do material implantado.

Palavras-chave: Tela, Polipropileno, Alta e baixa densidade, Metaloproteinase, Interleucina, Fator de necrose tumoral alfa.

# Abstract

---

**Introduction:** Polypropylene (PP) meshes have been increasingly adopted for surgical treatment for pelvic organs prolapse (POP) due to its greater success when compared to site specific surgeries. PP use as a *sling* for urinary incontinence is considered the gold standard, however complications such as mesh exposure into the vagina, erosion into other organs and perineal pain remains a challenge to its use for POP reinforcement. The study of the interaction of these materials with the host tissue can help to understand the mechanisms evolved in PP mesh adverse events and contribute to the development of materials with better biocompatibility and consequently lower complication rate. **Objective:** To study the immunohistochemical quantification of collagen metalloproteinases (MMP-2 and MMP-3) and proinflammatory cytokines (IL-1 and TNF- $\alpha$ ) in low density (16g/m<sup>2</sup>) (LD) and high density (72g/m<sup>2</sup>) (HD) mesh implants in a rat subcutaneous model. **Materials and methods:** 20 female adult Wistar rats underwent implantation of both monofilament PP meshes fragments measuring 20mm x 10mm in subcutaneous tissue of the abdominal wall. The rats were divided into two groups (10 rats each), which were euthanized after 4 and 30 days. Abdominal wall was removed en bloc and each sample was prepared for paraffin immunohistochemical analysis of the expression of MMP-2, MMP-3, TNF- $\alpha$  and IL-1. Three fields of each slice were photographed with magnification of 400x. For each parameter, the *percentual* area of each marker was quantified using AxionVision software (Carl Zeiss, Germany). **Results:** There were no significant differences in the quantification of IL-1 and TNF- $\alpha$  in LD versus HD meshes.



However, IL-1 immunoreactivity increased along the time (30 days > 4 days,  $p=0.0269$ ). Also, MMP-2 quantification was similar to HD and LD and both presented a significant increase along the time (30days > 4 days,  $p<0.0001$ ). MMP-3 quantification also showed no difference between the HD and LD groups, but increased along the time (30 days > 4 days,  $p=0.02$ ). **Conclusions:** There were no significant differences between high density and low density meshes in regard to the quantification of pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  and metalloproteinases 2 and 3. However, there was an increased expression of IL-1, MMP-2 and MMP-3 over time, as an evidence of a longstanding inflammatory response after PP mesh implantation. Possibly, the occurrence of adverse events following PP prosthetic implants can be influenced by other factors, not solely related to the amount of implanted material.

**Keywords:** Mesh, Polypropylene, High density and low density, metalloproteinases, Interleukin, Alpha tumoral necrosis factor,

# *Lista de Figuras*

---

## **FIGURAS**

---

- |                   |                                                                                 |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Figura 1.</b>  | Metaloproteinases                                                               |
| <b>Figura 2.</b>  | Telas de polipropileno                                                          |
| <b>Figura 3.</b>  | Procedimento cirúrgico                                                          |
| <b>Figura 4.</b>  | Marcação de imunorreatividade                                                   |
| <b>Figura 5.</b>  | Evolução do valor médio e SD da área percentual imunomarcada para IL-1          |
| <b>Figura 6.</b>  | Lâminas inumomarcadas para IL-1. Aumento de 400x.                               |
| <b>Figura 7.</b>  | Evolução do valor médio e SD da área percentual imunomarcada para TNF- $\alpha$ |
| <b>Figura 8.</b>  | Lâminas inumomarcadas para TNF- $\alpha$ . Aumento de 400x.                     |
| <b>Figura 9.</b>  | Evolução do valor médio e SD da área percentual imunomarcada para MMP2          |
| <b>Figura 10.</b> | Lâminas inumomarcadas para MMP2. Aumento de 400x.                               |
| <b>Figura 11.</b> | Evolução do valor médio e SD da área percentual imunomarcada para MMP3          |
| <b>Figura 12.</b> | Lâminas inumomarcadas para MMP3. Aumento de 400x.                               |
| <b>Figura 13.</b> | Fases da cicatrização                                                           |

# *Lista de Tabelas*

---

## **TABELAS**

---

<b>Tabela 1.</b>	Análise imunohistoquímica para IL-1.
<b>Tabela 2.</b>	Análise imunohistoquímica para TNF- $\alpha$ .
<b>Tabela 3.</b>	Análise de imunohistoquímica para MMP2.
<b>Tabela 4.</b>	Análise de imunohistoquímica para MMP3.
<b>Tabela 5.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para IL-1, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 6.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para IL-1, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 7.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para IL-1, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 8.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para IL-1, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 9.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para MMP2, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 10.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para MMP2, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 11.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para MMP2, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 12.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para MMP2, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 13.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para MMP3, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 14.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para MMP3, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 15.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para MMP3, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 16.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para MMP3, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 17.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para TNF, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 18.</b>	Telas de alta densidade, IHQ para TNF, eutanásia após 30 dias.
<b>Tabela 19.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para TNF, eutanásia após 4 dias.
<b>Tabela 20.</b>	Telas de baixa densidade, IHQ para TNF, eutanásia após 30 dias.

## *Lista de Abreviaturas e Siglas*

---

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IL-1	Interleucina 1
IUE	Incontinência urinária de esforço
IUU	Incontinência urinária de urgência
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de matriz
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
POP	Prolapso de órgão pélvico
PP	Polipropileno
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TIMPs	Inibidores de metaloproteinases
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
SD	Desvio Padrão da média
AD	Alta densidade
BD	Baixa densidade

# Sumário

---

1. Introdução .....	16
1.1. Implantes de próteses .....	16
1.2. Telas em Uroginecologia .....	17
1.3. Fatores inflamatórios e metaloproteinases .....	21
1.4. Justificativa .....	23
2. Objetivos .....	25
2.1. Objetivo Geral .....	25
2.2. Objetivos Específicos .....	25
3. Materiais e Métodos .....	26
3.1. Amostra .....	26
3.2. Materiais .....	27
3.3. Etapas experimentais .....	28
3.4. Coleta dos Espécimes e Preparo para Estudo .....	30
3.5. Avaliação imunohistoquímica .....	32
3.6. Análise Estatística .....	33
4. Resultados .....	35
4.1. Interleucina-1 (IL-1) .....	35
4.2. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	37
4.3. Metaloproteinase tipo 2 (MMP-2) .....	38
4.4. Metaloproteinase tipo 3 (MMP-3) .....	40
5. Discussão .....	43
6. Conclusão .....	49
7. Referências Bibliográficas .....	50
8. Anexos .....	56
ANEXO I .....	56
ANEXO II .....	57

# ***1. Introdução***

---

## **1.1. Implantes de próteses**

Defeitos teciduais que causam prolapsos de órgãos pélvicos (POP) sempre foram um desafio para os cirurgiões. Diversas técnicas foram desenvolvidas no decorrer dos anos visando reestabelecer a anatomia da melhor forma possível. A fraqueza dos tecidos que leva à hérnia tem origem multifatorial, porém diversos estudos demonstraram importante papel das alterações na gênese do colágeno. O colágeno atribui resistência e integridade às aponeuroses e fâscias. Os estudos que evidenciam alterações tanto no colágeno total quanto nas proporções de colágeno tipo I e tipo III e demonstram maior recorrência proporcionais ao enfraquecimento e às alterações estruturais dos tecidos empregados para correção de defeitos herniários, como nas técnicas de correção de POP sem emprego de tela (1,2,6).

Billroth, em 1880 já havia afirmado que, quando fosse possível empregar tecidos artificiais, o problema da hérnia seria resolvido (3).

O início do uso de materiais sintéticos para se corrigir defeitos teciduais foi descrito em 1954 com a publicação de Usher de seus bons resultados com o emprego de telas de polipropileno para hérnias inguinais (4,5).

Desde então, o tipo de material vem se modificando, buscando-se a melhor integração com o tecido hospedeiro, com grande diversificação do uso

de próteses. Em Urologia, próteses de polipropileno (PP) foram empregadas, inicialmente, para correção da incontinência urinária, substituindo o *sling* autólogo, confeccionado até então com aponeurose abdominal ou fáscia vaginal, e na última década, assistiu-se seu emprego nos POP.

## **1.2. Telas em Uroginecologia**

O POP é a descida de um ou mais órgãos através da parede vaginal. São classificados de acordo com sua localização em prolapsos vaginais anteriores (“cistocele”), prolapsos apicais (cúpula vaginal, útero ou enterocele) e prolapsos vaginais posteriores (“retoceles”) (7, 8).

A prevalência de prolapsos vaginais é pouco conhecida. Considerando-se o sintoma popularmente referido como “bola na vagina”, estima-se sua prevalência entre 5% a 10%. Julgando-se, entretanto, as queixas de desconforto pélvico ou necessidade de redução digital do prolapso durante o esforço evacuatório, a prevalência aumenta para 23%-28% (9).

A incontinência urinária é a condição na qual ocorre perda involuntária de urina, seja ao esforço físico, espirro e tosse, sendo classificada como incontinência urinária de esforço (IUE), ou precedida de urgência miccional, sendo esta designada de incontinência urinária de urgência (IUU) (8). A incontinência urinária afeta cerca de 27% de todas as mulheres do mundo, causando grande impacto na qualidade de vida, gerando repercussões econômicas e sociais, limitando o convívio social, familiar e a vida sexual (10,

11). Nas mulheres com idade entre 45 a 60 anos, a prevalência da IUE varia de 25% a 35% e acima de 60 anos de idade pode chegar a 50% (12).

O diafragma pélvico, composto pelos músculos levantadores do ânus, músculos coccígeos e por fâscias, promove a sustentação das vísceras femininas. O diafragma urogenital, que estabiliza a uretra, constitui-se dos músculos transverso superficial e profundo do períneo, músculo bulbo esponjoso, músculo ísquio-cavernoso e suas fâscias. Essa complexa estrutura muscular atua de forma sinérgica na sustentação dos órgãos pélvicos e nos mecanismos de continência urinária (13).

Segundo a Teoria Integral da Continência, com a contração dos músculos do assoalho pélvico, há estiramento de ligamentos e fâscias de suporte uretral que, associada com a contração da musculatura estriada do esfíncter e com a coaptação da mucosa uretral, permitem a continência urinária. A falha em um ou mais desses componentes podem levar a perda urinária (14).

As cirurgias para correção de incontinência urinária e prolapso urogenital tem o objetivo de reestabelecer à anatomia e conseqüentemente a recuperar sua função fisiológica. O emprego de telas para essa finalidade tem sido amplamente utilizado, principalmente na correção de incontinência urinária de esforço e dos prolapsos anteriores e apicais.

Em 1970, Morgan descreveu o emprego da tela de Marlex®, originalmente usada em cirurgias de hérnias, para correção da incontinência urinária de esforço, na forma de *sling* suburetral (15). Ulmsten et al., em 1998, descreveram o primeiro *sling* monofilamentar, retropúbico posicionado através de agulhas, esta faixa inserida por única incisão vaginal, ancorando a uretra



através de incisões puntiformes suprapúbicas (16). Os *slings* sintéticos ancorados na uretra média evoluíram ao longo das últimas duas décadas, com variações técnicas relevantes, tais como a abordagem transobturatória e mais recentemente com o advento dos mini *slings*, porém sem grandes modificações bem sucedidas do material empregado na sua confecção, que, no presente, continua representado pelo polipropileno monofilamentar.

A recidiva de prolapsos de órgão pélvicos (POPs) após o advento das telas sintéticas apresenta-se em torno de 10%-30% (17), significativamente menor do que a correção com tecidos nativos, de cerca de 30%-50%.(17).

Os biomateriais têm evoluído, procurando-se o material ideal que desempenharia sua função de reparar o tecido enfraquecido de forma duradoura com menor índice de complicações. Esse material deveria ser “silencioso”, causando a menor reação inflamatória possível, quimicamente inerte, não carcinogênico, não alérgico, com boa resistência mecânica e passível de esterilização com facilidade (20).

Diversos tipos de materiais foram utilizados até que as telas de PP se tornassem a opção mais utilizada atualmente. Mesmo no que se refere ao PP, são possíveis variações, tais como:

- a) Filamentação: única ou múltipla.
- b) Gramatura: mede o peso por unidade de área, telas de baixo peso (menor que 45g/cm<sup>2</sup>) e alto peso (maior que 70 g/cm<sup>2</sup>).
- c) Porosidade: macroporosas (maior que 75µm) e com microporos (menor que 10 µm).

d) Revestimento do material.

A tela de polipropileno monofilamentar com macroporos é a que apresenta o melhor resultado na literatura especializada até o momento, seja em relação à cura objetiva ou às taxas de complicações (40). Um estudo de revisão mostrou menor recorrência dos prolapso anterior e posterior quando utilizou-se tela inabsorvível (8,8%) quando comparada a material absorvível (23,1%) ou tecido nativo (17,9%) (41).

Em outra revisão sistemática, de 2011, concluiu-se que a correção de prolapso anterior com o uso de telas inabsorvíveis ou absorvíveis é superior a correção sítio específica (sem tela). No mesmo estudo concluiu-se que o prolapso apical tem menor taxa de recidiva com a abordagem abdominal, apesar do tempo cirúrgico, custo e tempo de recuperação serem maiores. Por outro lado, o emprego de tela na correção do prolapso posterior não mostrou superioridade no resultado final e, além disso, associou-se com considerável taxa de erosão vaginal (10%) (42).

Complicações relacionadas a defeitos de integração tecidual dos materiais implantados no assoalho pélvico para correção de POP e IUE apresentam relativa frequência, apesar da evolução dos biomateriais. Essas complicações, como erosão da tela, infecção e dor local afetam diretamente a qualidade de vida. Tal fato determinou que, recentemente, o FDA (*Food and Drug Administration*) publicasse advertências sobre a ausência de evidências de nível I acerca da eficácia e segurança das telas sintéticas para correção de POP (21).

Complicações relacionadas à falha da integração tecidual das telas justificam estudos na área de biotecnologia visando melhor compreender os processos envolvidos nos eventos adversos associados com o implante vaginal de telas de PP (22).

### **1.3. Fatores inflamatórios e metaloproteinases**

A cirurgia, bem como a presença da tela, geram trauma local que desencadeia a liberação de citocinas pro-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Na presença dessas substâncias, neutrófilos, macrófagos, monócitos, fibroblastos e queratinócitos liberam as metaloproteinases de matriz (MMPs) de grânulos específicos de armazenamento, os zimógenos, para o meio extracelular (23).

As MMPs tem papel fundamental em todas as fases da cicatrização, atuando na remodelação tecidual, pois degradam os componentes da matriz extracelular (MEC) além de serem capazes de atuar na síntese de colágeno e outros de componentes. O desajuste entre a produção de MMPs e sua inibição propaga a reação inflamatória, retardando a cicatrização e, conseqüentemente, pode participar do mecanismo fisiopatológico dos eventos adversos relacionados com a integração de bioimplantes (24). Existem mais de 25 metaloproteinases, que podem ser divididas, de acordo com seu substrato e estrutura, em: collagenases (MMP-1, 8 e 13), estromelisinases (MMP-3, 7 e 10), gelatinases (MMP-2 e 9), matrilisinases (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana

(MMP-14, 15, 16, 17, 24) e outras MMPs. (Tabela 1) (24,25,26).

Número	Enzima	Substrato
MMP-1	Colagenase 1	Colágeno tipo 1, pro MMP-2
MMP-2	Gelatinase A	pro MMP-9, fibronectina, Colágeno IV, V, VII e X; proteoglicanos
MMP-3	Estromelisina-1	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicano, colágeno VI, V, IX, X, proMMPs -1,7,8,9,13
MMP-7	Matrilisina	Fibronectina, elastina, colágeno IV
MMP-8	Colagenase 2	Proteoglicanos
MMP-9	Gelatinase B	Gelatin, fibronectina, elastina, colágeno IV, V, VII, X e colágeno tipo I desnaturado
MMP-10	Estromelisina-2	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicano, colágeno IV, V, IX, X
MMP-12	Metaloelastase	Elastina
MMP-13	Colagenase 3	Colágeno tipo 1
MMP-14	MT1-MMP	proMMP-2, -13, colágeno helicoidal
MMP-15	MT2-MMP	Transglutaminase de superfície
MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Fibrina
MMP-20	Enamelisina	Matriz do esmalte dental

Figura 1: Metaproteinasas

As metaloproteinasas (MMP) que foram analisadas nesse estudo foram MMP-2 e MMP-3, que apresentam maior expressão nas fases de cicatrização proliferativa e de remodelação, respectivamente. A MMP-2, assim como a MMP-9, são fundamentais durante a angiogênese, além de degradarem o colágeno IV e outros componentes da matriz extra celular. A MMP-3 relaciona-se com a fase de remodelação (23).

O primeiro relato sobre MMP ocorreu em 1962, quando Jerome Gross e Charles Lapiere demonstraram a ação de uma enzima, que posteriormente

foi denominada collagenase, na reabsorção de caudas de girinos. Desde então, surgiram estudos relacionando processos fisiológicos, como a reparação celular, e patológicos, como úlceras de córnea, às ações enzimáticas das MMPs (27, 28).

Aspectos da intensidade e da cinética da reação inflamatória no tecido hospedeiro ao implante podem ser analisados através da quantificação de citocinas pró (p.ex: IL-1 e TNF) e anti-inflamatórias (p.ex: TGF e IL-6), por meio da imuno-histoquímica (43).

#### **1.4. Justificativa**

Complicações relacionadas à defeitos de integração tecidual dos materiais implantados no assoalho pélvico para correção de POP e IUE apresentam frequência relevante, apesar da evolução dos biomateriais.

Considerando-se os processos fisiológicos relacionados com o reparo tecidual após o implante de prótese de PP, e a hipótese de que os efeitos adversos dependeriam, ao menos em parte, da densidade do material implantado, propõe-se o estudo do comportamento de componentes relevantes na integração tecidual, como o colágeno e citocinas pro-inflamatórias, em implantes experimentais de telas de PP monofilamentar de baixa e de alta densidade. A análise comparativa das propriedades de telas de diferentes densidade contribuirá com dados objetivos acerca dos aspectos

imunoinflamatórios locais, podendo levar a proposição de estratégias visando minimizar o risco de complicações.

## ***2. Objetivos***

---

### **2.1. Objetivo Geral**

Comparar aspectos do processo de integração tecidual de telas de PP de alta e baixa densidade implantadas no tecido subcutâneo abdominal de ratas adultas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Estudar de forma comparativa a evolução da quantificação imunohistoquímica das citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  em implante das telas de PP no tecido subcutâneo abdominal de ratas adultas.

- Estudar de forma comparativa a evolução da quantificação imuno-histoquímica das metaloproteinases MMP-2 e MMP-3 em implante das telas de PP no tecido subcutâneo abdominal de ratas adultas.

## ***3. Materiais e Métodos***

---

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas-Unicamp, após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, CEEA-IB-Unicamp (ANEXO I)

### **3.1. Amostra**

Utilizou-se no estudo 20 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus albinus*), peso médio de 250g. Os animais foram divididos em dois grupos, cada um com dez ratas.

As ratas permaneceram no Biotério da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, alojadas em gaiolas contendo cinco animais cada, sob condições ideais de temperatura, umidade e luz, foram alimentadas com ração e água. Tais animais foram observados por trinta (30) dias, anteriormente ao início do estudo, a fim de excluir doenças próprias desta espécie.

O experimento consistiu no implante de telas de PP monofilamentar através de uma incisão longitudinal de 2,5cm na parede abdominal das ratas.



As ratas de cada grupo, foram eutanasiadas aos quatro e trinta dias.

Todas amostras foram submetidas ao estudo dos seguintes parâmetros:

- IHQ para MMP3
- IHQ para MMP2
- IHQ para TNF- $\alpha$
- IHQ para IL-1

No grupo 1 (eutanásia com 4 dias), ocorreu perda de 2 lâminas para TNF- $\alpha$ , e uma lâmina para MMP2 e MMP3, por inadequação da técnica. Durante o estudo, houve a morte de 3 ratas no grupo 2 (eutanasiado com 30 dias).

### **3.2. Materiais**

As ratas foram submetidas a implante de duas amostras de tela através de uma única incisão abdominal, ambas de polipropileno monofilamentar retangular medindo 20mm x 10mm, sendo uma de baixa densidade (16 g/m<sup>2</sup>) e outra de alta densidade (72 g/m<sup>2</sup>). As telas foram fixadas à fáscia da parede abdominal com suturas de prolipropileno 4.0 (ponto simples) e a incisão foi suturada com prolipropileno 4.0 (pontos simples).

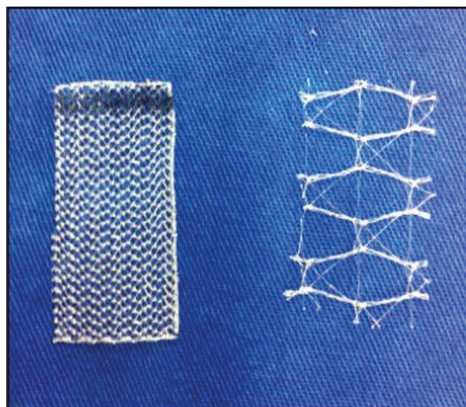


Figura 2. Telas de polipropileno, de alta densidade ( $72\text{g/m}^2$ ) e baixa densidade ( $16\text{g/m}^2$ ), da esquerda para direita.

### 3.3. Etapas experimentais

- a. Terminado o prazo de observação, as ratas foram levadas para o laboratório de Técnica Cirúrgica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP. Tal laboratório é devidamente aparelhado tanto para a execução do procedimento cirúrgico, quanto para manutenção das ratas em suas devidas gaiolas.
- b. As ratas foram submetidas a procedimentos pré-operatórios, compatíveis ao procedimento cirúrgico em questão e jejum pré-operatório com restrição alimentar a sólidos por quatro horas antes da cirurgia.
- c. Anestesia com 1,5ml de Hypnol 30%, administrada através de punção da veia caudal com *butterfly* 23 Gauges. Manutenção do nível anestésico com administração complementar de 0,5ml a 1,0ml, de acordo com a necessidade.

- d.** Imobilização das ratas em decúbito dorsal horizontal, seguida por tricotomia e antissepsia do abdome com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo (10%) e colocação de um campo estéril delimitando a área cirúrgica
- e.** Após anestesiadas, as ratas, foram submetidas ao procedimento cirúrgico que consistiu em incisão mediana na região inferior do abdômen, onde foi realizado o implante das telas, fixando-as lado a lado com suturas de polipropileno 4.0, de forma padronizada (AD à direita e BD à esquerda).
- f.** Esperou-se a recuperação da anestesia, e depois as ratas foram levadas ao biotério da instituição em suas gaiolas, onde permaneceram sob condições ideais (temperatura, umidade, luz, alimentação), até o momento da eutanásia. A analgesia pós-operatória foi realizada com solução de dipirona intramuscular, na dose de 15mg/kg por dose.

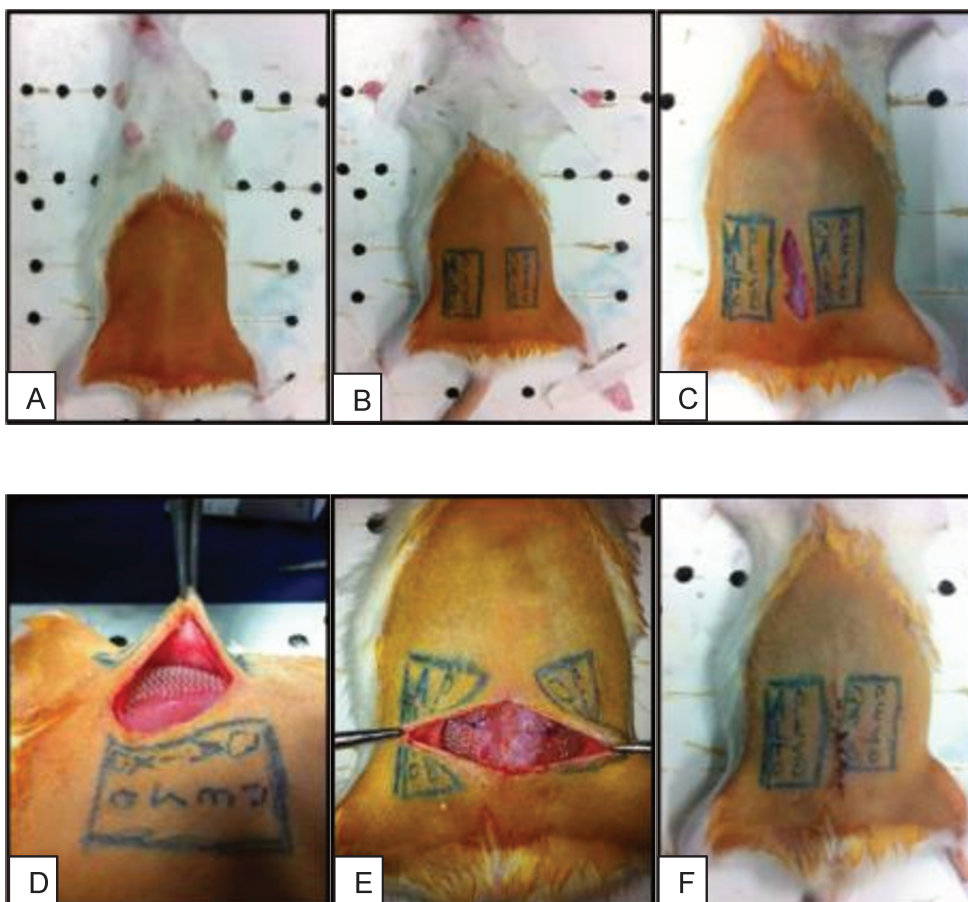


Figura 3. Esquema do procedimento cirúrgico. A) Posicionamento. B) Esquema de implante das telas. C) Incisão mediana de 2,5cm. D) Telas posicionadas acima da aponeurose. E) Fixação das telas com prolene 4.0. F) Sutura da pele.

### 3.4.Coleta dos Espécimes e Preparo para Estudo

Decorrido o período de observação foi realizada eutanásia dos animais com dose letal de anestésico. Os animais foram divididos em dois subgrupos:

- Subgrupo 1: 10 ratas, eutanasiadas quatro dias após o implante a cirurgia.
- Subgrupo 2: 10 ratas, eutanasiadas 30 dias após a cirurgia.

A retirada, em bloco, da parede abdominal foi realizada de forma asséptica, e de maneira a preservar as relações anatômicas. A análise macroscópica do tecido foi realizada nesta fase, procurando-se evidenciar sinais de eritema, necrose, tumefação e coleções.

Os blocos tiveram suas extremidades presas com alfinetes em placas de material rígido, de forma a impedir retrações e dobras durante a fixação e desidratação do material, que poderiam dificultar a análise anatomopatológica adequada.

A fixação tecidual foi realizada depositando-se as amostras em recipiente contendo formaldeído 10%, no qual permaneceram por 24 horas. Após esse período, as peças foram transferidas para solução de álcool a 70%. A seguir, as regiões com os implantes foram identificadas e separadas, de forma a se obter fragmentos de 10mm por 10mm. Cada fragmento quadrangular foi, então, cortado em retângulos, de 10mm por 2mm. Estes fragmentos menores foram depositados em caixetas plásticas apropriadas para a inclusão em parafina. Cada caixeta foi identificada com número de 1 e 2, com a especificação do tipo de material (grupo 1 e 2) correspondendo ao tempo de eutanásia (quatro e 30 dias).

Após essa etapa, foram confeccionadas lâminas, mantendo-se as telas implantadas, com 5 $\mu$ m de espessura, sem coloração, para

imunomarcação. Os blocos e lâminas foram confeccionados pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Núcleo de Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas.

### **3.5.Avaliação imunohistoquímica**

A quantificação das marcações imunohistoquímicas foi avaliada na fase aguda (4 dias) e subaguda (30 dias).

A confecção das lâminas foi obtida com cortes com 5µm de espessura no micrótomo *Hyrax M60* (Zeiss, Munique, Alemanha). Os antígenos MMP-2, MMP-3, TNF-α e IL-1 foram localizados através dos anticorpos: policlonal *rabbit* ab37150 (*abcam, EUA*) para MMP-2, policlonal *rabbit* ab53015 (*abcam, EUA*) para MMP-3, policlonal *rabbit* ab19139 (*abcam, EUA*) para TNF-α e policlonal *rabbit* sc-7884 (*Santa Cruz Biotchnology, EUA*) para IL-1 diluídos (1:150; 1:200; 1:200, 1:250, respectivamente) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4°C. O *kit MACH 4 Universal HRP-Polymer* (*Biocare Medical, EUA*) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit MACH 4* por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio Zeiss – *Primo Star*.

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células positivas ao redor dos fragmentos foi examinada

marcando-se nas lâminas as áreas imunorreativas e automaticamente o programa calculou a área percentual e a densidade da área desse infiltrado nas lâminas, sendo que cada lâmina foi fotografada em três campos, aleatoriamente, com aumento de 400x (29).

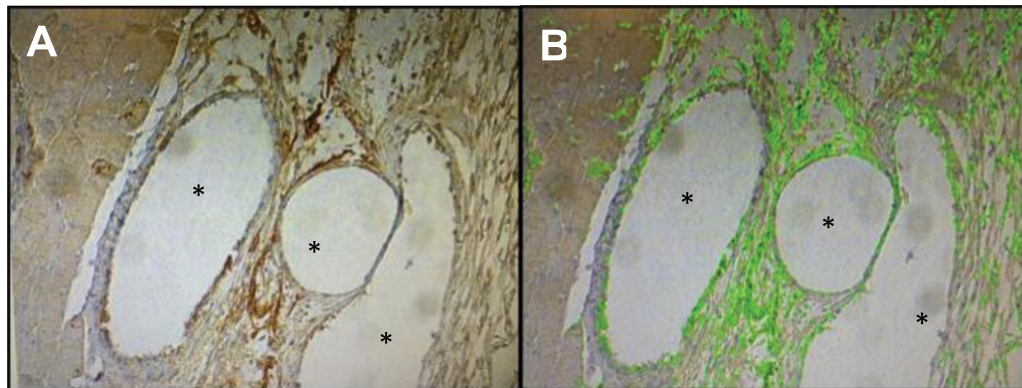


Figura 4. Exemplo da marcação da imunorreatividade (lâminas marcadas para MMP3). A) Na lâmina, a coloração acastanhada, caracteriza as áreas reativas para MMP3. B) Na segunda lâmina é representada a aplicação do Software Axion Vision, que seleciona a área reativa (que foi demarcada em verde nesse caso) e gera tabelas da área percentual.★ As lacunas correspondem aos espaços ocupados pelos filamentos da tela no tecido.

### 3.6. Análise Estatística

Foi realizada análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas.

Para comparação das medidas entre tratamentos foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos, seguida pelo teste de perfil por contrastes para localização das diferenças, quando necessário (36, 37).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.



## 4. Resultados

### 4.1. Interleucina-1 (IL-1)

Não foram identificadas diferenças significativas na quantificação do mediador inflamatório IL-1 em relação ao tipo de implante (AD e BD), porém houve aumento da imunomarcção de IL-1 no grupo eutanasiado com 30 dias (30 dias > 4 dias,  $p=0,0269$ ).

Tabela 1: Análise de imunohistoquímica para IL-1				
Eutanásia	4 dias		30 dias	
Tipo de implante	AD	BD	AD	BD
N	10	10	7	7
Média	10,28	11,92	14,83	14,15
Mediana	10,19	12,43	16,69	16,2
Desvio padrão	3,04	4,73	3,64	5,54
Resultados ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos: Quanto ao tempo eutanásia: $p\text{-valor}=0,0269$ Quanto ao tipo de implante: $p\text{-valor}=0,8347$ Quanto à interação eutanásia e tipo: $p\text{-valor}=0,4157$				

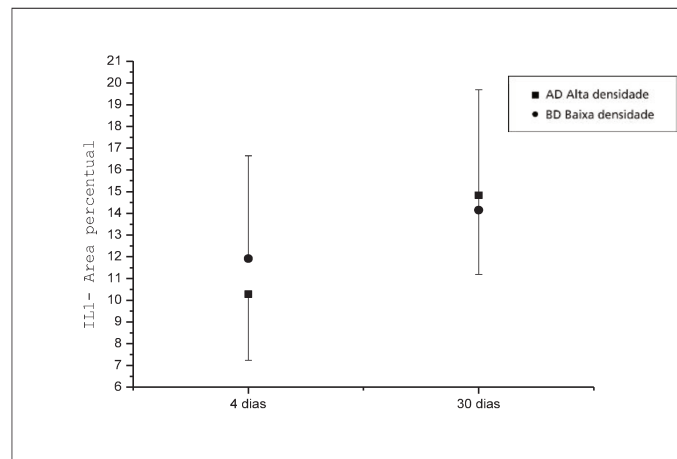


Figura 5. Evolução do valor médio e desvio padrão da área percentual imunomarcada para IL-1.

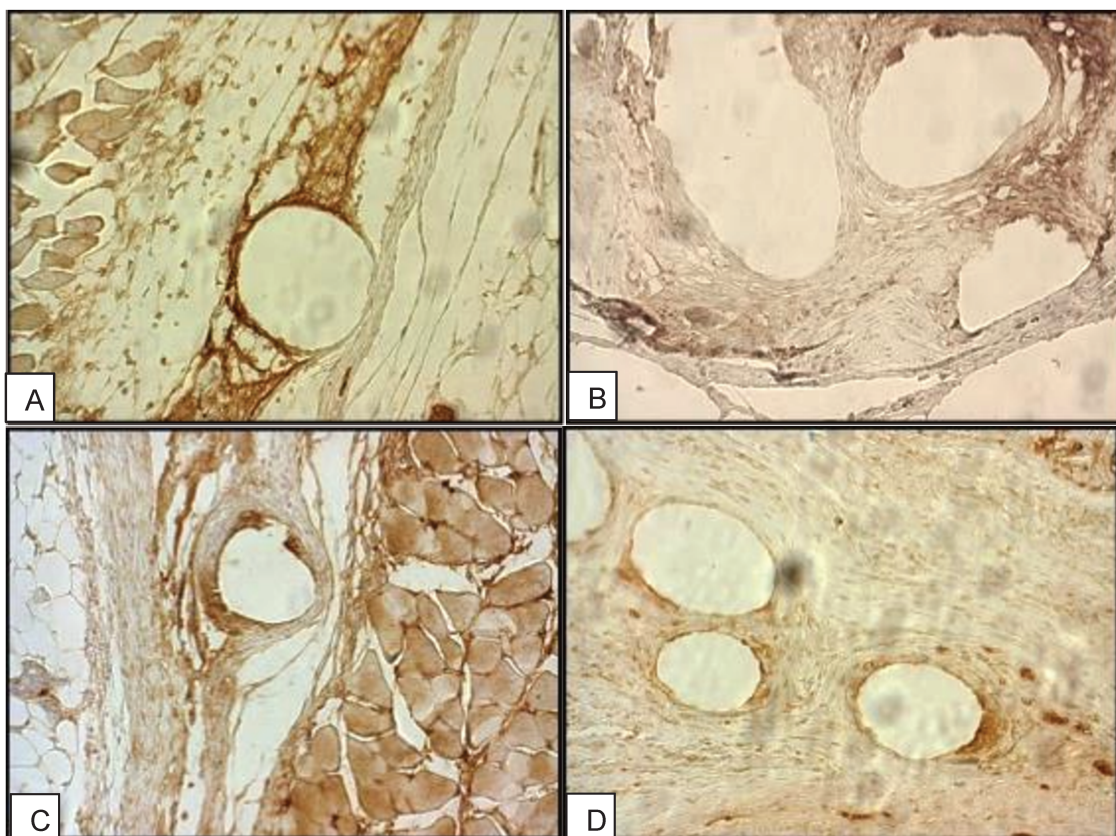


Figura 6. Lâminas imunomarcadas para IL-1 (400x). A) Alta densidade - 4 dias. B) Alta densidade - 30 dias. C) Baixa densidade - 4 dias. D) Baixa densidade - 30 dias. Não foram identificadas diferenças quanto ao tipo de implante. Houve aumento da imunomarcagem no grupo eutanasiado com 30 dias.

## 4.2. Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )

Não foram identificadas diferenças significativas na quantificação do mediador inflamatório TNF- $\alpha$  entre os grupos AD e BD, nem quanto ao tempo de eutanásia.

Tabela 2: Análise de imunohistoquímica para TNF				
Eutanásia	4 Dias		30 Dias	
Tipo de implante	AD	BD	AD	BD
N	8	8	7	7
Média	12,22	11,22	13,31	11,64
Mediana	11,01	10,27	13,3	11,58
Desvio padrão	4,06	4,74	2,27	3,43
Resultados ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos: Quanto ao tempo eutanásia: p-valor=0,5509 Quanto ao tipo de implante: p-valor=0,2461 Quanto à interação eutanásia e tipo: p-valor=0,7543				

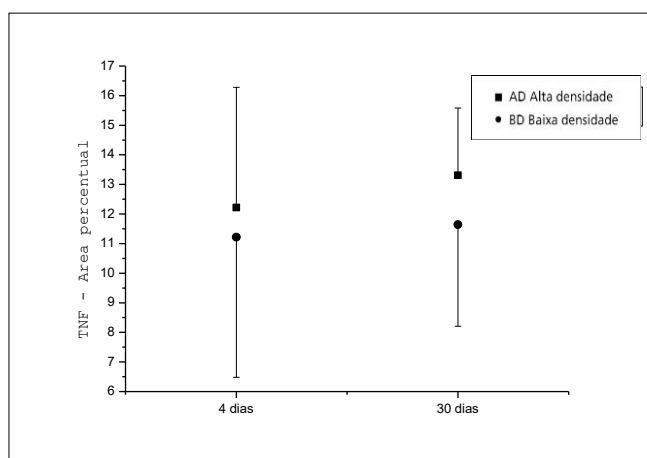


Figura 7. Evolução do valor médio e desvio padrão da área percentual imunomarcada para TNF- $\alpha$ .

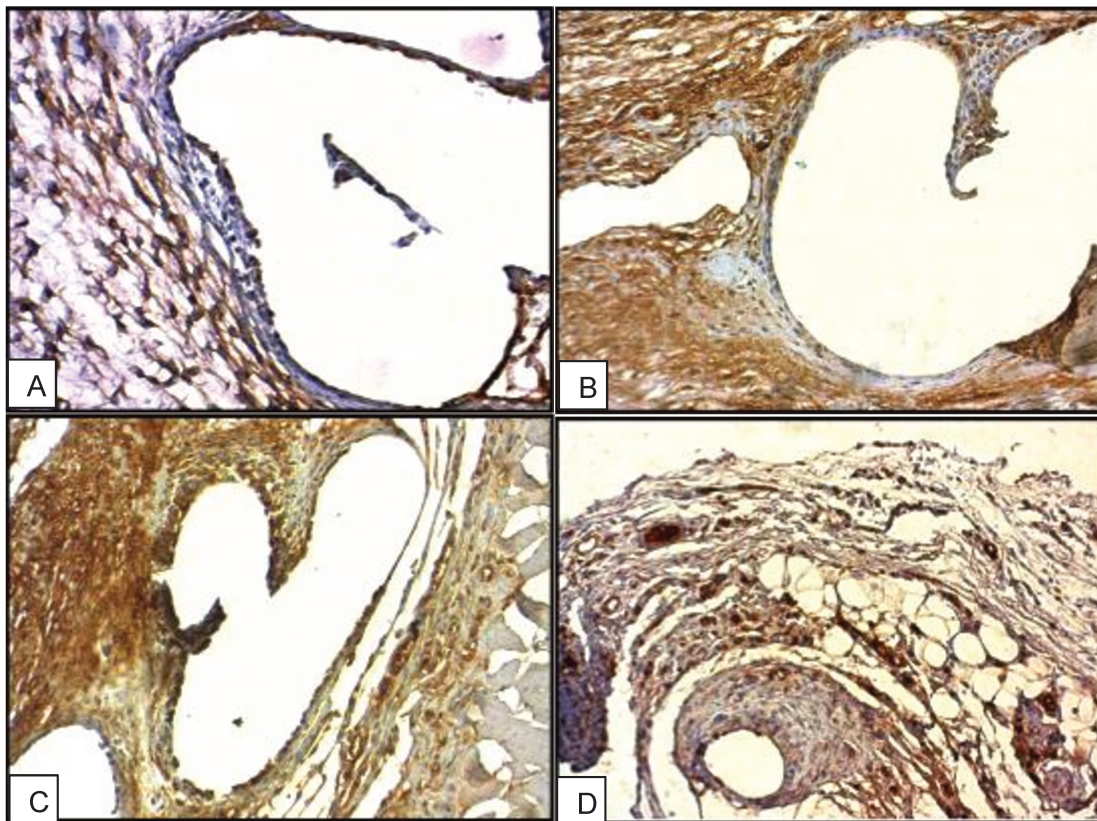


Figura 8. Lâminas imunomarcadas para TNF (400x). A) Alta densidade - 4 dias. B) Alta densidade - 30 dias. C) Baixa densidade - 4 dias. D) Baixa densidade - 30 dias. Não foram identificadas diferenças quanto ao tipo de implante e nem quanto ao tempo de eutanásia.

#### 4.3. Metaloproteinase tipo 2 (MMP-2)

Não houve diferença significativa entre os grupos AD e BD na imunorreatividade à MMP2, porém observou-se maior marcação no grupo BD eutanasiado após 30 dias do implante (BD: 30dias > 4 dias,  $p < 0,001$ ).

Tabela 3: Análise de imunohistoquímica para MMP2				
Eutanásia	4 Dias		30 Dias	
Tipo de implante	AD	BD	AD	BD
N	9	9	7	7
Média	14,56	15,18	15,1	20,87
Mediana	14,68	13,31	16,2	20,3
Desvio padrão	4,91	5,94	4,18	5,94
Resultados ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos:				
Quanto ao tempo eutanásia: p-valor=0,2278				
Quanto ao tipo de implante: p-valor=0,1115				
Quanto à interação eutanásia e tipo: p-valor=0,1854				

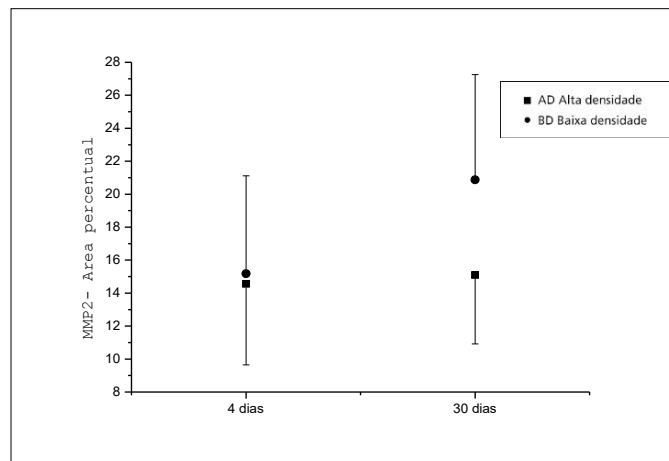


Figura 9. Evolução do valor médio e desvio padrão da área percentual imunomarcada para MMP2.



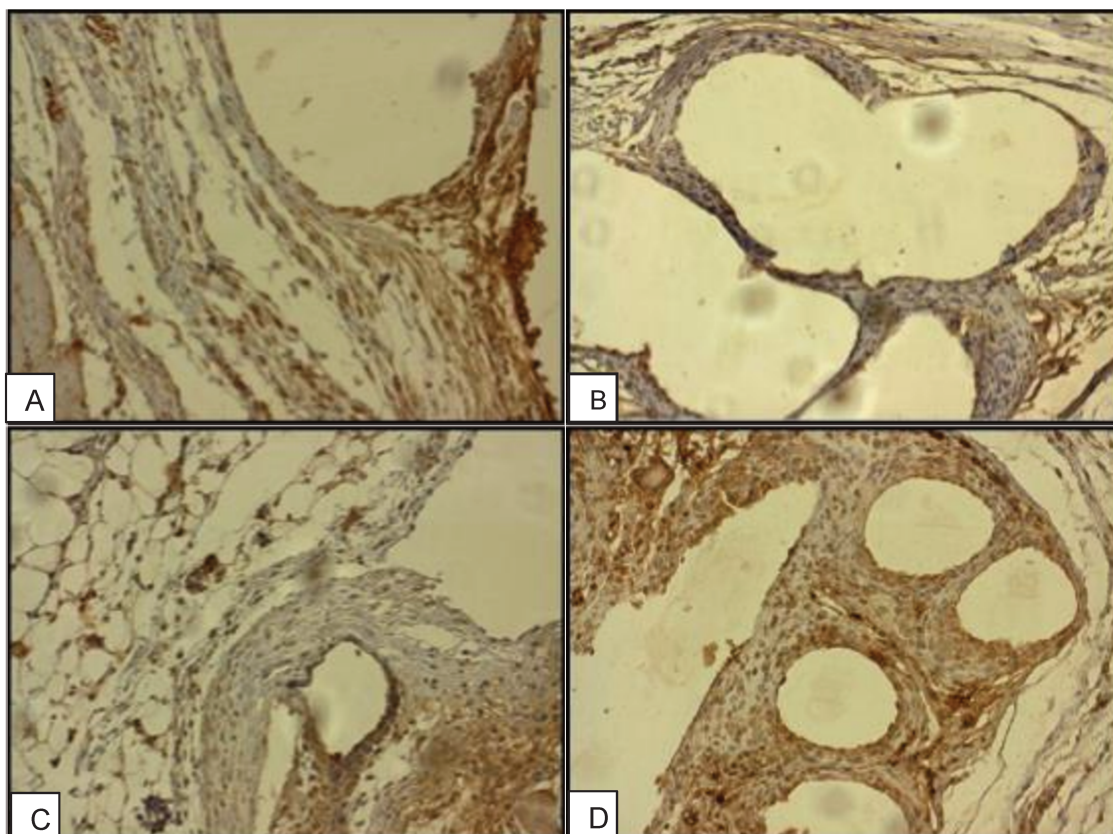


Figura 10. Lâminas imunomarcadas para MMP2 (400x). A) Alta densidade - 4 dias. B) Alta densidade - 30 dias. C) Baixa densidade - 4 dias. D) Baixa densidade - 30 dias. Não foram identificadas diferenças quanto ao tipo de implante. Houve aumento da imunomarcação no grupo eutanasiado com 30 dias.

#### 4.4. Metaloproteinase tipo 3 (MMP-3)

A metaloproteinase MMP-3 também não mostrou diferença significativa na imunorreatividade entre os grupos AD e BD, porém esta mostrou-se aumentada nos grupos eutanasiados após 30 dias (30dias > 4 dias, p 0,02).

Tabela 4: Análise de imunohistoquímica para MMP3				
Eutanásia	4 Dias		30 Dias	
Tipo de implante	AD	BD	AD	BD
N	9	9	7	7
Média	10,68	11,81	15,77	16,34
Mediana	8,91	10,67	13,68	17,19
Desvio padrão	4,02	3,81	5,81	8,68
Resultados ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos: Quanto ao tempo eutanásia: p-valor=0,020 Quanto ao tipo de implante: p-valor=0,8844 Quanto à interação eutanásia e tipo: p-valor=0,8223				

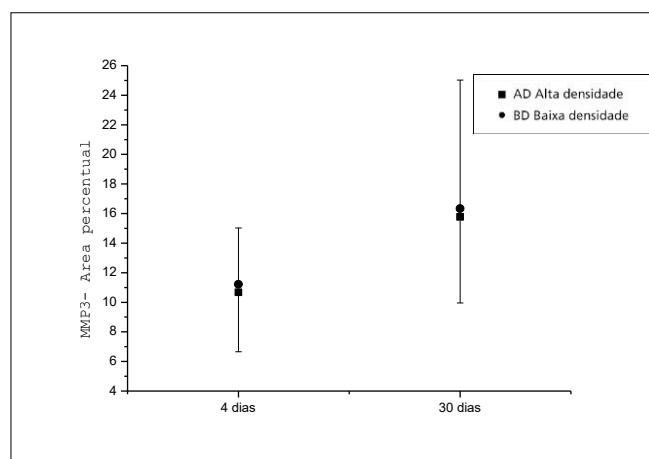


Figura 11. Evolução do valor médio e desvio padrão da área percentual imunomarcada para MMP3.

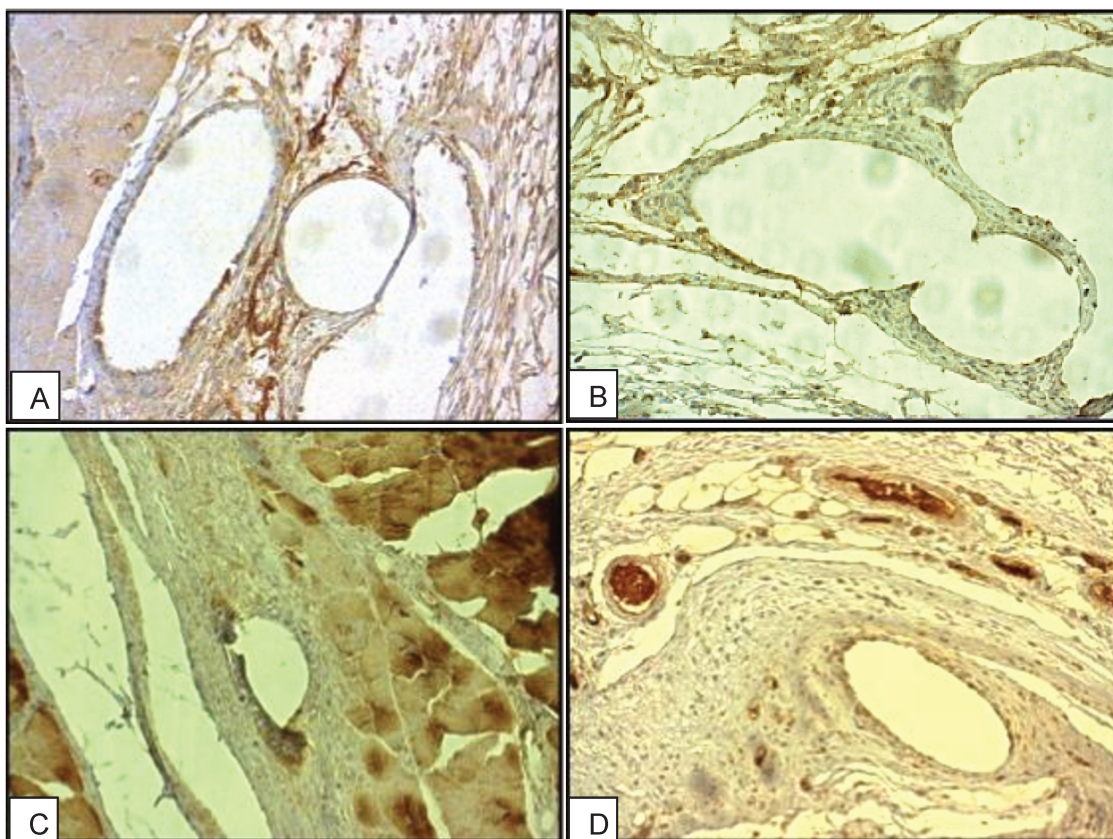


Figura 12. Lâminas imunomarcadas para MMP3 (400x). A) Alta densidade - 4 dias. B) Alta densidade - 30 dias. C) Baixa densidade - 4 dias. D) Baixa densidade - 30 dias. Não foram identificadas diferenças quanto ao tipo de implante. Houve aumento da imunomarcção no grupo eutanasiado com 30 dias.



## 5. Discussão

---

Os estudos em animais são imprescindíveis para o desenvolvimento dos biomateriais. O uso de animais menores, como ratos, corresponde uma fase inicial do experimento *in vivo*, sendo a reprodução dos experimentos em animais de porte maior uma fase subsequente. O subcutâneo abdominal em relação ao tecido vaginal apresentam atividades biológicas semelhantes, apesar de aparentemente mais intensas na vagina. Desta forma, devido a dificuldade de acesso vaginal nesses animais de pequeno porte, permite-se o uso do tecido subcutâneo abdominal, como no presente estudo, em fases iniciais (46).

Qualquer procedimento cirúrgico gera uma injúria local que desencadeia o processo fisiológico da cicatrização, ou seja, o reparo tecidual, que pode ser dividido didaticamente em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação.

Na fase inflamatória ocorre o processo de hemostasia, pois a matriz extracelular ativa as plaquetas e, além disso, ocorre a migração de leucócitos e o início do processo de reparo. As plaquetas secretam PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- $\beta$  (fator de crescimento beta) que atraem neutrófilos e monócitos, que serão ativados na fase proliferativa. Nesta fase ocorrerá, também, a migração de neutrófilos para a ferida, mediadas por IL-1 e TNF- $\alpha$ , secretados por macrófagos e pelo endotélio. (44, 45)

Na fase proliferativa ocorre a migração e proliferação de fibroblastos e

a síntese de novos componentes da matriz extracelular. Nesta fase observa-se predominância do colágeno tipo III em relação ao colágeno tipo I. Os fibroblastos são os principais responsáveis pela produção de TGF- $\beta$ , TIMPs (inibidores de metaloproteinases) e KGF (fator de crescimento dos queratinócitos).(44)

Na remodelação ou terceira fase da cicatrização há mudança do tipo de colágeno e de sua disposição. Progressivamente, há degradação do colágeno III e substituição pelo colágeno tipo I, mais resistente, produzido pelos fibroblastos e mediados pelas MMPs .(44, 45)

As fases da cicatrização são interpostas, como mostra o esquema a seguir (Figura 13), sendo a constituição da matriz extracelular um processo dinâmico que leva ao reparo tecidual. (50)

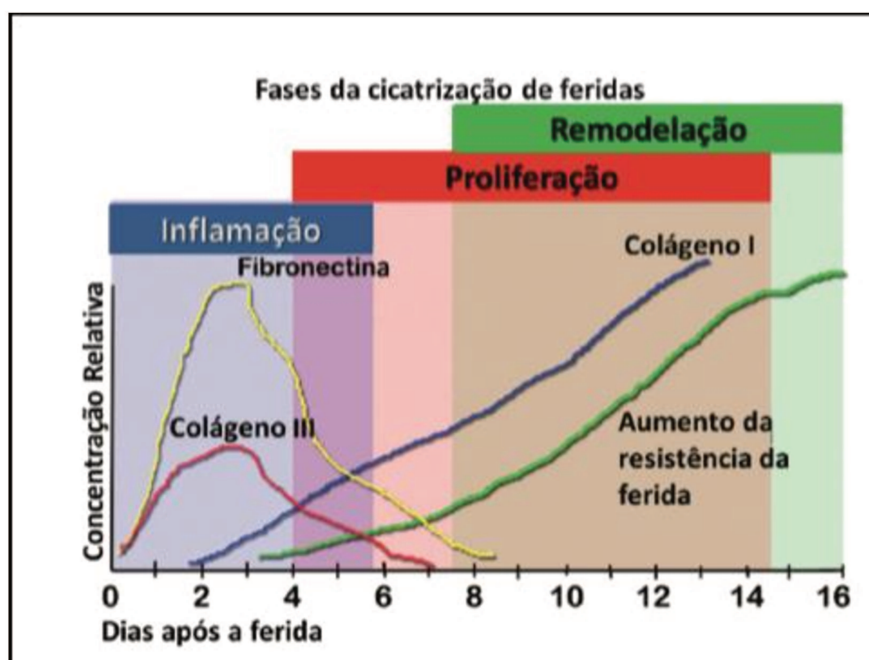


Figura 13. Fases da cicatrização

Várias cascatas enzimáticas são ativadas durante o reparo tecidual, incluindo as metaloproteinases. O desequilíbrio nesse processo pode produzir uma cicatrização inadequada, hipertrófica, como nos queloides, ou insuficientes, como em feridas crônicas, por exemplo. Nesse sentido, as MMPs estão sendo estudadas como marcadores de doenças como esclerose múltipla, diabetes, doenças cardiovasculares, entre outras (24).

A quantificação de MMP2 e MMP3 relacionadas às fases de angiogênese e remodelamento tecidual, respectivamente, podem auxiliar a explicar a interação implante-hospedeiro.

Tanto a intolerância ao material implantado quanto infecções locais são o foco dos estudos de biomateriais, pois podem explicar as complicações. O material mais utilizado para confecção das telas é o polipropileno, que é um polímero hidrofóbico e inabsorvível.

A evidência demonstrada no presente estudo, da ausência de diferença significativa na expressão imunohistoquímica de alguns desses marcadores inflamatórios entre as telas de alta e baixa densidade reforça os achados previamente apresentados em estudos que não relacionaram a densidade das telas às complicações locais. Dessa forma, Utiyama et al (30) concluíram no seu estudo, no qual comparou telas de baixa e alta densidades implantadas no abdome de 30 ratas e eutanasiadas após 21 dias, que não houve diferença de resposta inflamatória (fibrose ou infiltração de células gigantes, macrófagos, neutrófilos ou linfócitos), retração da tela, aderências ou outras complicações.

Estudos apontam que telas de baixa densidade são mais maleáveis. Essa característica poderia explicar a tendência desses implantes causarem menos dor crônica quando empregados para correção de hérnias abdominais, como também sem terem apresentado, entretanto, diferenças significativas em relação às complicações ou recidivas (32,33, 34).

Deffieux et al. apresentaram estudo comparativo com 138 mulheres que submeteram-se à correção de prolapso vaginal anterior, no qual não se evidenciou diferença significativa entre tela de baixa ou alta densidade. Na análise multifatorial, evidenciou-se apenas a idade da paciente como fator associado ao risco maior de defeitos de integração (35).

Na fase inicial da inflamação, os fibroblastos aumentam a produção de metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs), que têm papel importante na remodelação tecidual. Estudo anterior evidenciou o papel da MMP-2 na cicatrização de feridas, incluindo feridas naturais e feridas crônicas geradas após implante de biomaterial. Quanto mais intensa a reação ao corpo estranho, maior seria a expressão do MMP-2. Da mesma forma, com a estabilização dessa reação ao longo do tempo observou-se diminuição da expressão de MMP-2 ao redor da tela. (38)

No presente estudo, o fato da metaloproteinase MMP-2 não ter apresentado expressão significativa no grupo eutanasiado em quatro dias, condiz com o trabalho de Iba et al. Esses autores observaram ainda que, em roedores, os níveis de MMP-2 e MMP-9 estão aumentados 10 a 15 dias após a lesão, coincidindo com a ativação da angiogênese (27).

A MMP-3, é uma enzima relacionada à fase de remodelação e, desta

forma, o aumento de sua expressão em fases mais tardias também já era esperada, sendo condizente com o resultado do estudo (30 dias > 4dias). Porém, não observamos diferença significativa entre os grupos AD e BD. De forma contrária, em outro estudo, utilizando-se 49 macacas Rhesus, foi demonstrado que a tela de maior densidade, menos porosa e rígida, a degradação de colágeno e elastina vaginal excedeu a síntese, muito provavelmente como resultado de um aumento da atividade das MMPs, resultando em um tecido estruturalmente comprometido (31).

Jansen et al, implantou em 72 camundongos telas de PP monofilamentar de alta e de baixa densidade, além de tela de PP multifilamentar e implantes absorvíveis, não encontrando diferença no número de macrófagos, fibroblastos e expressão da MMP-2, concluindo que esses parâmetros dependem da localização e tipo celulares mas são independentes da estrutura da tela implantada. (39)

No presente estudo não foi encontrada diferença entre as telas de alta e baixa densidade na análise quantitativa dos marcadores inflamatórios e do metabolismo do colágeno analisados. Dessa forma, a diferença de densidade entre as telas pode não interferir na reação de corpo estranho, levando-nos a inferir que a ocorrência de eventos adversos após implante de próteses de PP pode ser influenciada por outros fatores, não exclusivamente relacionados à quantidade de material implantado.

Um estudo multicêntrico com 487 mulheres que submeteram-se a correção de POPs com telas de alta e baixa densidade, não evidenciou diferença na eficácia anatômica aos 24 meses, porém as telas de baixa

densidade tiveram menor taxa de extrusão vaginal. (49) No presente estudo, concluímos que telas de polipropileno de alta e baixa densidade tem aspectos relacionados tanto às citocinas pró-inflamatórias quanto ao metabolismo do colágeno semelhantes, o que sugere resposta inflamatória local e reparo tecidual equivalentes. Portanto, a tela de menor densidade, do ponto de vista teórico, teria a mesma eficiência para corrigir POPs que as telas de alta densidade, sem agregar maior risco de complicações, como extrusão vaginal e dispareunia, por exemplo.

O estudo histológico e imunohistoquímico da reação inflamatória aos biomateriais implantados pode colaborar com a melhor compreensão dessa interação e esclarecer quais os parâmetros levariam a melhor integração tecidual e, conseqüentemente, menores taxas de complicações. Entretanto, como a reação inflamatória aos bioimplantes envolve eventos dinâmicos, multiplicidade de mediadores, além de depender de características idiossincráticas do hospedeiro, as evidências do presente estudo experimental devem ser consideradas com cautela.

O presente estudo apresenta limitações, tais como a não utilização do sítio vaginal, ausência de contagem diferencial de células inflamatórias, ausência de diferenciação proporcional entre colágeno tipo I e III, ausência de quantificação de imunomarcação de citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF- $\beta$  e da quantificação de TIMPs (inibidores de metaloproteinases) e ausência da quantificação de vasos (avaliação da angiogênese).

## ***6. Conclusão***

---

- Implantes de telas de alta densidade e de baixa densidade no tecido subcutâneo abdominal de ratas adultas não associam-se com diferença significativa na reatividade imunohistoquímica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- $\alpha$ .
- Implantes de telas de alta densidade e de baixa densidade no tecido subcutâneo abdominal de ratas adultas não associam-se com diferença significativa na reatividade imunohistoquímica das metaloproteinases MMP-2 e MMP-3

## *7. Referências Bibliográficas*

---

1. Casanova AB, Trindade EN, Trindade MR. Collagen in the transversalis fascia of patients with indirect inguinal hernia: a case-control study. *Am J Surg* 2009; 198(1):1-5.
2. Wolwacz Jr I, Trindade MRM, Cerski CT. The collagen in transversalis fascia of direct inguinal hernia patients treated by videolaparoscopy. *Acta Cir Bras* 2003;18:196-202.
3. Trindade EN, Trindade MR. Use of screens in the surgery of inguinal hernia. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56(2):139.
4. Porrero CJ. *Cirurgia de la pared abdominal*. Barcelona, Spain: Masson, S.A; 1997.
5. Strassmann V, Santoro S, Malzoni CE, Velhote MCP, Macedo M, Posso IPP. Avaliação da Hernioplastia Protética Atensional no tratamento das Hérnias Inguinais. *Rev Col Bras Cir* 1997; 25(3):155-60.
6. Ozdogan M, Yildiz F, Gurer A, Orhun S, Kulacoglu H, Aydin R. Changes in collagen and elastic fiber contents of the skin, rectus sheath, transversalis fascia and peritoneum in primary inguinal hernia patients. *Bratisl Lek Listy* 2006; 107(6-7):235-8.
7. DeCherney AH, Nathan L. Relaxamento das estruturas de sustentação da pelve. In: *Current obstetric & gynecologic diagnosis and treatment*. 9<sup>ed</sup>. Mac Graw Hill Companies; 2003. p.661-79.
8. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, et al. The standartization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standartization Sub-committee of the Internacional Continence Society Neurolo Urodyn 2002; 21:167-78.



9. Rortveit G, Brown JS, Thom DH, Van Den Eeden SK, Creasman JM, Subak LL. Symptomatic pelvic organ prolapse: prevalence and risk factors in a population-based, racially diverse cohort. *Obstet Gynecol* 2007; 109 (6): 1396-403.
10. Reynoldsb WS, Dmochowski RR, Penson DF. Epidemiology of stress urinary incontinence in women. *Curr Urol Rep* 2011; 12(5):370-6.
11. Minassian V, Drutz H, Al-Badr A: Urinary incontinence as a worldwide problem. *Int J Obstet Gynecol* 2002, 82:327-38.
12. Palma P, Riccetto CLZ, Herrmann V. Incontinência urinária de esforço em mulheres. In: *Urologia Prática - Neto Junior NR- 5<sup>ed</sup>*. São Paulo: Roca Ltda; 2008.p.98-110.
13. Sampaio F, Riccetto CLZ. Anatomia Cirúrgica da Pelve Feminina. In: Palma P, Neto Junior NR. *Uroginecologia Ilustrada*. 1. <sup>ed</sup>. São Paulo: Roca Ltda; 2005.p.3-10
14. Petros P, Riccetto CLZ. Aplicações Clínicas da Teoria Integral da Continência. In: Palma P, Neto Junior NR. *Uroginecologia Ilustrada*. 1. <sup>ed</sup>. São Paulo: Roca Ltda; 2005.p.11-20.
15. Morgan JE. A sling operation, using Marlex polypropylene mesh, for treatment of recurrent stress incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 1970; 106(3):369-77.
16. Ulmsten U, Falconer C, Johnson P, Joamaa M, Lanner L, Nilsson CG, Olsson I. A multicenter study of tension-free vaginal tape (TVT) for surgical treatment of stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1998; 9(4):210-3.
17. Dällenbach P1. To mesh or not to mesh: a review of pelvic organ reconstructive surgery. *Int J Womens Health* 2015; 7:331-43.
18. Barber MD, Brubaker L, Burgio KL, et al. Comparison of 2 transvaginal surgical approaches and perioperative behavioral therapy for apical

vaginal prolapse: the OPTIMAL randomized trial. JAMA 2014; 311:1023-34.

19. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol* 1997; 89:501-6.
20. Debodinance P1, Delporte P, Engrand JB, Boulogne M. Development of better tolerated prosthetic materials: applications in gynecological surgery. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2002; 31(6):527-40.
21. U. S. Food and Drug Administration. FDA Safety Communication: UPDATE on Serious Complications Associated with Transvaginal Placement of Surgical Mesh for Pelvic Organ Prolapse. July 2011. Available at.: <http://www.fda.gov/medicaldevices/safety/alertsandnotices/ucm262435.htm>
22. Major MR, Wong VW, Nelson ER, Longaker MT, Gurtner GC. The Foreign Body Response: At the Interface of Surgery and Bioengineering. *Plast Reconstr Surg* 2015 May;135(5):1489-98.
23. Woessner JF Jr. MMPs and TIMPs--an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002; 22(1):33-49.
24. Araujo RVS, Silva FO, Melo Jr MR, Porto ALF, Metalloproteinases: systemic physio-pathological aspects and its importance in the wound healing. *Rev Cien Med Biol* 2010. Review
25. Jinga DC, Blidaru A, Condrea I, Ardeleanu C, Dragomir C, Szegli G. et al. MMP-9 and MMP-2 gelatinases and TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors in breast cancer: correlations with prognostic factors. *J Cell Mol Med* 2006; 10(2):499-510.
26. Monteiro, F. M. et al. Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochem*. 2007;42(5):884-8.

27. Iba Y, Shibata A, Kato M, Maskawa T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. *Int Immunopharmacol* 2004; (14):1873-80.
28. Parks WC, Mecham RP. *Matrix metalloproteinases*. San Diego: Academic Press; 1998.
29. Tomas D, Krušlin B. The potential value of (Myo) fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2004; 61:324-31.
30. Utiyama EM, Rosa MB, Andres MP, Miranda JS, Damous SH, Birolini CA, Damous LL, Montero EF. Polypropylene and polypropylene/ polyglecaprone (Ultrapro®) meshes in the repair of incisional hernia in rats. *Acta Cir Bras* 2015; 30(6):376-81.
31. Liang R, Zong W, Palcsey S, Abramowitch S, Moalli PA. Impact of prolapse meshes on the metabolism of vaginal extracellular matrix in rhesus macaque. *Am J Obstet Gynecol* 2015; 212(2):174-7.
32. Schmidbauer S, Ladurner R, Hallfeldt KK, Mussack T. Heavy-weight versus low-weight polypropylene meshes for open sublay mesh repair of incisional hernia. *Eur J Med Res* 2005; 10(6):247-53.
33. Berrevoet F, Maes L, De Baerdemaeker L, Rogiers X, Troisi R, de Hemptinne B. Comparable results with 3-year follow-up for large-pore versus small-pore meshes in open incisional hernia repair. *Surgery* 2010; 148(5):969-75.
34. Zhong C, Wu B, Yang Z, Deng X, Kang J, Guo B, Fan Y. A meta-analysis comparing lightweight meshes with heavyweight meshes in Lichtenstein inguinal hernia repair. *Surg Innov* 2013; 20(1):24-31.
35. Deffieux X, de Tayrac R, Huel C, Bottero J, Gervaise A, Bonnet K, Frydman R, Fernandez H. Vaginal mesh erosion after transvaginal repair of cystocele using Gynemesh or Gynemesh-Soft in 138 women: a comparative study. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2007; 18(1):73-9.

36. Conover W.J., Iman R.L. Rank Transformations as a Bridge Between Parametric and Nonparametric Statistics. *Am Stat* 1982; 35(3):124-9.
37. Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments. 3<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons. New York. 1991.
38. Wu M-P (2010) Regulation of Extracellular Matrix Remodeling Associated With Pelvic Organ Prolapse. 2:11–16. doi: 10.1016/S1878-3317(10)60003-4
39. Jansen PL, Kever M, Rosch R, Krott E, Jansen M, Alfonso-Jaume A, Dooley S, Klinge U, Lovett DH, Mertens PR. Polymeric meshes induce zonal regulation of matrix metalloproteinase-2 gene expression by macrophages and fibroblasts. *FASEB J*. 2007 Apr;21(4):1047-57. Epub 2007 Jan 10. PMID:172154
40. Herschorn S. The use of biological and synthetic materials in vaginal surgery for prolapse. *Current Opinion in Urology* [Internet]. 2007 Nov;17(6):408–14.
41. Jia X, Glazener C, Mowatt G, MacLennan G, Bain C, Fraser C, et al. Efficacy and safety of using mesh or grafts in surgery for anterior and/or posterior vaginal wall prolapse: systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2008 Oct;115(11):1350–61.
42. Maher CM, Feiner B, Baessler K, Glazener CMA. Surgical management of pelvic organ prolapse in women: the updated summary version Cochrane review. *Int Urogynecol J* [Internet]. 2011 Nov;22(11):1445–57.
43. Grotenhuis N, Bayon Y, Lange JF, Van Osch GJVM, Bastiaansen-Jenniskens YM. A culture model to analyze the acute biomaterial-dependent reaction of human primary macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013 Mar 29;433(1):115–20.
44. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):12S-34S.

45. Williamson, Harding. Wound healing. 2004 Dec 1;32(12):4–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135730390670696X>.
46. Pierce LM, Rao A, Baumann SS, Glassberg JE, Kuehl TJ, Muir TW. Long-term histologic response to synthetic and biologic graft materials implanted in the vagina and abdomen of a rabbit model. YMOB. Mosby, Inc; 2009 May 1;200(5):546.e1–546.e8.
47. Gerullis H, Georgas E, Borós M, Klosterhalfen B, Eimer C, Arndt C, et al. Inflammatory reaction as determinant of foreign body reaction is an early and susceptible event after mesh implantation. Biomed Res Int. 2014;2014:510807
48. Foreign body reaction to biomaterials. 2008 Apr;20(2):86–100. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532307000966>
49. Moore RD, Lukban JC. Comparison of vaginal mesh extrusion rates between a lightweight type I polypropylene mesh versus heavier mesh in the treatment of pelvic organ prolapse Int Urogynecol J. 2012 Oct;23(10):1379-86. Epub 2012 May 10.
50. Witte MB & Barbul A. General principles of wound healing. Surg Clin North Am. 1997; 77(3):509-28.

## 8. Anexos

### ANEXO I

#### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

 UNICAMP	 CEUA/Unicamp
<hr/>	
<p>Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp</p>	
<p><b>CERTIFICADO</b></p>	
<p>Certificamos que o projeto "<u>ANÁLISE QUANTITATIVA E AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO DE TELAS DE POLIPROPILENO MONOFILAMENTAR RECOBERTAS COM MATRIZ POLIMÉRICA ELUIDORA DE S-NITROSOGLUTATIONA IMPLANTADAS NO SUBCUTÂNEO DE RATAS ADULTAS</u>" (protocolo nº <u>2400-1</u>), sob a responsabilidade de <u>PROF. DR. CÁSSIO LUÍS ZANETTINI RICETTO / ALESSANDRO PRUDENTE</u>, está de acordo com os <u>Princípios Éticos na Experimentação Animal</u> adotados pela <u>Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)</u> e com a legislação vigente, <u>LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008</u>, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o <u>DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009</u>.</p>	
<p>O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em <u>04 de maio de 2011</u>.</p>	
 Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 Fátima Alonso Secretária Executiva
<small>CEUA/UNICAMP Caixa Postal 5109 13083-970 Campinas, SP – Brasil</small>	<small>Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: <a href="mailto:comisib@unicamp.br">comisib@unicamp.br</a> <a href="http://www.lb.unicamp.br/ceea/">http://www.lb.unicamp.br/ceea/</a></small>

## ANEXO II

**Tabelas geradas pelo Software AxioVision a partir das áreas imunomarcadas para IL-1, TNF- $\alpha$ , MMP2 e MMP3.**

Tabela 5: Telas de alta densidade, IHQ para IL-1, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâminas	Área percentual	Densidade média
A71_AD_IL1_20X_1.jpg	12,96441799	72,31302452
A71_AD_IL1_20X_2.jpg	10,95756271	71,82248316
A71_AD_IL1_20X_3.jpg	11,64798285	75,05333701
A72_AD_IL1_20X_1.jpg	11,06015819	71,7464348
A72_AD_IL1_20X_2.jpg	11,8275432	75,08837275
A72_AD_IL1_20X_3.jpg	9,698668668	70,65063733
A73_AD_IL1_20X_1.jpg	10,96522999	72,5283823
A73_AD_IL1_20X_2.jpg	2,674857754	72,99582321
A73_AD_IL1_20X_3.jpg	7,627335234	69,01043532
A73_AD_IL1_20X_3.jpg	7,627335234	69,01043532
A74_AD_IL1_20X_1.jpg	11,64637637	116,4075251
A74_AD_IL1_20X_2.jpg	8,503303502	116,656107
A74_AD_IL1_20X_3.jpg	8,378509423	114,0811661
A75_AD_IL1_20X_1.jpg	21,98157517	94,93190667
A75_AD_IL1_20X_2.jpg	7,240758374	71,88932926
A75_AD_IL1_20X_3.jpg	6,490022315	72,14769684
A76_AD_IL1_20X_1.jpg	6,596414927	69,41137986
A76_AD_IL1_20X_2.jpg	2,798848594	69,47400141
A76_AD_IL1_20X_3.jpg	13,99614153	98,58705803
A77_AD_IL1_20X_1.jpg	4,998773236	112,7071696
A77_AD_IL1_20X_2.jpg	8,063201739	108,3435819
A77_AD_IL1_20X_3.jpg	6,523539274	111,2257967
A78_AD_IL1_20X_1.jpg	11,51961071	77,94884505
A78_AD_IL1_20X_2.jpg	9,025919781	81,00346262
A78_AD_IL1_20X_3.jpg	12,41982218	81,2631876
A79_AD_IL1_20X_1.jpg	9,094925284	94,75617217
A79_AD_IL1_20X_2.jpg	8,614661588	99,39424789
A79_AD_IL1_20X_3.jpg	9,713857181	94,80907635
A80_AD_IL1_20X_1.jpg	15,01669276	97,03826946
A80_AD_IL1_20X_2.jpg	12,45136755	99,16568533
A80_AD_IL1_20X_3.jpg	23,64413314	88,06878405

Tabela 6: Telas de alta densidade, IHQ para IL-1, animais eutanasiados após 30 dias.		
Lâminas	Área percentil	Densidade média
A81_AD_IL1_20X_1.jpg	19,30394259	116,1291842
A81_AD_IL1_20X_2.jpg	15,23130352	72,83330617
A81_AD_IL1_20X_3.jpg	17,54820892	73,89160893
A82_AD_IL1_20X_1.jpg	17,54338949	73,90479045
A82_AD_IL1_20X_2.jpg	14,29604164	89,58957595
A82_AD_IL1_20X_3.jpg	18,24322943	90,23269944
A83_AD_IL1_20X_1.jpg	16,81726174	89,46997243
A83_AD_IL1_20X_2.jpg	14,83216693	90,13713076
A83_AD_IL1_20X_3.jpg	22,52529472	97,81157893
A84_AD_IL1_20X_1.jpg	5,824575598	96,1643578
A84_AD_IL1_20X_2.jpg	21,61099006	96,48953719
A84_AD_IL1_20X_3.jpg	26,37616689	93,63880568
A85_AD_IL1_20X_1.jpg	14,01549228	95,39975825
A85_AD_IL1_20X_2.jpg	2,867342945	107,5513281
A85_AD_IL1_20X_3.jpg	11,74166968	99,2023794
A86_AD_IL1_20X_1.jpg	14,34365179	98,91142392
A86_AD_IL1_20X_2.jpg	9,172547347	103,4669225
A86_AD_IL1_20X_3.jpg	18,24593123	100,1318526
A87_AD_IL1_20X_1.jpg	13,27811919	88,86446177
A87_AD_IL1_20X_2.jpg	6,740705799	89,30131837
A87_AD_IL1_20X_3.jpg	10,77588473	80,5631662



Tabela 7: Telas de baixa densidade, IHQ para IL-1, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâminas	Área percentil	Densidade média
A71_BD_IL1_20X_1.jpg	10,6516018	85,86940337
A71_BD_IL1_20X_2.jpg	20,94861025	79,91883771
A71_BD_IL1_20X_3.jpg	10,0185037	88,56086415
A72_BD_IL1_20X_1.jpg	16,69049608	86,21152037
A72_BD_IL1_20X_2.jpg	15,31462128	83,90041816
A72_BD_IL1_20X_3.jpg	13,77342536	90,87034848
A73_BD_IL1_20X_1.jpg	6,803139349	74,72917159
A73_BD_IL1_20X_2.jpg	6,756551507	76,59372298
A73_BD_IL1_20X_3.jpg	11,29864705	74,50408453
A74_BD_IL1_20X_1.jpg	24,51396759	68,06653699
A74_BD_IL1_20X_2.jpg	15,41677863	66,46945426
A74_BD_IL1_20X_3.jpg	18,48975067	68,26940196
A75_BD_IL1_20X_1.jpg	4,622054305	104,8205918
A75_BD_IL1_20X_2.jpg	10,58186608	83,67779511
A75_BD_IL1_20X_3.jpg	23,91336414	86,75529722
A76_BD_IL1_20X_1.jpg	10,84803017	95,04367288
A76_BD_IL1_20X_2.jpg	3,686938463	89,87104633
A76_BD_IL1_20X_3.jpg	20,95693472	88,4862019
A77_BD_IL1_20X_1.jpg	2,828568424	121,1559789
A77_BD_IL1_20X_2.jpg	6,856518209	109,8400588
A77_BD_IL1_20X_3.jpg	1,834231987	72,00935547
A78_BD_IL1_20X_1.jpg	11,43760734	102,8634324
A78_BD_IL1_20X_2.jpg	11,66726058	98,57014107
A78_BD_IL1_20X_3.jpg	4,147340258	105,2441369
A79_BD_IL1_20X_1.jpg	17,30548481	98,0193847
A79_BD_IL1_20X_2.jpg	13,82651213	96,8582557
A79_BD_IL1_20X_3.jpg	19,33490379	94,47449043
A80_BD_IL1_20X_1.jpg	10,44341695	91,08913563
A80_BD_IL1_20X_2.jpg	7,237472398	88,8328894
A80_BD_IL1_20X_3.jpg	5,475604912	90,75118022

Tabela 8: Telas de baixa densidade, IHQ para IL-1, animais eutanasiados após 30 dias.		
Lâminas	Área percentil	Densidade média
A81_BD_IL1_20X_1.jpg	5,947106004	68,51648392
A81_BD_IL1_20X_2.jpg	30,65699081	63,88624075
A81_BD_IL1_20X_3.jpg	12,00944024	66,66961159
A82_BD_IL1_20X_1.jpg	9,524000771	74,21507817
A82_BD_IL1_20X_2.jpg	2,959642369	80,20900052
A82_BD_IL1_20X_3.jpg	2,740285194	80,11330509
A83_BD_IL1_20X_1.jpg	15,42992254	116,1646995
A83_BD_IL1_20X_2.jpg	10,08217862	115,906367
A83_BD_IL1_20X_3.jpg	12,03236906	112,9305247
A84_BD_IL1_20X_1.jpg	12,79106448	113,270723
A84_BD_IL1_20X_2.jpg	13,20765326	117,7370144
A84_BD_IL1_20X_3.jpg	28,69066257	105,7965213
A85_BD_IL1_20X_1.jpg	13,55961783	120,9030497
A85_BD_IL1_20X_2.jpg	19,75587387	120,616641
A85_BD_IL1_20X_3.jpg	18,22628839	120,2169342
A86_BD_IL1_20X_1.jpg	11,06410137	116,3584723
A86_BD_IL1_20X_2.jpg	8,476431517	114,454269
A86_BD_IL1_20X_3.jpg	7,699845778	116,3248677
A87_BD_IL1_20X_1.jpg	18,67215887	118,8563317
A87_BD_IL1_20X_2.jpg	21,34124791	120,2221933
A87_BD_IL1_20X_3.jpg	22,20202767	119,5703592

Tabela 9: Telas de alta densidade, IHQ para MMP2, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A71_AD_MMP2_20X_1.jpg	21,46706429	62,56858243
A71_AD_MMP2_20X_2.jpg	19,08874765	63,17602099
A71_AD_MMP2_20X_3.jpg	19,87161325	62,40028589
A72_AD_MMP2_20X_1.jpg	10,27941022	73,69874691
A72_AD_MMP2_20X_2.jpg	25,96417848	66,29488874
A72_AD_MMP2_20X_3.jpg	16,94950404	69,93616985
A73_AD_MMP2_20X_1.jpg	14,61894358	68,55926074
A73_AD_MMP2_20X_2.jpg	13,04883107	68,17737747
A73_AD_MMP2_20X_3.jpg	16,37540746	66,334518
A74_AD_MMP2_20X_1.jpg	27,4616344	65,07218241
A74_AD_MMP2_20X_2.jpg	20,34106974	63,3400033
A74_AD_MMP2_20X_3.jpg	17,8631515	64,43192521
A75_AD_MMP2_20X_1.jpg	16,55306925	68,11069889
A75_AD_MMP2_20X_2.jpg	17,17295043	66,85585689
A75_AD_MMP2_20X_3.jpg	17,46175124	61,4413815
A76_AD_MMP2_20X_1.jpg	7,266462011	63,03024791
A76_AD_MMP2_20X_2.jpg	7,152548165	61,95808108
A76_AD_MMP2_20X_3.jpg	17,93872896	65,41321241
A77_AD_MMP2_20X_1.jpg	8,52345749	73,82832298
A77_AD_MMP2_20X_2.jpg	9,642880093	74,12487221
A77_AD_MMP2_20X_3.jpg	8,70170345	75,69153114
A78_AD_MMP2_20X_1.jpg	4,680471662	73,13153502
A78_AD_MMP2_20X_2.jpg	11,02379339	67,96219016
A78_AD_MMP2_20X_3.jpg	10,60895713	67,0111092
A79_AD_MMP2_20X_1.jpg	15,3981581	95,43475395
A79_AD_MMP2_20X_2.jpg	23,99339592	89,81463514
A79_AD_MMP2_20X_3.jpg	12,46728628	82,48289737
A80_AD_MMP2_20X_1.jpg	17,74646283	82,69480723
A80_AD_MMP2_20X_3.jpg	7,281796567	69,6062013
A80_AD_MMP2_20X_2.jpg	8,051591289	69,89234829

Tabela 10: Telas de alta densidade, IHQ para MMP2, animais eutanasiados após 30 dias.

Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_AD_MMP2_20X_1.jpg	8,50710063	70,69586527
A81_AD_MMP2_20X_2.jpg	6,096143286	72,89432706
A81_AD_MMP2_20X_3.jpg	7,942788961	70,85627867
A82_AD_MMP2_20X_1.jpg	12,27874426	70,00640492
A82_AD_MMP2_20X_2.jpg	26,35608592	69,42174076
A82_AD_MMP2_20X_3.jpg	19,527462	72,4137873
A83_AD_MMP2_20X_1.jpg	9,524000771	65,16139296
A83_AD_MMP2_20X_2.jpg	15,52506981	64,17823799
A83_AD_MMP2_20X_3.jpg	14,18935694	66,44354843
A84_AD_MMP2_20X_1.jpg	16,51363753	68,45213512
A84_AD_MMP2_20X_2.jpg	17,7177653	66,88016667
A84_AD_MMP2_20X_3.jpg	19,76215373	66,02293503
A85_AD_MMP2_20X_1.jpg	13,14076538	65,91383497
A85_AD_MMP2_20X_2.jpg	16,16145389	67,0400544
A85_AD_MMP2_20X_3.jpg	9,94241509	67,85621745
A86_AD_MMP2_20X_1.jpg	11,16691591	71,08632934
A86_AD_MMP2_20X_2.jpg	19,60990349	66,76331694
A86_AD_MMP2_20X_3.jpg	17,83773995	69,33789094
A87_AD_MMP2_20X_1.jpg	14,38761085	69,10490682
A87_AD_MMP2_20X_2.jpg	24,31016404	68,88524767
A87_AD_MMP2_20X_3.jpg	16,60666717	68,02645314

Tabela 11: Telas de baixa densidade, IHQ para MMP2, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A71_BD_MMP2_20X_1.jpg	30,34022269	63,79208464
A71_BD_MMP2_20X_2.jpg	30,41674942	66,21495928
A71_BD_MMP2_20X_3.jpg	17,6962239	67,5538784
A72_BD_MMP2_20X_1.jpg	2,663977521	60,79488515
A72_BD_MMP2_20X_2.jpg	10,96544905	66,20359333
A72_BD_MMP2_20X_3.jpg	13,56889159	64,18932838
A73_BD_MMP2_20X_1.jpg	14,29772114	70,58521662
A73_BD_MMP2_20X_2.jpg	8,872063067	67,22170553
A73_BD_MMP2_20X_3.jpg	10,60691253	68,73246728
A74_BD_MMP2_20X_1.jpg	12,79055333	61,89314402
A74_BD_MMP2_20X_2.jpg	13,8459359	65,04062991
A74_BD_MMP2_20X_3.jpg	21,1221098	67,38982154
A75_BD_MMP2_20X_1.jpg	15,12491091	63,60319414
A75_BD_MMP2_20X_2.jpg	15,16112967	55,7878531
A75_BD_MMP2_20X_3.jpg	33,15491699	62,41194647
A76_BD_MMP2_20X_1.jpg	13,24934865	64,28193272
A76_BD_MMP2_20X_2.jpg	7,408635254	68,91440793
A76_BD_MMP2_20X_3.jpg	19,27641341	61,8143131
A77_BD_MMP2_20X_1.jpg	15,27884065	64,21785344
A77_BD_MMP2_20X_2.jpg	17,75456824	64,98912565
A77_BD_MMP2_20X_3.jpg	23,33408302	62,20613988
A78_BD_MMP2_20X_1.jpg	8,318777675	70,65826618
A78_BD_MMP2_20X_2.jpg	8,294972602	70,68873024
A78_BD_MMP2_20X_3.jpg	7,320863175	67,71745332
A80_BD_MMP2_20X_1.jpg	11,81863455	69,6784697
A80_BD_MMP2_20X_2.jpg	18,6460171	66,02432749
A80_BD_MMP2_20X_3.jpg	8,585306866	66,31091586

Tabela 12: Telas de baixa densidade, IHQ para MMP2, animais eutanasiados após 30 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_BD_MMP2_20X_1.jpg	14,87393534	84,27636824
A81_BD_MMP2_20X_2.jpg	17,43714292	84,63844988
A81_BD_MMP2_20X_3.jpg	16,88874999	80,48758237
A82_BD_MMP2_20X_1.jpg	30,34781694	69,95818576
A82_BD_MMP2_20X_2.jpg	29,21262165	78,89918111
A82_BD_MMP2_20X_3.jpg	8,707764251	81,03902758
A83_BD_MMP2_20X_1.jpg	37,05792665	77,47131186
A83_BD_MMP2_20X_2.jpg	29,22182239	75,59840822
A83_BD_MMP2_20X_3.jpg	21,05894603	80,98864744
A84_BD_MMP2_20X_1.jpg	35,8158276	80,36070641
A84_BD_MMP2_20X_2.jpg	22,90581077	79,75541706
A84_BD_MMP2_20X_3.jpg	27,3899271	80,09414998
A85_BD_MMP2_20X_1.jpg	19,79457536	84,42115553
A85_BD_MMP2_20X_2.jpg	14,00264046	86,00682103
A85_BD_MMP2_20X_3.jpg	15,42444591	79,13012295
A86_BD_MMP2_20X_1.jpg	15,27402122	81,16356952
A86_BD_MMP2_20X_2.jpg	16,04936559	77,38706669
A86_BD_MMP2_20X_3.jpg	5,962805669	79,30557937
A87_BD_MMP2_20X_1.jpg	19,92973852	84,39420875
A87_BD_MMP2_20X_2.jpg	14,86750943	80,95481425
A87_BD_MMP2_20X_3.jpg	26,0891186	79,03603626

**Tabela 13: Telas de alta densidade, IHQ para MMP3, animais eutanasiados após 4 dias.**

<b>Lâmina</b>	<b>Área percentil</b>	<b>Densidade média</b>
A71_AD_MMP3_20X_1.jpg	6,203412158	75,80815274
A71_AD_MMP3_20X_2.jpg	7,987332196	75,96625618
A71_AD_MMP3_20X_3.jpg	7,380156792	75,0582677
A72_AD_MMP3_20X_1.jpg	10,97304331	75,16424992
A72_AD_MMP3_20X_2.jpg	12,34738465	73,58121023
A72_AD_MMP3_20X_3.jpg	13,97533035	75,16932273
A73_AD_MMP3_20X_1.jpg	17,46372282	68,32298313
A73_AD_MMP3_20X_2.jpg	13,58955673	71,30998963
A73_AD_MMP3_20X_3.jpg	13,27461415	70,08076902
A74_AD_MMP3_20X_1.jpg	20,95028975	72,45642983
A74_AD_MMP3_20X_2.jpg	15,94983702	73,44473185
A74_AD_MMP3_20X_3.jpg	19,16206143	72,34503994
A75_AD_MMP3_20X_1.jpg	13,76911708	70,09146594
A75_AD_MMP3_20X_2.jpg	11,01897396	68,46078197
A75_AD_MMP3_20X_3.jpg	9,130121742	66,93870418
A77_AD_MMP3_20X_1.jpg	3,339428211	76,56133561
A77_AD_MMP3_20X_2.jpg	4,432197895	75,14695949
A77_AD_MMP3_20X_3.jpg	13,38816289	69,82706373
A78_AD_MMP3_20X_1.jpg	6,882586954	73,38526747
A78_AD_MMP3_20X_2.jpg	8,885718125	75,75186135
A78_AD_MMP3_20X_3.jpg	9,856030424	74,16558004
A79_AD_MMP3_20X_1.jpg	2,995788109	65,02683664
A79_AD_MMP3_20X_2.jpg	9,980751481	88,32252235
A79_AD_MMP3_20X_3.jpg	8,602393943	89,91277185
A80_AD_MMP3_20X_1.jpg	9,01511257	93,52601695
A80_AD_MMP3_20X_2.jpg	9,897506747	90,86765726
A80_AD_MMP3_20X_3.jpg	7,824420792	92,71269785

Tabela 14: Telas de alta densidade, IHQ para MMP3, animais eutanasiados após 30 dias.

Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_AD_MMP3_20X_1.jpg	9,843470692	103,7947731
A81_AD_MMP3_20X_2.jpg	10,22311049	102,0020143
A81_AD_MMP3_20X_3.jpg	11,54546039	99,1846942
A82_AD_MMP3_20X_1.jpg	19,91425792	99,91579549
A82_AD_MMP3_20X_2.jpg	24,16616525	99,75328227
A82_AD_MMP3_20X_3.jpg	25,77300768	103,2941833
A83_AD_MMP3_20X_1.jpg	17,35221869	105,934533
A83_AD_MMP3_20X_2.jpg	11,80614784	102,9109104
A83_AD_MMP3_20X_3.jpg	11,88055695	99,15367027
A84_AD_MMP3_20X_1.jpg	19,6092463	107,6996872
A84_AD_MMP3_20X_2.jpg	11,72290311	111,5234085
A84_AD_MMP3_20X_3.jpg	14,80828884	112,9815082
A85_AD_MMP3_20X_1.jpg	10,66598708	111,6408336
A85_AD_MMP3_20X_2.jpg	43,61775771	100,5945062
A85_AD_MMP3_20X_3.jpg	18,94445678	73,43295456
A86_AD_MMP3_20X_1.jpg	14,07317942	74,51761568
A86_AD_MMP3_20X_2.jpg	8,690896239	74,01417433
A86_AD_MMP3_20X_3.jpg	7,693638934	71,67390211
A87_AD_MMP3_20X_1.jpg	10,17856726	74,78365174
A87_AD_MMP3_20X_2.jpg	12,83027713	70,71299052
A87_AD_MMP3_20X_3.jpg	15,79006554	71,47880576



Tabela 15: Telas de baixa densidade, IHQ para MMP3, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A71_BD_MMP3_20X_0.jpg	8,346233833	75,14517314
A71_BD_MMP3_20X_2.jpg	27,66908904	89,6609486
A71_BD_MMP3_20X_3.jpg	15,48235212	70,79236785
A72_BD_MMP3_20X_1.jpg	10,11430816	62,27316242
A72_BD_MMP3_20X_2.jpg	11,8894656	63,19659626
A72_BD_MMP3_20X_3.jpg	13,05584115	69,49491594
A73_BD_MMP3_20X_1.jpg	9,182259233	94,19309407
A73_BD_MMP3_20X_2.jpg	11,49690096	96,4376957
A73_BD_MMP3_20X_3.jpg	5,655311306	98,31318192
A74_BD_MMP3_20X_1.jpg	16,69502343	86,41548609
A74_BD_MMP3_20X_2.jpg	15,2450316	95,96793183
A74_BD_MMP3_20X_3.jpg	16,97747135	85,55518948
A75_BD_MMP3_20X_1.jpg	7,033814887	86,47360498
A75_BD_MMP3_20X_2.jpg	4,88573565	87,90349435
A75_BD_MMP3_20X_3.jpg	6,016476616	89,37124513
A76_BD_MMP3_20X_1.jpg	5,566735989	88,99868825
A76_BD_MMP3_20X_2.jpg	8,094893155	84,26285451
A76_BD_MMP3_20X_3.jpg	10,2157353	85,43112938
A77_BD_MMP3_20X_1.jpg	11,54611758	84,56034379
A77_BD_MMP3_20X_2.jpg	14,01125702	85,39389091
A77_BD_MMP3_20X_3.jpg	6,459280181	84,59332783
A78_BD_MMP3_20X_1.jpg	17,32468951	87,39316092
A78_BD_MMP3_20X_2.jpg	17,50213223	86,71988535
A78_BD_MMP3_20X_3.jpg	5,648885397	87,91737225
A79_BD_MMP3_20X_1.jpg	12,64414483	81,73000069
A79_BD_MMP3_20X_2.jpg	5,11823673	65,70701364
A79_BD_MMP3_20X_3.jpg	8,002301644	65,06711501
A80_BD_MMP3_20X_1.jpg	1,526664603	69,63213278
A80_BD_MMP3_20X_2.jpg	11,49427218	89,1031199
A80_BD_MMP3_20X_3.jpg	11,56181725	81,56064396

Tabela 16: Telas de baixa densidade, IHQ para MMP3, animais eutanasiados após 30 dias.

Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_BD_MMP3_20X_1.jpg	10,27962928	91,08307583
A81_BD_MMP3_20X_2.jpg	25,13691568	86,9205552
A81_BD_MMP3_20X_3.jpg	17,74412613	74,51650219
A82_BD_MMP3_20X_1.jpg	15,4058984	99,99137821
A82_BD_MMP3_20X_2.jpg	15,50403956	94,99224288
A82_BD_MMP3_20X_3.jpg	19,61435782	94,89365623
A83_BD_MMP3_20X_1.jpg	4,178593544	104,8000839
A83_BD_MMP3_20X_2.jpg	5,096768352	105,772515
A83_BD_MMP3_20X_3.jpg	4,747943709	106,2792636
A84_BD_MMP3_20X_1.jpg	22,87996109	99,91496213
A84_BD_MMP3_20X_2.jpg	7,30384912	98,89242474
A84_BD_MMP3_20X_3.jpg	21,37812387	89,04618396
A85_BD_MMP3_20X_1.jpg	8,760631959	101,8853825
A85_BD_MMP3_20X_2.jpg	10,59004451	94,45931074
A85_BD_MMP3_20X_3.jpg	5,032582281	101,9804988
A86_BD_MMP3_20X_1.jpg	20,02875594	95,76394626
A86_BD_MMP3_20X_2.jpg	40,59224977	95,13706055
A86_BD_MMP3_20X_3.jpg	35,20281046	96,14731988
A87_BD_MMP3_20X_1.jpg	12,23317872	100,1486677
A87_BD_MMP3_20X_2.jpg	11,77328808	98,40957638
A87_BD_MMP3_20X_3.jpg	29,64607844	94,41740437

Tabela 17: Telas de alta densidade, IHQ para TNF, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A71_AD_TNF_20X_1.jpg	10,47145728	54,10674189
A71_AD_TNF_20X_1.tif	7,177083455	54,33687059
A71_AD_TNF_20X_2.jpg	16,3418905	55,22767265
A71_AD_TNF_20X_2.tif	15,50389352	58,59003198
A71_AD_TNF_20X_3.jpg	7,05287355	51,23850247
A72_AD_TNF_20X_1.jpg	6,299873819	60,16218096
A72_AD_TNF_20X_2.jpg	6,391662091	59,25692612
A72_AD_TNF_20X_3.jpg	5,07603019	52,75646632
A73_AD_TNF_20X_1.jpg	6,255695692	61,17569949
A73_AD_TNF_20X_2.jpg	10,80107722	64,49590308
A73_AD_TNF_20X_3.jpg	15,06532521	67,66690902
A74_AD_TNF_20X_1.jpg	18,28609316	67,36572558
A74_AD_TNF_20X_2.jpg	22,40765676	70,53799252
A74_AD_TNF_20X_3.jpg	11,20992569	62,5921962
A75_AD_TNF_20X_1.jpg	12,63844914	68,62032147
A75_AD_TNF_20X_2.jpg	8,486946642	65,33338783
A75_AD_TNF_20X_3.jpg	8,990650302	66,51472105
A76_AD_TNF_20X_1.jpg	6,343029641	60,87393081
A76_AD_TNF_20X_2.jpg	6,372384363	58,81650567
A76_AD_TNF_20X_3.jpg	7,177010433	60,71316362
A77_AD_TNF_20X_1.jpg	16,01796626	55,07020911
A77_AD_TNF_20X_2.jpg	18,97746258	56,00568707
A77_AD_TNF_20X_3.jpg	15,82372855	59,96567589
A78_AD_TNF_20X_1.jpg	5,395719176	65,393818
A78_AD_TNF_20X_2.jpg	10,64167085	68,88824769
A78_AD_TNF_20X_3.jpg	9,908240937	66,95666561
A80_AD_TNF_20X_1.jpg	17,08240352	67,66869999
A80_AD_TNF_20X_2.jpg	15,22305207	61,46801744
A80_AD_TNF_20X_3.jpg	16,21512484	63,98454915

Tabela 18: Telas de alta densidade, IHQ para TNF, animais eutanasiados após 30 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_AD_TNF_20X_1.jpg	19,56404587	70,97355564
A81_AD_TNF_20X_2.jpg	20,15924572	69,96320887
A81_AD_TNF_20X_3.jpg	8,425535395	70,04354157
A82_AD_TNF_20X_1.jpg	18,56693461	73,96933526
A82_AD_TNF_20X_2.jpg	12,41514879	72,02264439
A82_AD_TNF_20X_3.jpg	8,915364933	72,42979065
A83_AD_TNF_20X_1.jpg	10,73455445	70,09992177
A83_AD_TNF_20X_2.jpg	19,26115187	65,42019085
A83_AD_TNF_20X_3.jpg	19,36250599	65,24691037
A84_AD_TNF_20X_1.jpg	8,019899873	70,67640605
A84_AD_TNF_20X_2.jpg	11,67733757	70,41172866
A84_AD_TNF_20X_3.jpg	12,67861107	70,43048932
A85_AD_TNF_20X_1.jpg	12,73907303	69,27164443
A85_AD_TNF_20X_2.jpg	11,71742648	67,21833422
A85_AD_TNF_20X_3.jpg	12,08158568	67,27734932
A86_AD_TNF_20X_1.jpg	13,32288149	70,61975544
A86_AD_TNF_20X_2.jpg	16,22359535	70,51783504
A86_AD_TNF_20X_3.jpg	11,00707142	70,33395915
A87_AD_TNF_20X_2.jpg	10,77026206	98,91344733
A87_AD_TNF_20X_3.jpg	6,985766611	100,8045094
A87_AD_TNF_20X_1.jpg	14,89686416	98,81397116

Tabela 19: Telas de baixa densidade, IHQ para TNF, animais eutanasiados após 4 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A71_BD_TNF_20X_1.jpg	20,59080394	55,65906334
A71_BD_TNF_20X_2.jpg	15,82270624	57,70417888
A71_BD_TNF_20X_3.jpg	20,56736398	56,01104519
A73_BD_TNF_20X_1.jpg	3,764268439	55,52667313
A73_BD_TNF_20X_2.jpg	4,332888388	53,25963564
A73_BD_TNF_20X_3.jpg	13,33208223	74,3951593
A74_BD_TNF_20X_1.jpg	12,08195079	72,0468037
A74_BD_TNF_20X_2.jpg	21,05960323	67,16462785
A74_BD_TNF_20X_3.jpg	10,29072858	67,84577121
A75_BD_TNF_20X_1.jpg	18,71159059	68,98122124
A75_BD_TNF_20X_2.jpg	10,35374631	68,45680231
A75_BD_TNF_20X_3.jpg	18,35838464	72,60051708
A76_BD_TNF_20X_1.jpg	7,166349266	72,34703485
A76_BD_TNF_20X_2.jpg	4,797817528	71,81171618
A76_BD_TNF_20X_3.jpg	8,173975652	61,85475125
A77_BD_TNF_20X_1.jpg	4,798109614	71,79313021
A77_BD_TNF_20X_2.jpg	2,588911217	72,47932532
A77_BD_TNF_20X_3.jpg	10,94076772	72,0271643
A78_BD_TNF_20X_1.jpg	8,836720566	65,98903442
A78_BD_TNF_20X_2.jpg	9,05169644	68,54072718
A78_BD_TNF_20X_3.jpg	13,33456497	68,63791885
A79_BD_TNF_20X_1.jpg	12,32504002	68,40502174
A79_BD_TNF_20X_2.jpg	5,866782138	70,36334217
A79_BD_TNF_20X_3.jpg	9,925693122	71,46272291
A80_BD_TNF_20X_1.jpg	10,70432347	70,60166722
A80_BD_TNF_20X_2.jpg	6,00377084	69,88177915
A80_BD_TNF_20X_3.jpg	13,69646049	69,47076511

Tabela 20: Telas de baixa densidade, IHQ para TNF, animais eutanasiados após 30 dias.		
Lâmina	Área percentil	Densidade média
A81_BD_TNF_20X_1.jpg	8,130600764	68,65623962
A81_BD_TNF_20X_2.jpg	18,88202323	69,35973641
A81_BD_TNF_20X_3.jpg	7,72401596	67,98494947
A82_BD_TNF_20X_1.jpg	12,38652428	70,59348103
A82_BD_TNF_20X_2.jpg	15,72325069	68,87704054
A82_BD_TNF_20X_3.jpg	18,2798133	69,57606238
A83_BD_TNF_20X_1.jpg	15,10585225	73,39871319
A83_BD_TNF_20X_2.jpg	19,27590226	72,91859456
A83_BD_TNF_20X_3.jpg	12,83268685	72,03193959
A84_BD_TNF_20X_1.jpg	8,141042867	72,42921211
A84_BD_TNF_20X_2.jpg	7,182633104	77,42234377
A84_BD_TNF_20X_3.jpg	11,40087743	71,34842119
A85_BD_TNF_20X_1.jpg	7,382274421	71,54026331
A85_BD_TNF_20X_2.jpg	8,270437312	72,77721173
A85_BD_TNF_20X_3.jpg	4,93524436	71,67166277
A86_BD_TNF_20X_1.jpg	9,356415978	68,7729607
A86_BD_TNF_20X_2.jpg	10,81035097	67,33290328
A86_BD_TNF_20X_3.jpg	7,990837238	69,12919557
A87_BD_TNF_20X_1.jpg	11,12069318	74,32854432
A87_BD_TNF_20X_2.jpg	13,75757965	71,77419269
A87_BD_TNF_20X_3.jpg	15,84380951	70,44986035