

SÉRGIO HENRIQUE BASTOS DAMOUS

Impacto da tela de polipropileno no
ducto deferente e testículo de ratos:
avaliação morfofuncional

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências

Programa de pós-graduação em Anestesiologia,
Ciências Cirúrgicas e Medicina Perioperatória

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Massazo Utiyama

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Damous, Sérgio Henrique Bastos
Impacto da tela de polipropileno no ducto
deferente e testículo de ratos : avaliação
morfofuncional / Sérgio Henrique Bastos Damos. --
São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.
Orientador: Edivaldo Massazo Utiyama.

Descritores: 1.Hérnia inguinal 2.Polipropilenos
3.Telas cirúrgicas 4.Ducto deferente 5.Fertilidade
6.Testículo 7.Ratos

USP/FM/DBD-500/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, **Abrão e Maria de Fátima**, presentes em todos os momentos da minha vida e que sempre procuraram ser exemplos pra mim. Esta etapa da minha profissão é fruto de todo o cuidado que recebi deles.

À minha esposa **Luciana Lamarão Damous**, que entrou na minha vida na época em que ser médico era apenas um sonho. Este trabalho é mais uma de tantas conquistas juntos, e fruto da sua dedicação e orientação.

Ao meu filho **Sergio Lamarão Damous**, que é a fonte de energia e o sentido da minha vida.

Aos meus irmãos, **Patrícia e Abrão Filho**, que me apoiam sempre mesmo distantes.

Agradecimientos

Agradecimento especial

Ao **Professor Edivaldo Massazo Utiyama**, pela sugestão do tema e orientação na realização deste projeto. O estímulo gerado pelos seus conhecimentos vai além da medicina. Agradeço imensamente pelos ensinamentos e por ser pra mim, exemplo de Professor.

À **Divisão de Clínica Cirúrgica III do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** pela formação recebida e oportunidade de pertencer a essa equipe. Sinto-me honrado em fazer parte deste Serviço, reduto de cirurgiões de grande prestígio.

Ao **Dr. Jocielle Santos de Miranda**, pela amizade, companheirismo e auxílio na execução das operações.

À **Profa. Dra. Edna Frasson de Souza Montero**, pelo estímulo, amizade e apoio na realização deste projeto.

À Enfermeira **Toshiko Oya**, pela amizade e apoio administrativo em todas as etapas deste projeto.

Ao **Dr. Claudio Augusto Vianna Birolini** e ao **Dr. Fernando da Costa Ferreira Novo**, pelas sugestões e críticas construtivas durante a etapa de qualificação desta tese.

Ao **Laboratório de Fisiopatologia Cirúrgica (LIM-62) da FMUSP**, pela oportunidade de realização deste projeto.

Aos funcionários do LIM-62 **Marco de Luna, Mario Matsuo Itinoshi, Luci Takasaka, Ana Maria Heimbecker e Elisabete Minami** pela disponibilidade, simpatia e amizade que ajudaram este projeto se tornar realidade.

À funcionária do Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **Angela Batista dos Santos** pela ajuda na padronização da técnica de imunohistoquímica

Ao funcionário do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular/Incor **Márcio Figueira Chaves** pela ajuda na aquisição das imagens de imunohistoquímica e do colágeno com microscópio de luz polarizada.

Ao **Dr. Renato Silveira Leal**, pela amizade, apoio e cobertura na enfermagem e centro cirúrgico para realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo Auxílio do Projeto de Pesquisa (2015/08472-4), sem o qual não seria possível realizar todas as análises, permitindo a divulgação dos resultados em congressos internacionais.

Aos **animais de experimentação**, dedico todo o meu respeito e gratidão.

Epígrafe

“We are what we repeatedly do. Excellence then, is not an act, but a habit”.

Aristóteles

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 MÉTODOS.....	10
3.1 Amostra.....	11
3.2 Anestesia e preparo dos animais.....	12
3.3 Procedimentos operatórios.....	12
3.4 Eutanásia e coleta das peças	16
3.5 Variáveis analisadas.....	17
3.5.1 Descrição macroscópica	18
3.5.2 Análise morfológica	18
3.5.3 Análise morfométrica	18
3.5.4 Análise da fibroplasia	18
3.5.5 Análise da espermatogênese	19
3.5.6 Análise imunohistoquímica da apoptose e proliferação celular	19
3.6 Análise estatística	21
4 RESULTADOS	22
4.1 Achados macroscópicos.....	23
4.2 Análise Morfológica	25
4.3 Análise Morfométrica.....	27
4.4 Análise da fibroplasia	30
4.5 Análise da espermatogênese.....	33
4.6 Análise Imunohistoquímica	34
4.6.1 Apoptose	34

4.7 Proliferação celular.....	40
5 DISCUSSÃO.....	44
5.1 Racional do trabalho.....	45
5.2 Situação atual do problema.....	46
5.3 Modelo experimental.....	46
5.4 Macroscopia.....	49
5.5 Morfologia, morfometria e espermatogênese.....	50
5.6 Fibroplasia.....	52
5.7 Apoptose.....	54
5.8 Proliferação.....	55
Considerações finais.....	55
6 CONCLUSÃO.....	57
7 ANEXOS.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	61

Listas

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μ^2	Micrômetro quadrado
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de Soro Bovino ou <i>Bovine Serum Albumin</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
LIM-62	Laboratório de Investigação Médica em Fisiopatologia Cirúrgica
PBS	Tampão fosfato salino ou <i>Phosphate buffered saline</i>
PP	Polipropileno
Tela-DD	Tela-Ducto Deferente
Tela-FE	Tela-Funículo Espermático
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)–mediated dUTP nick-end labeling</i>

TABELAS

Tabela I –	Análise morfométrica da espessura da parede e da área da luz do ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório	27
Tabela II –	Quantificação de fibras colágenas I e III no ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), após 30 e 90 dias de pós-operatório	30
Tabela III –	Quantificação da apoptose pela caspase-3 clivada e TUNEL no ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório	34
Tabela IV –	Quantificação da apoptose pela caspase-3 clivada e TUNEL, no testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório	37
Tabela V –	Quantificação da proliferação celular pelo Ki-67 no ducto deferente e testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório	40

FIGURAS

Figura 1 -	Preparo operatório: A) Desenho em 3D representativo da localização das estruturas anatômicas da região inguinal do rato. B) Posicionamento e marcação da incisão da pele do rato (linha tracejada).....	13
Figura 2 -	A) Exposição do funículo espermático (seta). B) Abertura do funículo espermático com visualização do ducto deferente (seta).....	13
Figura 3 -	Dissecção do ducto deferente com exposição das estruturas do funículo espermático.....	14
Figura 4 -	Distribuição dos grupos	14
Figura 5 -	Grupo Tela-DD: Tela de polipropileno sobre o ducto deferente	15
Figura 6 -	Grupo Tela-FE: Tela de polipropileno sob o funículo espermático	15
Figura 7 -	A) Ressecção do ducto deferente na porção em contato com a tela de polipropileno. B) Ducto deferente isolado	17
Figura 8 -	Fotomicrografias do testículo de ratos corados pelo Ki-67 para demonstração de como foi realizada a quantificação da área marcada. Em A, identificação das células positivas (coradas em marrom escuro). Em B, quantificação das áreas definidas como positivas pelo <i>software</i> Leica QWin V3.	21
Figura 9 -	Fotografia da região inguinal direita do rato em 90 dias de pós-operatório: Grupo Tela-FE.....	23
Figura 10 -	Fotografia da região inguinal do rato em 90 dias de pós-operatório: Grupo Tela-DD. Tela de polipropileno aderida ao músculo e ao ducto deferente.....	24
Figura 11 -	Fotomicrografia do ducto deferente de ratos submetidos a inguilotomia bilateral com colocação de tela (Tela-DD). L: Lúmen. EP: Epitélio de revestimento. TC: Tecido conjuntivo. M: Camada muscular; A: Tecido adiposo.	25
Figura 12 -	Fotomicrografia do testículo de ratos submetidos à inguilotomia bilateral com colocação de tela (Tela-DD), em corte transversal mostrando os túbulos seminíferos.....	26
Figura 13 -	Medidas da espessura da parede do ducto deferente.	28
Figura 14 -	Medidas da área da luz do ducto deferente.....	28

Figura 15 –	Fotomicrografias do ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório.....	29
Figura 16 -	Quantificação de fibras colágenas I e III no ducto deferente (A e B) e Proporção das fibras I/III (C).	31
Figura 17 -	Painel com fotomicrografias em microscópio de luz polarizada, do ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório mostrando fibras colágenas I e III coradas em vermelho e verde, respectivamente. Coloração pelo Picrosirius Red.....	32
Figura 18 -	Fotomicrografia do testículo de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Não houve alteração da morfologia dos testículos e a espermatogênese encontrava-se preservada em todos os grupos. Corte transversal mostrando os túbulos seminíferos.....	33
Figura 19 -	Quantificação da caspase-3 clivada (A) e TUNEL (B) no ducto deferente.....	34
Figura 20 -	Fotomicrografias de caspase-3 clivada no ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	35
Figura 21 -	Fotomicrografias do TUNEL no ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	36
Figure 22 -	Quantificação da Caspase-3 clivada e TUNEL no testículo.....	37
Figura 23 -	Fotomicrografias da caspase-3 clivada no testículo de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	38
Figura 24 -	Fotomicrografias do TUNEL no testículo de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	39

Figura 25 -	Quantificação do Ki67 no ducto deferente.	41
Figura 26 -	Quantificação do Ki67 no testículo.	41
Figura 27 -	Fotomicrografias do Ki-67 no ducto deferente de ratos submetidos à inguilotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	42
Figura 28 -	Fotomicrografias do Ki-67 no testículo de ratos submetidos à inguilotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas).	43

Resumo

Damous SHB. *Impacto da tela de polipropileno no ducto deferente e testículo de ratos – avaliação morfofuncional* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A correção cirúrgica das hérnias inguinais com telas sintéticas tornou-se a técnica de escolha pois reduziu drasticamente as taxas de recorrência. Entretanto, o uso da tela causa uma reação inflamatória tipo corpo estranho com intensa resposta fibrótica, com consequências variáveis sobre as estruturas anatômicas. Diversos modelos experimentais têm estudado os efeitos da herniorrafia com tela sobre o funículo espermático mas os resultados são controversos. **OBJETIVO:** Avaliar o ducto deferente e testículo de ratos submetidos à inguilotomia bilateral e colocação de tela em 30 e 90 dias de pós-operatório. **MÉTODOS:** Foram utilizados 60 ratos, todos submetidos à inguilotomia bilateral por meio de uma incisão de 3cm de extensão para dissecação e exposição do funículo espermático. Neste momento, os animais foram randomizados em três grupos de estudo com 20 animais cada, de acordo com o tratamento realizado: 1) Grupo Controle: inguilotomia e dissecação do ducto deferente; 2) Grupo Tela-Ducto Deferente (Tela-DD): inguilotomia, dissecação do ducto deferente e colocação de tela sobre o ducto deferente; e, Grupo Tela-Funículo Espermático (Tela-FE): inguilotomia, dissecação do ducto deferente e colocação de tela sob a porção proximal do funículo espermático. Em 30 e 90 dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados para ressecção em bloco da região inguinal bilateralmente e dos testículos. O ducto deferente foi isolado e analisado apenas a região que se encontrava em contato com a tela. Foram realizadas as seguintes análises: 1) Achados macroscópicos (aderências); 2) Morfológica (descrição da morfologia das estruturas, presença de macrófagos, linfócitos, reação de corpo estranho, neovascularização e graduação da inflamação); 3) Morfométrica (medida da área da luz e espessura da parede do ducto deferente); 4) Espermatogênese; 5) Fibrose (quantificação das fibras colágenas tipo I e III); e 6) Imunohistoquímica para apoptose (caspase-3 clivada e TUNEL) e proliferação celular (Ki-67). **RESULTADOS:** Nos grupos com tela havia aderências envolvendo a tela e estruturas adjacentes, que foram facilmente liberadas para ressecção das peças. O implante da tela de PP não alterou a morfologia do ducto deferente e testículo, assim como a espermatogênese encontrava-se preservada. No ducto deferente houve redução do diâmetro da luz (30 dias), aumento da espessura da parede (90 dias), aumento do colágeno tipo III e da proliferação celular (30 e 90 dias) ($p < 0,05$) sem alteração no colágeno tipo I e apoptose ($p > 0,05$). No testículo a apoptose foi semelhante entre os grupos com tela ($p > 0,05$) e a proliferação celular maior nos grupos com tela ($p < 0,05$). **CONCLUSÕES:** Analisados em conjunto, nossos achados mostram que a tela de PP, seja contato direto ou não com as estruturas do funículo espermático, induz alterações transitórias sem impacto negativo na funcionalidade do ducto deferente e testículo.

Descritores: Hérnia inguinal; Tela de Polipropileno; Ducto Deferente; Testículo; Fertilidade; Ratos

Abstract

Damous SHB. *Impact of polypropylene mesh on the vas deferens and testis of rats - morphofunctional evaluation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Introduction: Several experimental models have studied the effects of herniorrhaphy with mesh on the spermatic cord but the results are controversial. This study aimed to evaluate the vas deferens and testis of rats submitted to bilateral inguinoscrotal hernia repair and polypropylene (PP) mesh placement 30 and 90 days postoperatively. **Study design:** Sixty rats were used, all submitted to bilateral inguinoscrotal hernia repair by means of a 3cm incision for spermatic funicular dissection and exposure. At this time, the animals were randomized into three study groups of 20 animals each, according to the treatment performed: 1) Control: inguinoscrotal hernia repair and dissection of the vas deferens only; 2) Mesh-Ductus Deferens (Mesh-DD): mesh placement over the vas deferens; and, Mesh-Spermatic Funiculus (Mesh-SF): mesh placement under the proximal portion of the spermatic funiculus. At 30 and 90 days postoperatively, the animals were anesthetized for block resection of the bilateral inguinal region and the testicles. The following analyses were performed: macroscopy, morphology, vas deferens morphometry (lumen area and wall thickness) and quantification of type I and III collagen fibers, spermatogenesis, apoptosis (cleaved caspase-3 and TUNEL) and cellular proliferation (Ki67). **Results:** PP mesh placement, whether or not in direct contact with the spermatic funicular structures, preserved the spermatogenesis and did not alter the vas deferens morphology or the testicle. In the ductus deferens, there was a reduced luminal area (30 days), increased wall thickness (90 days), and increased type III collagen and cell proliferation (30 and 90 days) ($p < 0.05$) with no change in collagen type I or apoptosis ($p > 0.05$). In the testicle, apoptosis was similar between the mesh groups ($p > 0.05$), and cell proliferation was greater in the mesh group in which the mesh was placed in direct contact with the ductus deferens ($p < 0.05$). **Conclusions:** Taken together, our findings show that the PP mesh, whether or not in direct contact with spermatic funicular structures, induces transient changes without a negative impact on vas deferens and testicular function.

Descriptors: Inguinal hernia; Polypropylene mesh; Duct deferens; Testicle; Fertility; Rats

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por hérnia inguinal a protrusão de um órgão ou estrutura através de uma abertura na região inguinal. O tratamento recomendado é a correção cirúrgica, um dos procedimentos mais realizados na cirurgia geral, tanto em crianças como em adultos^{1,2}, afetando 5% da população masculina³.

As hérnias inguinais correspondem a 75% das hérnias da parede abdominal, sendo mais incidente entre os homens, com risco cumulativo maior ao longo dos anos. A incidência cumulativa é cerca de 7% até os 40 anos, aumentando para 23% após os 60 anos⁴. A maioria dos pacientes com hérnia inguinal é sintomático, apresentando dor e abaulamento local^{1,2}. No Brasil, nos hospitais públicos em 2018, foram operados 139.374 hérnias inguinais, 16.946 das quais eram bilaterais⁵, afastando milhares de pessoas de suas atividades habituais, com impacto direto no mercado de trabalho.

Na evolução do reparo da hérnia inguinal, Bassini e col. (1887)⁶ propuseram a técnica que consiste na reconstrução da parede posterior, suturando o músculo oblíquo interno, músculo transverso e fâscia transversal ao ligamento inguinal. Esta técnica foi considerada a melhor por quase um século. Na segunda metade do século XX, outras técnicas foram descritas, mas todas resultavam em elevadas taxas de recorrência e morbidade considerável devido à tensão na linha de sutura².

Em 1989, Lichtenstein introduziu o conceito de reparo livre de tensão, usando tela sintética de polipropileno (PP) para reforçar a parede posterior da região inguinal, o que reduziu consideravelmente as taxas de recorrência, além de

proporcionar menor dor no pós-operatório. A tela de PP é fixada medialmente no músculo reto abdominal e no músculo oblíquo interno e, lateralmente, no ligamento inguinal. Na região do anel inguinal profundo, a tela envolve o funículo espermático, estendendo-se superiormente na região lateral ⁷. Esse reparo por via anterior, sem tensão, tornou-se a técnica mais aceita e realizada em todo o mundo. De acordo com metanálise da *Cochrane*, comparando o reparo da região inguinal com e sem tela, o uso desta, reduz o risco de recorrência em até 50%, com retorno mais rápido ao trabalho e menos dor no pós-operatório ^{2, 8-10}. Tais resultados fizeram com que a correção cirúrgica com tela suplantasse a correção sem tela até os dias atuais ^{11, 12}.

O mecanismo pelo qual as telas sintéticas reduziram drasticamente o índice de recorrência se baseia em uma reação de corpo estranho, com conseqüente reação inflamatória e processo cicatricial. As complicações dependem das circunstâncias clínicas sob a qual a hérnia ocorre, do tipo de hérnia e da técnica cirúrgica utilizada na sua correção sendo as mais frequentes a formação de seroma, infecção, migração da tela com erosão de tecidos e órgãos, lesão do ducto deferente e dor crônica ¹³⁻²⁰.

Em todo o mundo, mais de um milhão de telas são implantadas todos os anos, tanto por via convencional quanto laparoscópica ²¹ porém a busca de um material ideal, com maior biocompatibilidade, ainda permanece em discussão ^{15, 18}. Entre as telas sintéticas, as de PP são as preferenciais e as mais estudadas, devido o baixo custo e o tipo de resposta que induz no doente ¹⁷. A tela de PP é um material plástico, flexível, biologicamente inerte, que não se modifica na presença dos fluidos teciduais, capaz de ser incorporado nos tecidos, mesmo na presença de infecção, sendo mecanicamente resistente e que pode ser moldada em diferentes tamanhos ²².

²³. Lichtenstein e col. (1989) ⁷ relataram 1.000 cirurgias com telas de PP sem recorrência no seguimento de 5 anos.

Atualmente, com o emprego sistemático da tela de PP na hernioplastia e, conseqüentemente, melhor controle das recidivas, preocupação crescente tem recaído sobre o impacto desta intervenção sobre a fertilidade masculina ²⁴. A infertilidade é definida como a ausência de gestação detectada clínica ou hormonal, após 12 meses de atividade sexual sem uso de métodos anticoncepcionais ²⁵. Os fatores masculinos são responsáveis por 40-50% dos casos globais de infertilidade e afetam aproximadamente 7% de todos os homens ²⁶.

A herniorrafia é relatada como a causa mais comum de obstrução do ducto deferente. Sua verdadeira incidência é desconhecida, devido o fato de uma obstrução unilateral nem sempre afetar a fertilidade e com frequência o tratamento ser realizado em homens mais velhos que não estão preocupados com a vida reprodutiva ²⁷.

A experiência dos reparos de hérnias em pacientes pediátricos sugere uma incidência de lesões iatrogênicas no ducto deferente de 0,8 a 2% ^{28, 29, 30} e em adultos de 0,3% a 7,2% ³¹. Entretanto, quando avaliado homens inférteis com histórico de herniorrafia na infância, a incidência de obstrução unilateral do ducto deferente foi de 27,8%, sugerindo uma importante relação com a patência do deste órgão ²⁷. A possibilidade de obstrução do ducto deferente deve ser sempre considerada em qualquer homem infértil com história de herniorrafia na infância ^{32, 33}.

Anatomicamente, há uma estreita relação entre as hérnias inguinais e o funículo espermático que é composto pelo ducto deferente, incluindo artéria e veias testiculares, nervos, músculo cremaster e fáscia ^{1, 34, 35}. Na dissecação cirúrgica do funículo espermático, estas estruturas são expostas de forma que, o trauma

iatrogênico direto durante a manipulação cirúrgica dos tecidos pode acarretar alterações tróficas no testículo ou alterações endócrinas ^{21, 36, 37, 38}.

Independentemente da técnica cirúrgica, há poucas informações clínicas sobre os efeitos em longo prazo da tela de PP nos ductos deferentes e outras estruturas dentro do funículo espermático. Por ser considerado padrão ouro, a tela de PP tem sido utilizada inclusive em pacientes jovens, sem prole constituída ^{12, 13}.

Trabalhos experimentais demonstraram que diferentes tipos de manipulação do ducto deferente podem produzir obstrução e danos funcionais mesmo sem uso de telas ³⁹. Quando a tela de PP é utilizada, além do trauma mecânico, a reação inflamatória tipo corpo estranho com intensa resposta fibrótica pode resultar em compressão das artérias testiculares e obstrução das veias, com repercussão na função testicular, levando a quadros de varicocele, hidrocele, orquite isquêmica, atrofia testicular e, conseqüentemente, infertilidade ^{31, 36, 40-42}.

Outro mecanismo de lesão descrito é a migração da tela de PP durante o processo cicatricial, causando quadros de dor durante a relação sexual e a ejaculação. A análise histológica de telas retiradas de pacientes com dor crônica pós cirurgia, evidenciou completa infiltração da tela nos ductos deferentes ressecados com envolvimento do cordão espermático por tecido cicatricial em 50% dos casos ¹⁴.

A lesão testicular, seja atrofia e/ou disfunção, é uma das sequelas mais temidas da herniorrafia inguinal e pode ocorrer em até 2% dos pacientes ^{24, 37, 43}. A principal causa de orquite isquêmica, que pode causar atrofia testicular, é a congestão venosa por trombose do plexo pampiniforme decorrente do trauma cirúrgico ³³. Os primeiros trabalhos correlacionando infertilidade e herniorrafia inguinal prévia, relataram que a atrofia testicular pode ou não estar presente nestes pacientes. ^{31, 44}. Os

efeitos da herniorrafia sobre a função testicular permanecem conflitantes até os dias atuais ^{40, 45-49}. Estudos mais recentes relatam que a colocação da tela pode induzir congestão acentuada e até necrose tecidual próxima aos túbulos seminíferos, além de alterações significantes na espermatogênese e aumento de anticorpos antiespermáticos e marcadores de hipóxia ⁵⁰.

Modelos experimentais têm estudado os efeitos da herniorrafia sobre o funículo espermático, em particular após o reparo com tela. A reação inflamatória crônica é observada tanto no reparo anterior quanto no posterior (pré-peritoneal) ^{42, 51, 52} e depende da extensão da hérnia e de quais estruturas são incorporadas ao material. Na técnica por via anterior, a tela fica próxima do ducto deferente, no nível do anel inguinal profundo, enquanto que no acesso posterior, a tela está localizada diretamente em contato com os vasos gonadais e o ducto deferente, após a parietalização do peritônio. Assim como nos estudos clínicos, os resultados de maneira geral são contraditórios, havendo relatos desde ausência de alterações ⁵³, redução no diâmetro dos vasos ^{42, 51, 53} e da perfusão testicular ^{42, 51} até obstrução do ducto deferente e acúmulo de espermatozoides ⁵⁴ e redução da testosterona ⁵⁵.

Os primeiros estudos experimentais relatam que a colocação da tela sintética não tem efeito negativo em longo prazo sobre a fertilidade ^{53, 56} embora ocorra obstrução de mais de 75% do diâmetro dos vasos deferentes, sem induzir aumento da apoptose ou proliferação celular em ratos ⁵⁷ e cachorros ⁵⁸. Em porcos e coelhos, houve redução da perfusão e da temperatura testicular e da espermatogênese ⁴². Estudo em porcos comparando o uso de dois tipos de tela observou que o grupo com tela de PP apresentou maior comprometimento do funículo espermático e da função testicular ⁴¹.

Em ratos, nosso grupo comparou animais intactos com animais submetidos à inguinotomia com e sem a colocação da tela sintética de PP. Nos animais com tela, esta foi implantada em contato direto com o ducto deferente ou com o funículo espermático. Foram analisados três segmentos do ducto deferente de acordo com a localização da tela de PP – cranial, medial e caudal – 1 cm acima, em contato com a tela e 1 cm abaixo, respectivamente. A tela de PP não alterou a morfologia do ducto deferente, o diâmetro da parede e a área da luz, inclusive no segmento em contato com a tela. A cirurgia por si só, com ou sem colocação da tela de PP, promoveu redução do tamanho testicular sem alterar os níveis séricos de testosterona⁵⁹.

Tendo em vista a alta incidência das hérnias, o uso rotineiro das telas sintéticas no seu reparo e a falta de consenso sobre os efeitos da tela em longo prazo na fertilidade masculina, este trabalho pretende analisar os efeitos da tela sintética sobre o ducto deferente e testículo de ratos adultos submetidos à colocação de tela sintética na região inguinal bilateral.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o ducto deferente e o testículo de ratos adultos submetidos à colocação de tela de PP na região inguinal, comparando duas técnicas.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a histomorfometria e a fibroplasia do ducto deferente.

Avaliar a morfologia e espermatogênese no testículo.

Avaliar a apoptose e a proliferação celular no ducto deferente e no testículo.

3 Métodos

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética Para uso de Animais em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 089/15 (ANEXO I), em 2015 e conta com financiamento pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo 2015/08472-4. Todos os animais foram tratados segundo os princípios *do National Institute of Health* (1985) e *The American Physiological Society* (1995) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório. O experimento e a coleta de dados foram realizados no Laboratório de Investigação Médica em Fisiopatologia Cirúrgica (LIM-62) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Amostra

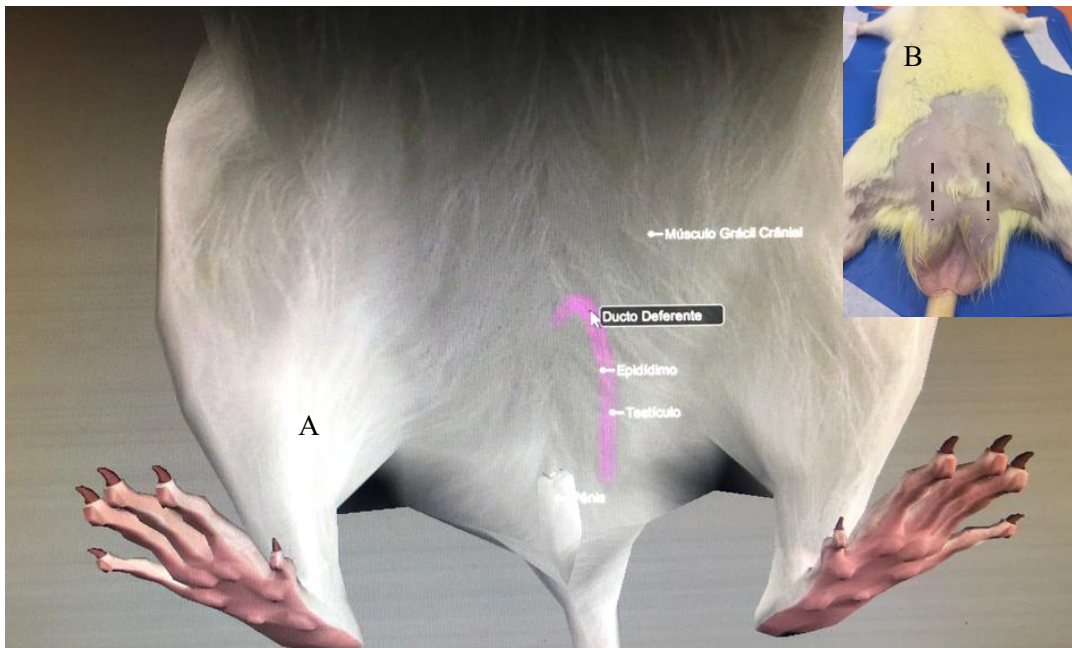
Foram utilizados 60 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos adultos, idade de 3 a 4 meses, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso de 300 g a 400 g. Os animais foram mantidos, nas fases pré e pós-experimental, em ambiente controlado para temperatura (23 °C), umidade e exposição à luz artificial, com ciclo claro-escuro de doze horas, com livre acesso a ração e água.

3.2 Anestesia e Preparo dos animais

Os animais foram submetidos a anestesia geral com injeção intraperitoneal de ketamina (50 mg/kg) associada a xilazina (10 mg/kg) na mesma seringa e, imediatamente após efeito do anestésico, foi realizada tricotomia abdominal e inguinal bilateral com antissepsia local. Doses complementares de anestésico com metade da dose inicial foram administradas pela mesma via para manutenção do plano anestésico, quando necessário.

3.3 Procedimentos operatórios

A inguinotomia bilateral foi realizada em todos os animais, por meio de uma incisão de 3 cm de extensão, com exposição do funículo espermático e dissecção do ducto deferente (Figuras 1, 2 e 3). Neste momento, os animais foram randomizados em três grupos de estudo com 20 animais cada (Figura 4), de acordo com o procedimento realizado: 1) Controle: inguinotomia bilateral, sem implante de tela; 2) Tela-Ducto Deferente (Tela-DD): inguinotomia bilateral e colocação de tela sobre o ducto deferente (Figura 5); e, 3) Tela-Funículo Espermático (Tela-FE): inguinotomia bilateral e colocação de tela sob a porção proximal do funículo espermático (Figura 6).



A) Fonte: <https://biosphera.org/international/product/3d-rat-anatomy-software-simplified>.

Figura 1 - Preparo operatório: A) Desenho em 3D representativo da localização das estruturas anatômicas da região inguinal do rato. B) Posicionamento e marcação da incisão da pele do rato (linha tracejada)



Figura 2 - A) Exposição do funículo espermático (seta). B) Abertura do funículo espermático com visualização do ducto deferente (seta)

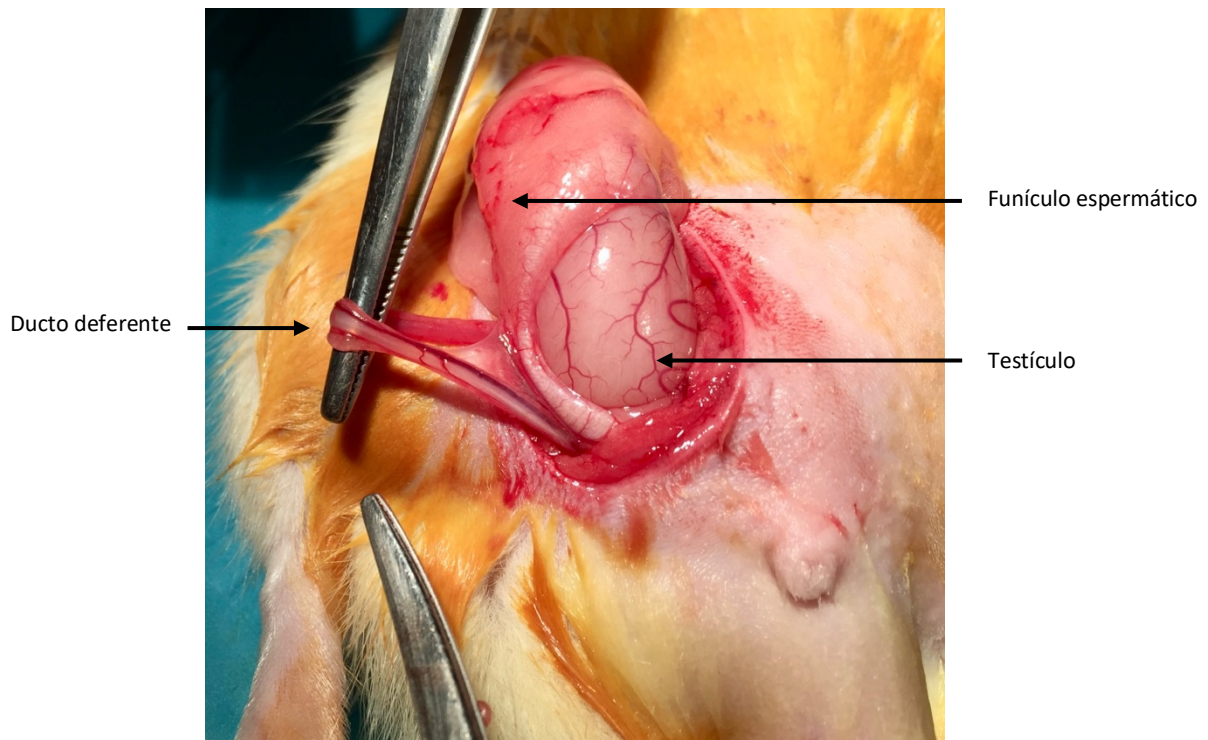


Figura 3 - Dissecção do ducto deferente com exposição das estruturas do funículo espermático

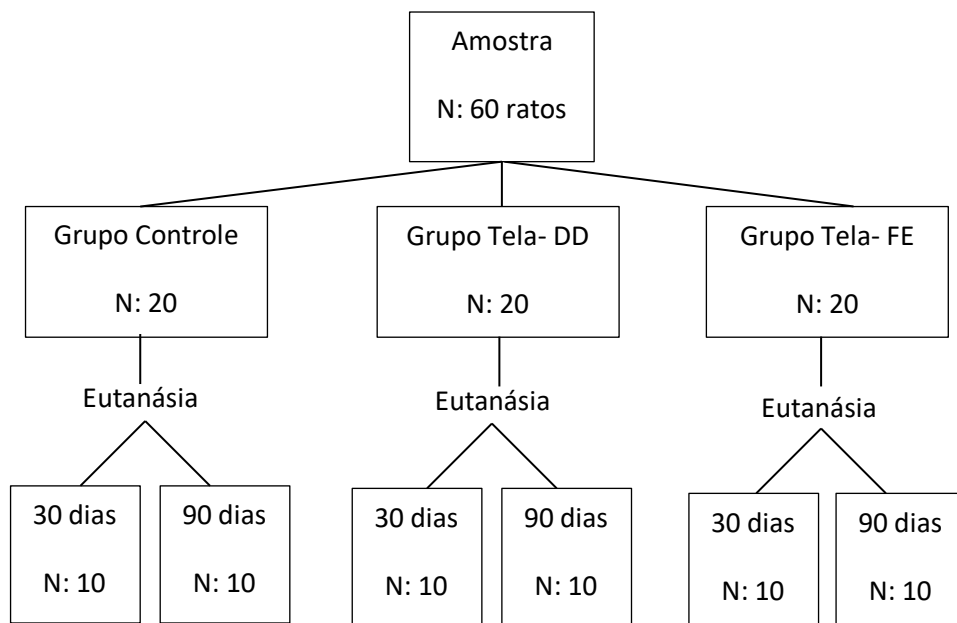


Figura 4 - Distribuição dos grupos

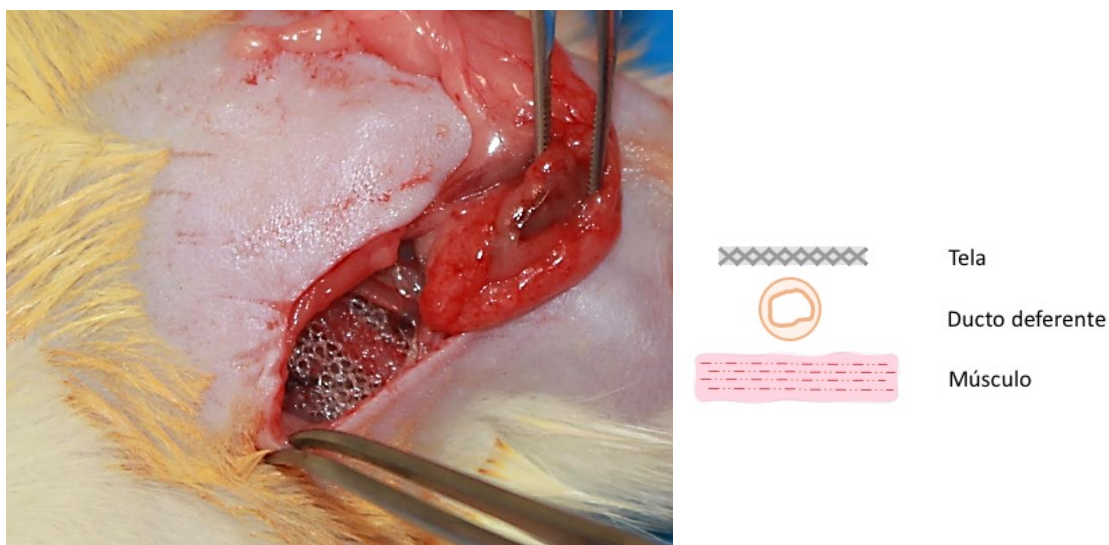


Figura 5 - Grupo Tela-DD: Tela de polipropileno sobre o ducto deferente

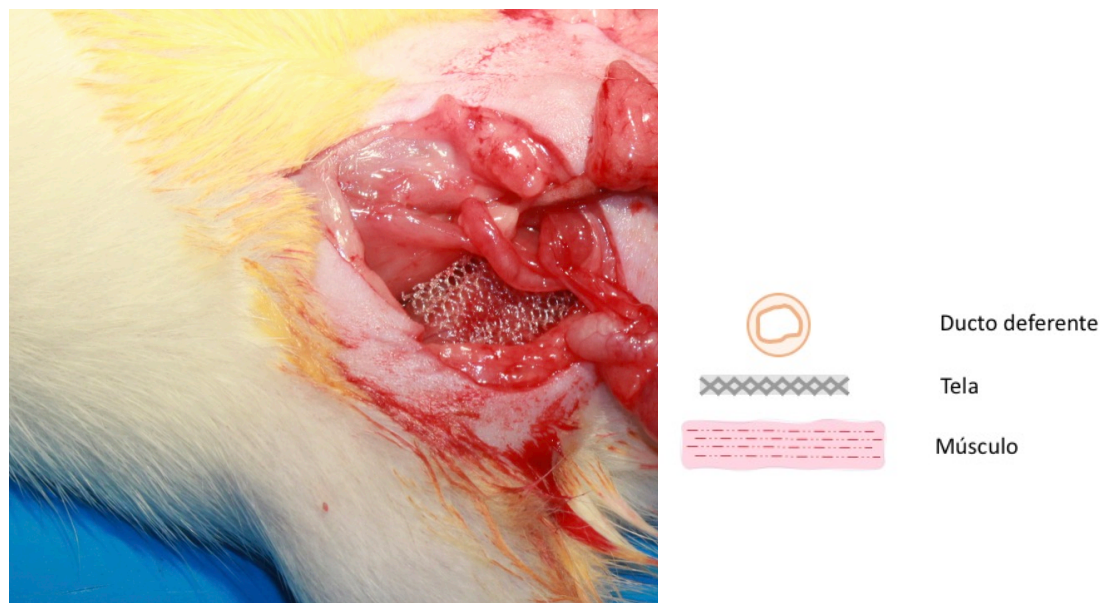


Figura 6 - Grupo Tela-FE: Tela de polipropileno sob o funículo espermático

Nos grupos Tela-DD e Tela-FE foram colocados fragmentos de tela de polipropileno macroporosa de alta densidade. Cada animal recebeu dois fragmentos de tela medindo 1cm de largura por 1cm de extensão, um em cada região inguinal, fixadas na porção cranial do canal inguinal.

No grupo Controle, após a dissecação do ducto deferente, foi realizado apenas o fechamento da inguinotomia bilateral, sem colocação de tela. No grupo Tela-DD, após a dissecação do ducto deferente, a tela foi colocada sobre o ducto deferente e fixada com dois pontos separados com fio de ácido poliglicólico 4-0, deixando o ducto deferente entre a tela e o músculo, simulando o posicionamento da tela e ducto deferente na correção da hérnia por via posterior. No grupo Tela-FE, o funículo espermático foi dissecado isolando-se o ducto deferente das demais estruturas, sendo a tela colocada sob o funículo espermático e fixada com dois pontos separados com fio de ácido poliglicólico 4-0, deixando o funículo acima da tela e do músculo, simulando o posicionamento da tela na correção da hérnia por via anterior, técnica de Lichtenstein. Em todos os grupos, a pele foi suturada com fio de nylon 4-0 e chuleio simples.

3.4 Eutanásia e coleta das peças

Após 30 e 90 dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados pela mesma técnica descrita anteriormente, para ressecção da região inguinal e do testículo, sempre do lado direito. O ducto deferente foi isolado e analisada apenas a região que se encontrava em contato com a tela (1 cm de extensão) (Figura 7). Após a coleta das peças, os animais foram submetidos a eutanásia por meio de dose letal dos anestésicos utilizados, nas doses de 150 mg/kg de ketamina e 10 mg/kg de xilazina, via

intraperitoneal. As carcaças dos animais foram recolhidas pelo setor responsável, de acordo com as normativas de descarte de material biológico, preconizadas pela FMUSP.

As peças (ducto deferente e testículo) foram fixadas em formol a 10% por um período de 24h e, em seguida, submetidas a processamento histológico de rotina para inclusão em parafina. Os cortes foram obtidos em micrótomo ajustado para 5 μ e, posteriormente, corados pela hematoxilina-eosina e examinados em microscópio óptico em aumento de 4 e 10x.

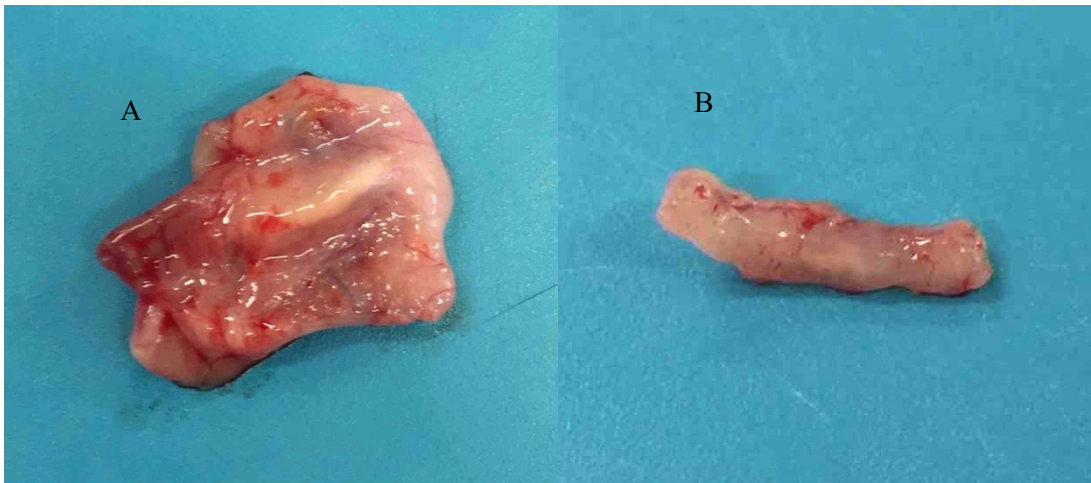


Figura 7 - A) Ressecção do ducto deferente na porção em contato com a tela de polipropileno. B) Ducto deferente isolado

3.5 Variáveis analisadas

Foram realizadas as seguintes análises: A) Achados macroscópicos; B) Morfológica; C) Morfométrica; D) Fibroplasia; E) Espermatogênese; e F) Imunohistoquímica para apoptose e proliferação celular.

3.5.1 Descrição macroscópica

Foram avaliados a presença de hematomas, abscessos, aderências e deiscência de ferida operatória.

3.5.2 Análise morfológica

Foi realizada a descrição da morfologia do ducto deferente e do testículo, quanto à presença de macrófagos, linfócitos, reação de corpo estranho e neovascularização.

No testículo, a inflamação foi graduada de 0-3, conforme descrito a seguir ⁶⁰:
Grau 0 – Ausência de inflamação: ausência de fibrose ou células gigantes; Grau 1 – Inflamação leve: fibrose densa com poucas células gigantes; Grau 2 – Inflamação moderada: fibrose c/ poucos leucócitos polimorfonucleares e células gigantes; e, Grau 3 – Inflamação severa: fibrose e grande número de leucócitos polimorfonucleares e células gigantes.

3.5.3 Análise morfométrica

Foram realizadas medida da espessura da parede e da área da luz do ducto deferente. As imagens dos cortes foram obtidas utilizando um *software* com sistema de aquisição de imagem (Leica DM2500) e as medições foram feitas usando o *software* Leica QWin V3 e por dois pesquisadores independentes, os quais desconheciam os procedimentos realizados.

3.5.4 Análise da fibroplasia

Com auxílio de um microscópio óptico de luz polarizada, as lâminas histológicas do ducto deferente foram coradas pelo *Picrosirius Red* e analisadas para quantificar as

fibras de colágeno tipo I e III. As fibras do tipo I são de colágeno maduro e cor vermelho enquanto as fibras tipo III são de colágeno imaturo e cor verde. Os demais componentes (materiais amorfos) do tecido são visualizados em fundo de cor preta.

3.5.5 Análise da espermatogênese

Para esta análise foi utilizada a graduação de *Johnsen* (1970)⁶¹ por meio da histologia dos túbulos seminíferos. Esta graduação consiste em uma escala de 10 a 1, conforme a seguir: 10=Espermatogênese normal e túbulos seminíferos perfeitos; 9=presença de muitos espermatozoides com obliteração da luz; 8=Presença de poucos espermatozoides; 7=Ausência de espermatozoides, mas presença de muitas espermátides; 6= Ausência de espermatozoides e presença de poucas espermátides; 5=Ausência de espermátide mas presença de várias espermatócitos; 4=Presença de apenas poucos espermatócitos; 3=Presença apenas de espermatogônias; 2=Ausência de células germinativas, mas presença de células de *Sertoli*; 1=Ausência de células nos túbulos (nem células germinativas, nem células de *Sertoli*).

3.5.6 Análise imunohistoquímica da apoptose e proliferação celular

Para análise imunohistoquímica da apoptose, foram utilizados anticorpos para caspase-3 clivada (SANT-SC-1226, 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EUA) e TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling*) por meio de kit comercial específico (*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche, Germany, 11684795910*), conforme especificações do fabricante. Para análise da proliferação celular foi utilizado anticorpo primário Ki-67 (M724001-2, 1:100, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA).

A imunohistoquímica utilizada foi realizada pelo método peroxidase. Os cortes histológicos a 3 μ m de espessura foram realizados em lâminas salinizadas (3-Aminopropil-trietoxi-silano- Sigma) e seguiu-se o protocolo descrito a seguir: 1) Hidratação: As lâminas foram desparafinadas com xilol quente (65°C) 15 minutos e xilol frio por 15 minutos, lavadas em álcool absoluto 95% e hidratadas em água corrente e deionizada; 2) Recuperação antigênica: Obtida através de alta temperatura em Panela Pascal, com tampão citrato Ph:6,0 a 125°C por 1 minuto e para Ki-67 e caspase-3. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS; 3) Bloqueio: foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) 10V 3% 10 vezes de 5 minutos cada e em seguida lavagem com água e PBS; 4) Incubação com o anticorpo primário: Após os bloqueios, o anticorpo primário Ki-67 e caspase-3, título 1:100 foi diluído em BSA foi aplicado sobre os cortes e controles, positivo e negativo de tecido, e as lâminas incubadas *overnight*.

As imagens dos cortes foram obtidas utilizando um *software* com sistema de aquisição de imagem (Leica DM2500) e as medições foram feitas usando o *software* Leica QWin V3 e por dois pesquisadores independentes, os quais desconheciam os procedimentos realizados. As células coradas em marrom escuro são consideradas positivas e quantificadas, em cinco campos diferentes por animal, em aumentos de 200x para o ducto deferente e 400x para o testículo. Os resultados são expressos em porcentagem de área positiva (unidade arbitrária/mm²).

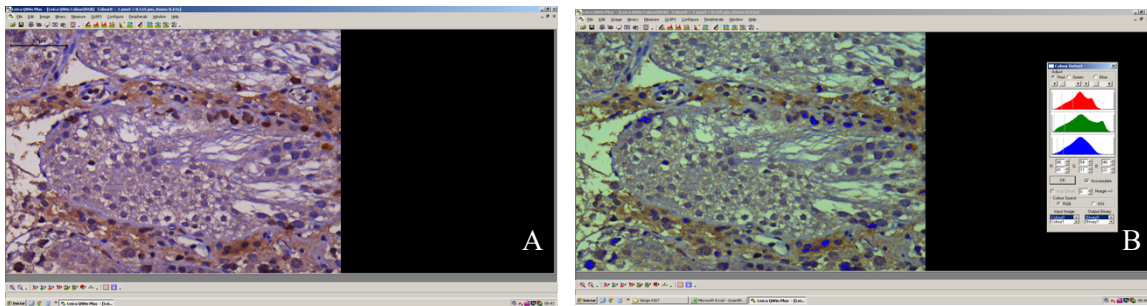


Figura 8 - Fotomicrografias do testículo de ratos corados pelo Ki-67 para demonstrar como foi realizada a quantificação da área marcada. Em A, identificação das células positivas (coradas em marrom escuro). Em B, quantificação das áreas definidas como positivas pelo *software* Leica QWin V3. Zoom 400x

3.6 Análise estatística

Os resultados são expressos em médias \pm desvio padrão da média. Após obtenção dos dados em cada grupo de animais, os resultados foram submetidos a análise estatística, levando em consideração a natureza das variáveis estudadas, utilizando-se o teste de ANOVA-*two way*, e fixando-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade ($p < 0,05$), marcadas por asterisco. Todas as análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc, CA, USA).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Achados macroscópicos

No grupo Controle, não havia aderências na região operada e nos grupos com tela havia aderências envolvendo a tela e estruturas adjacentes, que foram facilmente liberadas para ressecção das peças. Macroscopicamente, não havia diferença entre os grupos com tela. Em nenhum grupo houve formação de abscessos ou deiscências da ferida operatória, porém a intensidade da fibrose envolvendo o ducto deferente foi maior no grupo Tela-DD (Figuras 9 e 10).

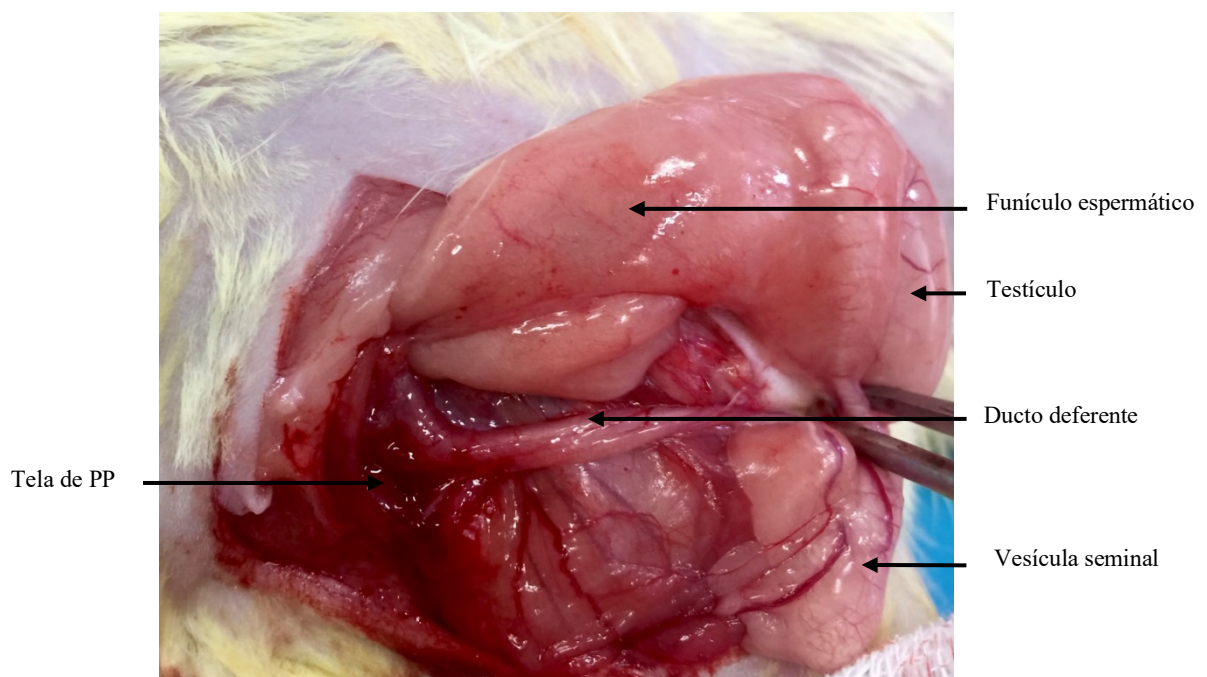


Figura 9 - Fotografia da região inguinal direita do rato em 90 dias de pós-operatório: Grupo Tela-FE

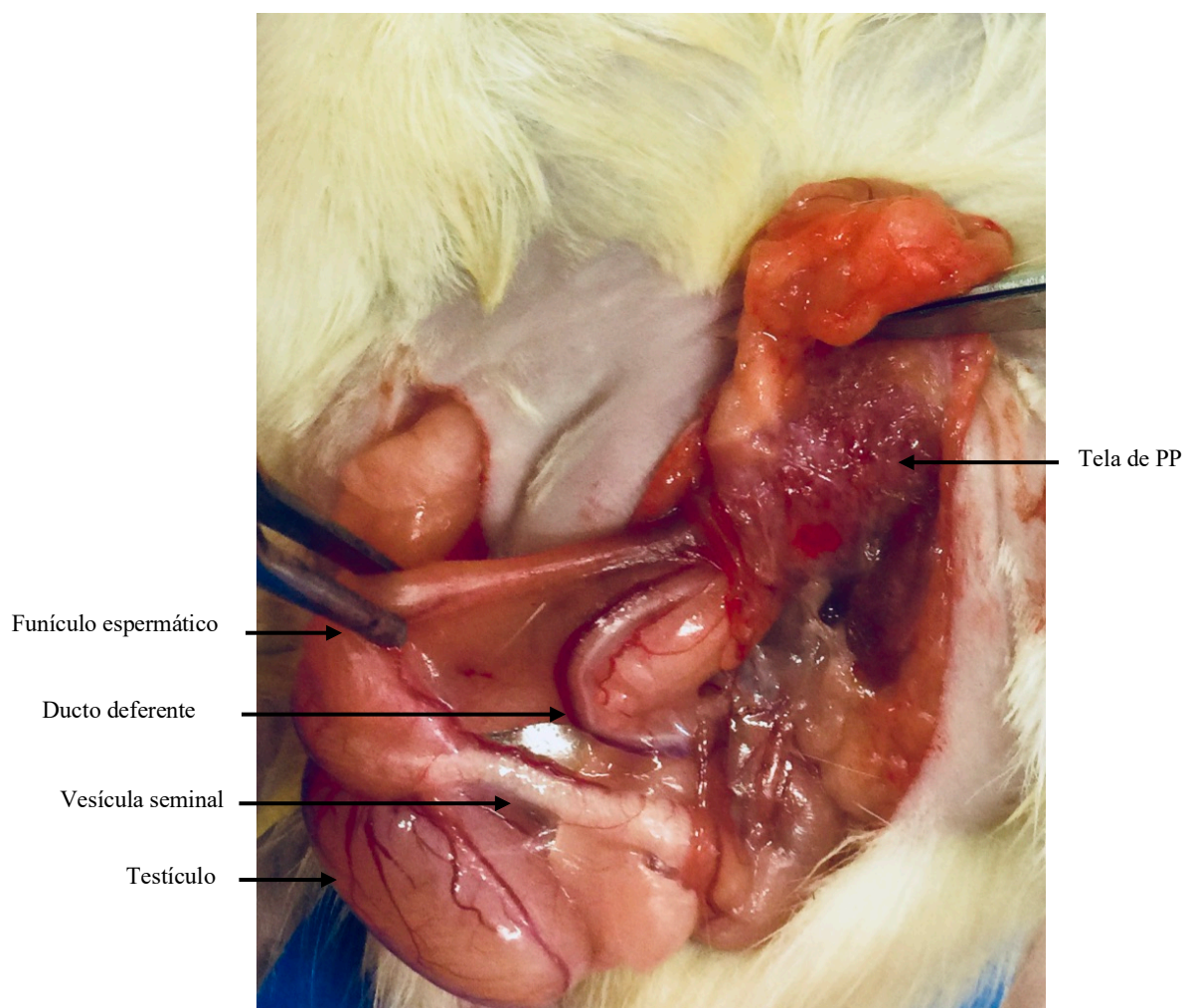


Figura 10 - Fotografia da região inguinal do rato em 90 dias de pós-operatório: Grupo Tela-DD. Tela de polipropileno aderida ao músculo e ao ducto deferente

4.2 Análise Morfológica

O ducto deferente e o testículo encontravam-se com morfologia preservada em ambas as datas de avaliação. O ducto deferente, a partir do lúmen, era constituído por epitélio de revestimento pseudoestratificado e estereocílios, circundado por camada delgada de tecido conjuntivo e espessa camada de musculatura lisa, envolvido externamente por tecido adiposo e tecido conjuntivo (Figura 11). Não foi observada diferença entre os grupos ou sinais de inflamação (Grau 0). O testículo continha os túbulos seminíferos separados entre si por tecido conjuntivo denso, contendo espermatozoides em seu interior e células germinativas em diversos estágios de maturação (Figura 12).



Figura 11 - Fotomicrografia do ducto deferente de ratos submetidos a inguilotomia bilateral com colocação de tela (Tela-DD). L: Lúmen. EP: Epitélio de revestimento. TC: Tecido conjuntivo. M: Camada muscular; A: Tecido adiposo. Zoom 50x

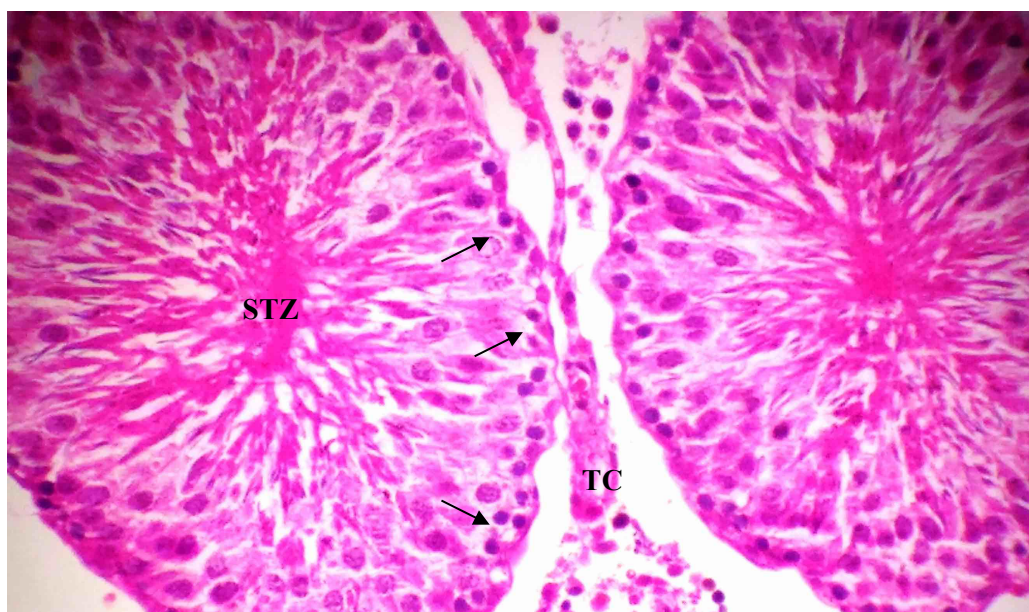


Figura 12 - Fotomicrografia do testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral com colocação de tela (Tela-DD), em corte transversal mostrando os túbulos seminíferos. TC: Tecido conjuntivo; STZ: Espermatozoides; Setas: Células germinativas. Zoom 100x

4.3 Análise Morfométrica

Os resultados da análise morfométrica do ducto deferente estão detalhados na Tabela I e nas Figuras 13, 14 e 15. Não houve diferença estatisticamente significativa da espessura da parede em 30 dias ($p>0,05$) mas após 90 dias o grupo Tela-FE encontrava-se mais espesso do que o Controle ($p<0,05$). O uso da tela reduziu o diâmetro da luz em 30 dias ($p<0,05$), mas após 90 dias os valores foram semelhantes entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela I - Análise morfométrica da espessura da parede e da área da luz do ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório

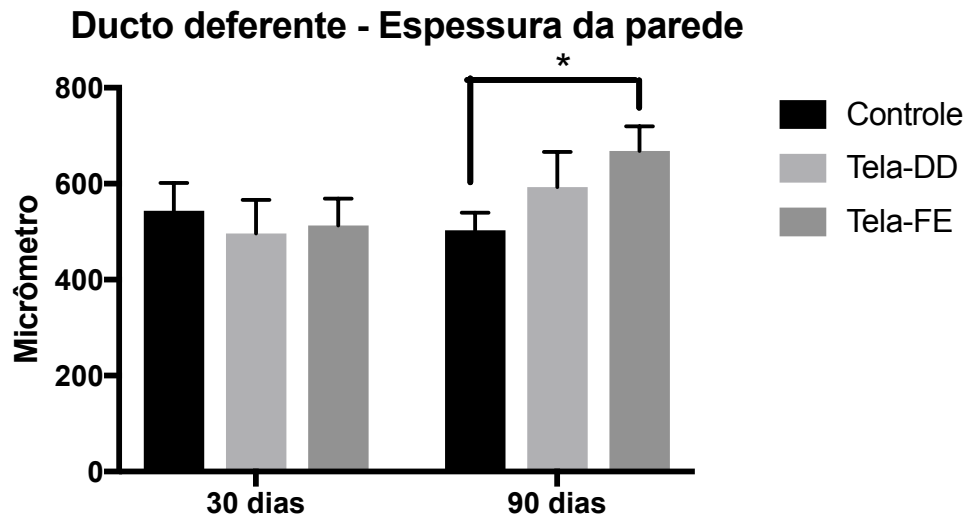
	Espessura da parede		Diâmetro da luz	
	30 dias	90 dias	30 dias [#]	90 dias
Controle	543,7±57,8	503,2±36,26*	44,86±10,55	31,02±15,07
Tela-DD	496,5±70	592,8±73,22	19,43±6,5	33,75±4,32
Tela-FE	513,2±55,93	668,6±50,8*	27,61±3	26,63±5,5

Medidas da espessura da parede expressas em micrômetro e diâmetro da luz em μ^2

* $p<0,05$ Controle x Tela-FE

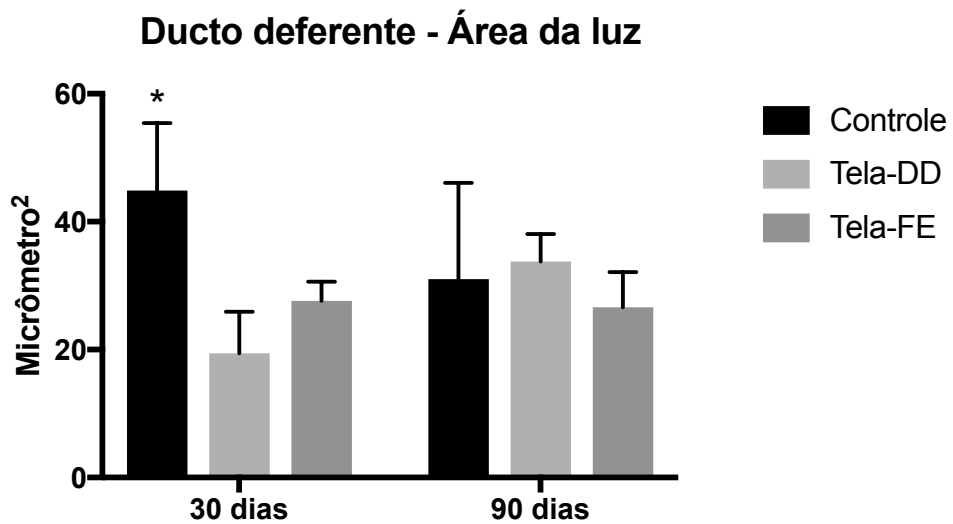
$p<0,05$ Controle x Tela-DD e Tela-FE

ANOVA *Two-way*



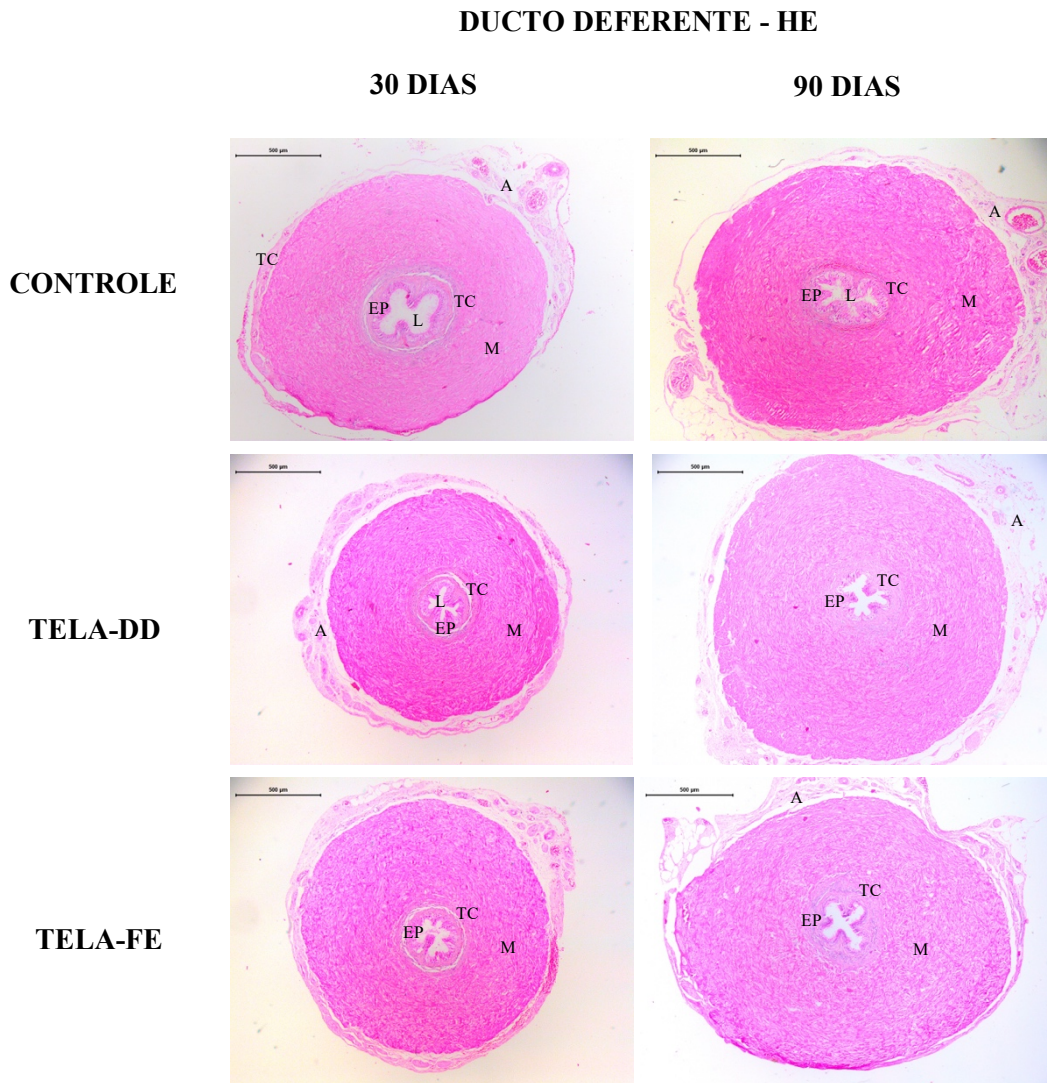
* $p < 0,05$. ANOVA Two-way

Figura 13 - Medidas da espessura da parede do ducto deferente



* $p < 0,05$ 90 dias, Controle x Tela-DD e Tela-FE. ANOVA two-way

Figura 14 - Medidas da área da luz do ducto deferente



EP: Epitélio; L: Luz; M: Músculo; TC: Tecido Conjuntivo; A: Tecido Adiposo; HE: Hematoxilina-Eosina. Zoom 50x

Figura 15 – Fotomicrografias do ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório

4.4 Análise da fibroplasia

A quantificação de colágeno tipo I no ducto deferente foi semelhante entre os grupos enquanto o colágeno tipo III aumentou nos grupos com tela em ambos os períodos analisados ($p < 0,05$). Analisando-se a proporção de colágeno I/III, o implante da tela alterou a qualidade do colágeno às custas do aumento de fibras do tipo III, sendo este aumento igual em ambas as técnicas utilizadas e datas avaliadas (Tabela II, Figuras 16 e 17).

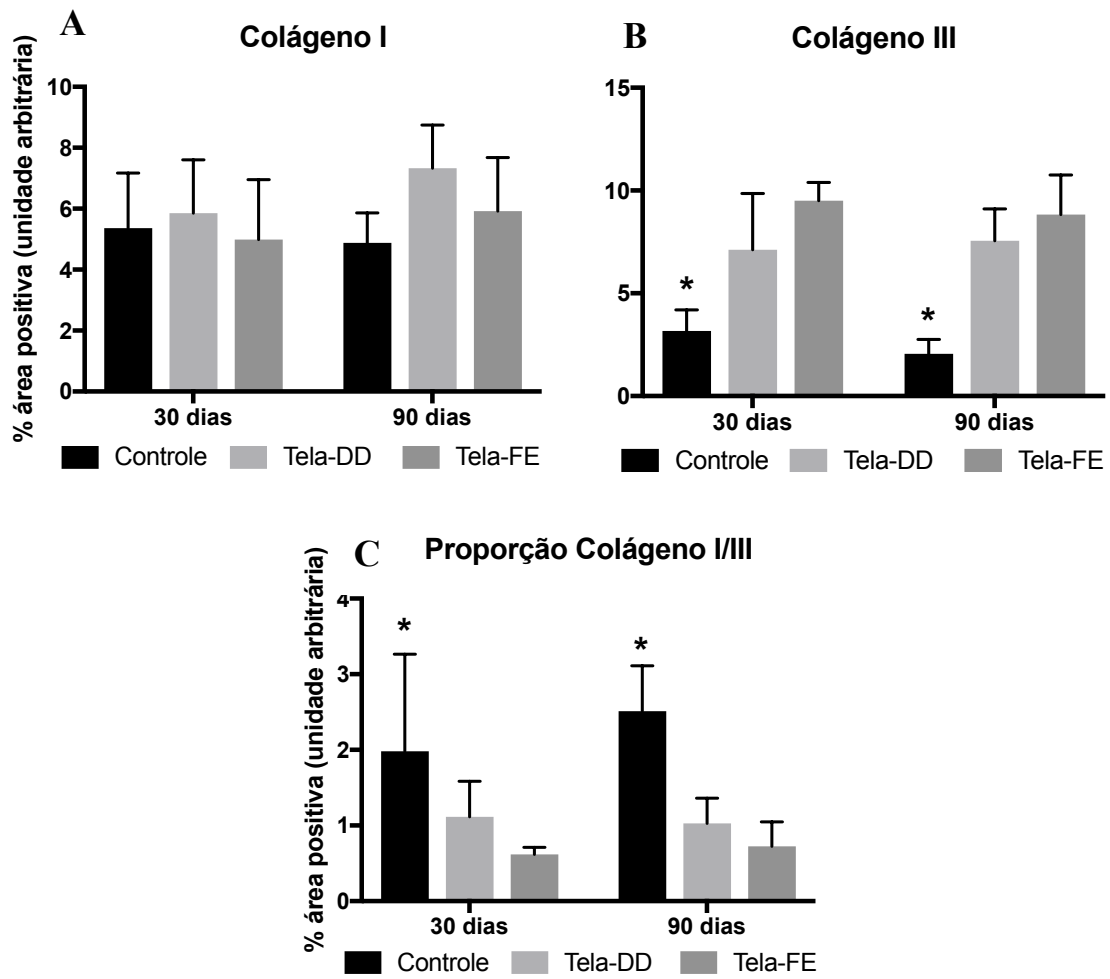
Tabela II – Quantificação de fibras colágenas I e III no ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), após 30 e 90 dias de pós-operatório

	Colágeno tipo I		Colágeno tipo III		Proporção I/III	
	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias
Controle	5,36±1,8	4,87±0,95	3,17±1,02*	2,05±0,7*	1,98±1,28*	2,51±0,6*
Tela-DD	5,85±1,75	7,33±1,41	7,11±2,74	7,56±1,55	1,15±0,47	1,02±0,33
Tela-FE	5±1,96	5,92±1,75	9,5±0,88	8,83±1,91	0,61±0,09	0,72±0,32

Medidas expressas em porcentagem de área positiva (unidade arbitrária)

* $p < 0,05$ Controle x Tela-DD e Tela-FE

Anova *Two-way*



*p<0.05 Controle x Tela-DD e Tela-FE. ANOVA Two-way

Figura 16 - Quantificação de fibras colágenas I e III no ducto deferente (A e B) e Proporção das fibras I/III (C)

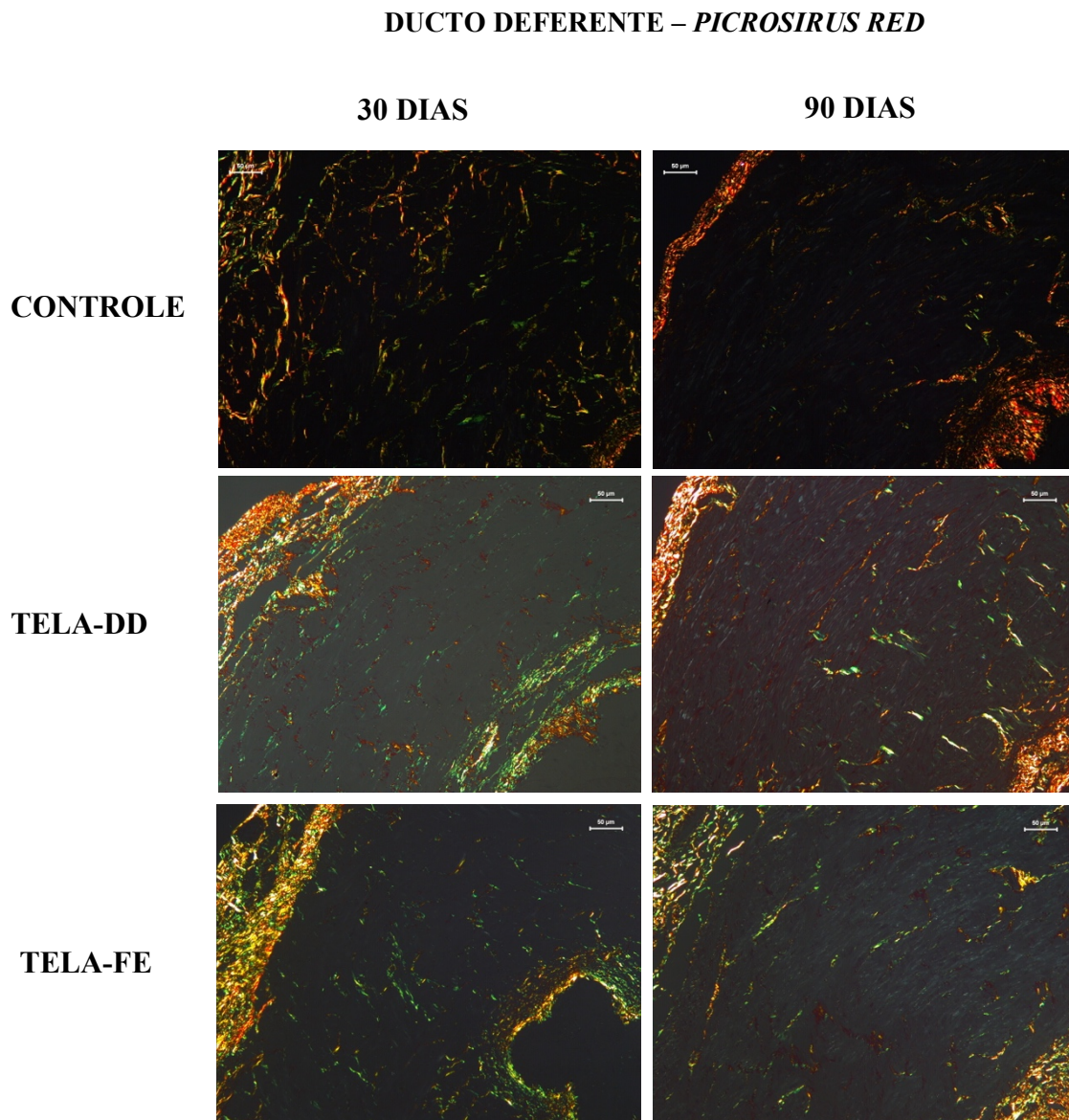
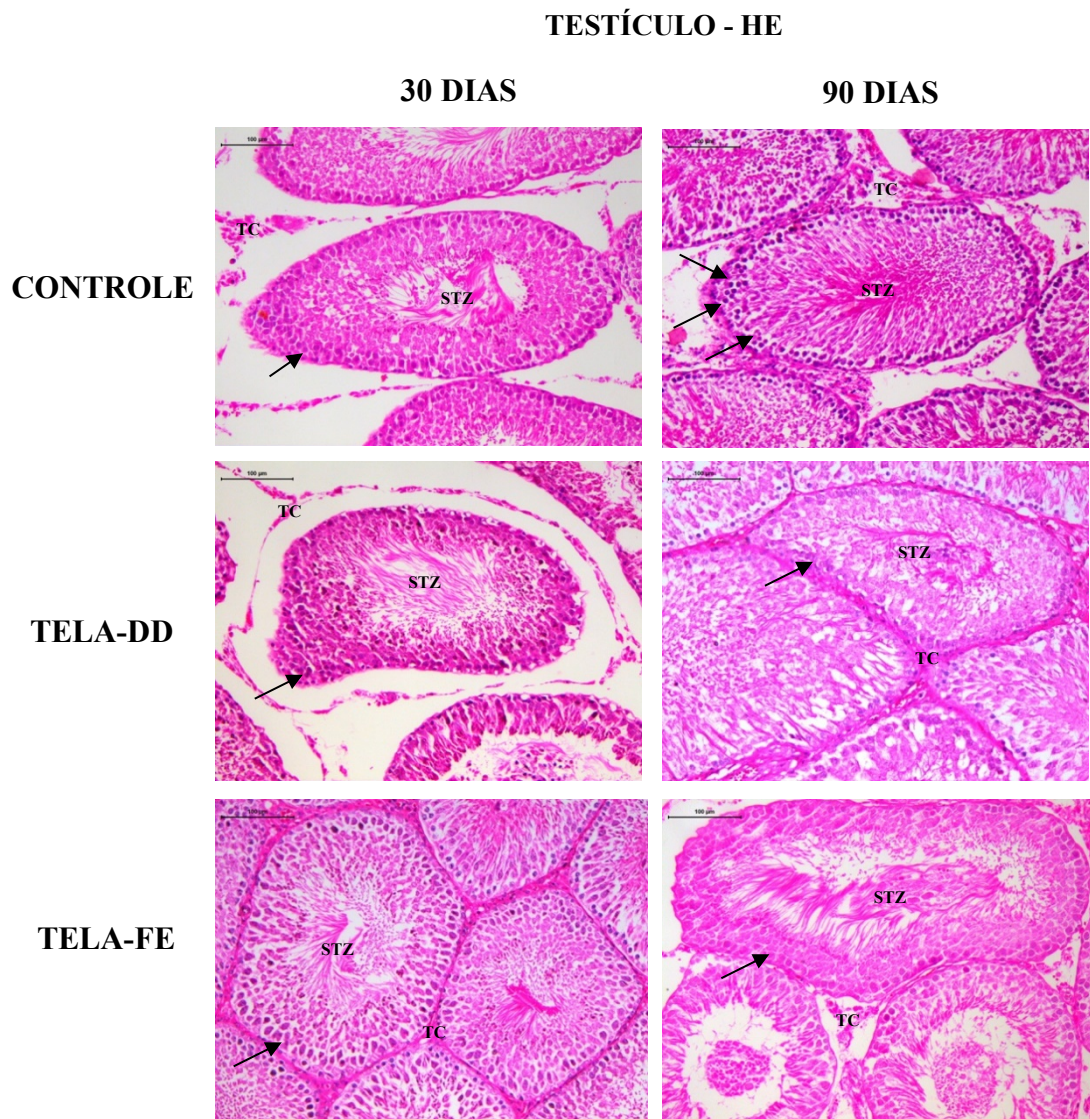


Figura 17 - Painel com fotomicrografias em microscópio de luz polarizada, do ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório mostrando fibras colágenas I e III coradas em vermelho e verde, respectivamente. Coloração pelo Picosirus Red. Zoom 100x

4.5 Análise da espermatogênese

Baseado na graduação de Johnsen (1970),⁶¹ por meio da histologia dos túbulos seminíferos, a espermatogênese estava preservada em todos os animais analisados (n=60) – Grau 10 (Figura 18).



TC: Tecido conjuntivo; STZ: Espermatozoides; Setas: Células germinativas. Zoom 200x.

Figura 18 - Fotomicrografia do testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Não houve alteração da morfologia dos testículos e a espermatogênese encontrava-se preservada em todos os grupos. Corte transversal mostrando os túbulos seminíferos

4.6 Análise Imunohistoquímica

4.6.1 Apoptose

No ducto deferente, a análise da apoptose foi semelhante entre grupos em ambos os ensaios - caspase 3 clivada e TUNEL ($p>0,05$) (Tabela III, Figuras 19, 20 e 21).

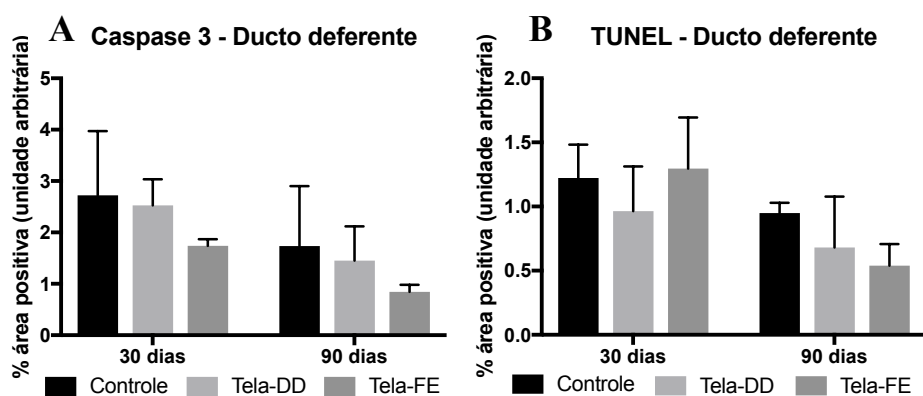
Tabela III – Quantificação da apoptose pela caspase-3 clivada e TUNEL no ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório

DUCTO DEFERENTE				
	Caspase-3 clivada		TUNEL	
	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias
Controle	2,72 ± 1,2	1,73 ± 1,1	1,22 ± 0,2	0,95 ± 0,08
Tela-DD	2,52 ± 0,5	1,45 ± 0,6	0,96 ± 0,3	0,68 ± 0,37
Tela-FE	1,74 ± 0,1	0,84 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,54 ± 0,16

Valores de médias ± desvio padrão.

Medidas expressas em porcentagem de área positiva (unidade arbitrária/ μm^2)

$p>0,05$ ANOVA *two-way*



$P>0,05$. ANOVA Two-way.

Figura 19 - Quantificação da caspase-3 clivada (A) e TUNEL (B) no ducto deferente

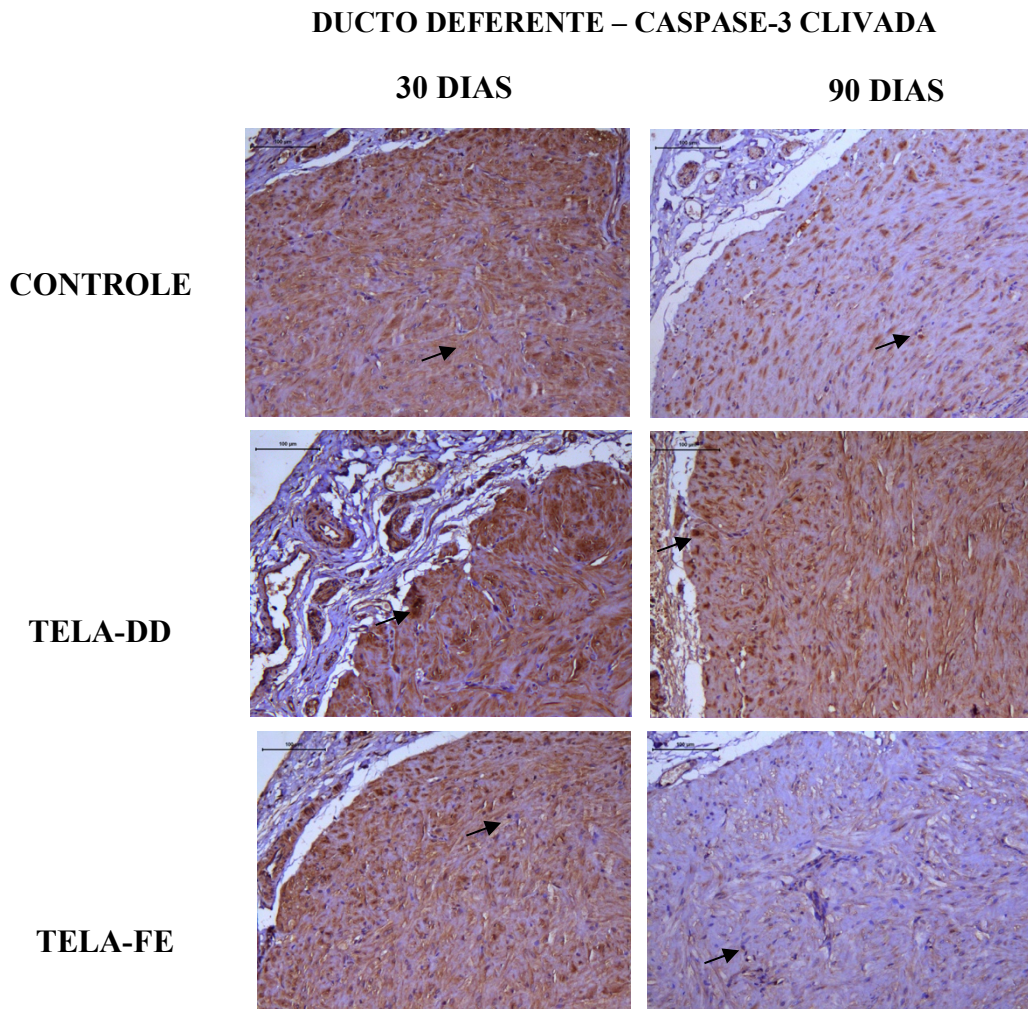


Figura 20 - Fotomicrografias de caspase-3 clivada no ducto deferente de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 200x

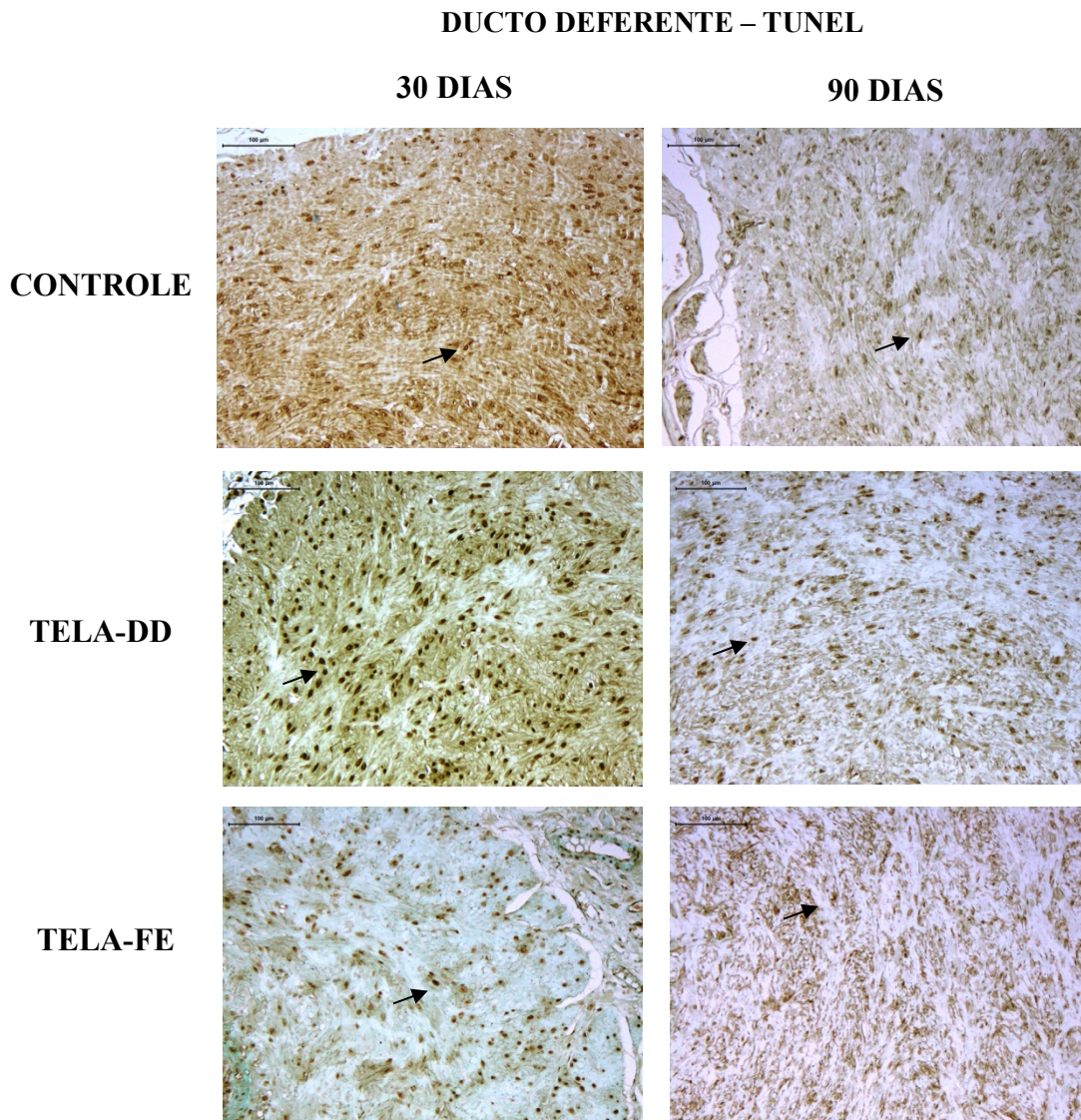


Figura 21 - Fotomicrografias do TUNEL no ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 200x

Nos testículos, não houve diferença para a caspase-3 clivada ($p > 0,05$) entretanto no TUNEL houve diferença estatisticamente significativa nos grupos com tela em relação ao controle às custas de redução da apoptose neste grupo (14,9 em 30 dias para 7,23 em 90 dias). Nos grupos com tela os valores foram semelhantes em ambas as datas (Tela DD de 16,62 para 16,8 e Tela-FE de 19,54 para 23,17 em 30 e 90 dias, respectivamente). (Tabela IV e Figuras 22, 23 e 24).

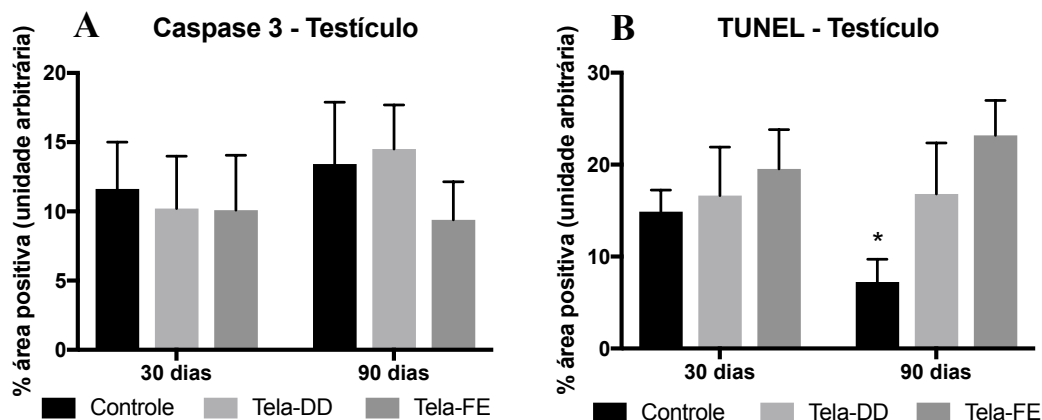
Tabela IV – Quantificação da apoptose pela caspase-3 clivada e TUNEL, no testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório

	TESTÍCULO			
	Caspase-3 clivada		TUNEL	
	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias*
Controle	11,62 ± 3,4	13,41 ± 4,4	14,9 ± 2,3	7,23 ± 2,5
Tela-DD	10,21 ± 3,7	14,51 ± 3,1	16,62 ± 5,2	16,8 ± 5,5
Tela-FE	9,7 ± 3,8	9,4 ± 2,7	19,54 ± 4,2	23,17 ± 3,8

Valores de médias ± desvio padrão.

Medidas expressas em porcentagem de área positiva (unidade arbitrária/um²)

* $p < 0,05$ TUNEL, 90 dias, Controle x Tela-DD e Tela-FE. ANOVA *two-way*



* $p < 0,05$, 90 dias Controle x Tela-DD e Tela-FE. ANOVA Two-way

Figure 22 - Quantificação da Caspase-3 clivada e TUNEL no testículo

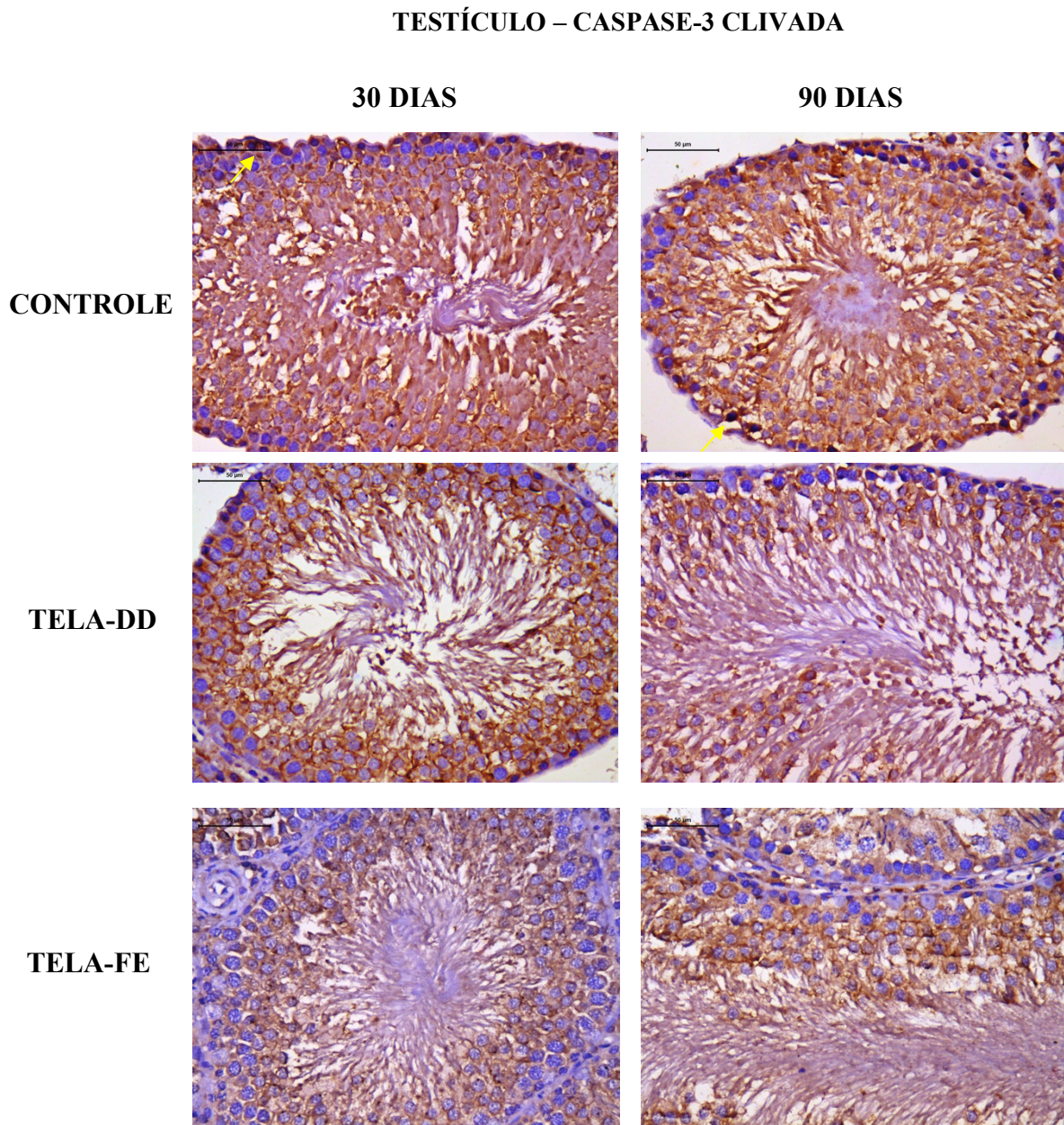


Figura 23 - Fotomicrografias da caspase-3 clivada no testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 400x

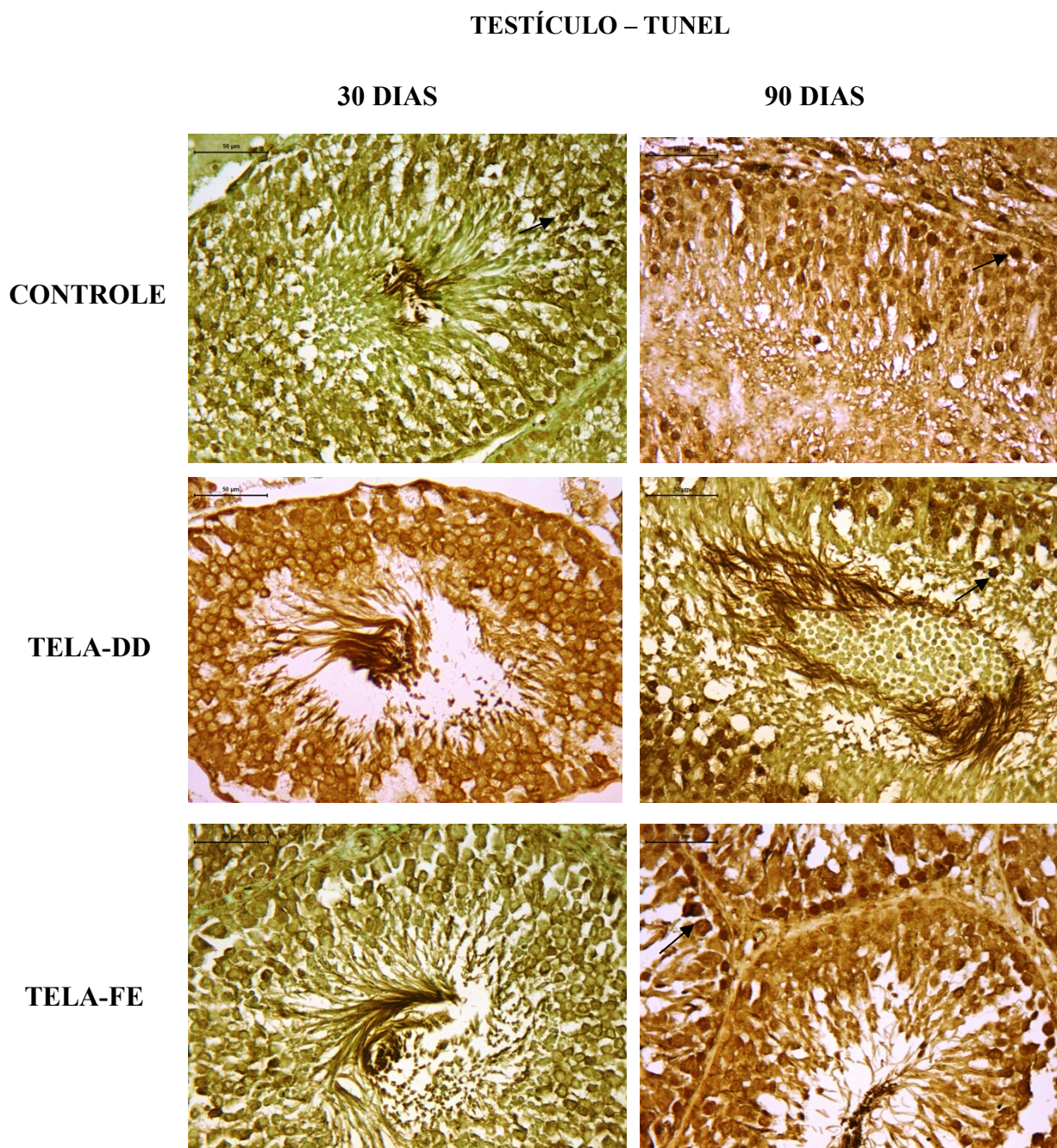


Figura 24 - Fotomicrografias do TUNEL no testículo de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 400x

4.7 Proliferação celular

Nos grupos com tela, houve aumento da proliferação celular no ducto deferente tanto em 30 dias quanto em 90 dias (30 dias $p < 0,05$ Controle x Tela-FE; 90 dias $p < 0,05$).

Nos testículos, a proliferação aumentou apenas em 90 dias ($p < 0,05$ Controle x Tela-DD). (Tabela V, Figuras 25, 26, 27, e 28).

Tabela V – Quantificação da proliferação celular pelo Ki-67 no ducto deferente e testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório

Ki-67	Ducto deferente		Testículo	
	30 dias	90 dias	30 dias	90 dias
Controle	0,005 ± 0,0057*	0 [#]	0,23 ± 0,2	0,41 ± 0,2 [#]
Tela-DD	0,09 ± 0,026	0,14 ± 0,01 [#]	2,03 ± 1,1	3,84 ± 0,6 [#]
Tela-FE	0,09 ± 0,027*	0,042 ± 0,001	0,86 ± 0,5	2 ± 0,6

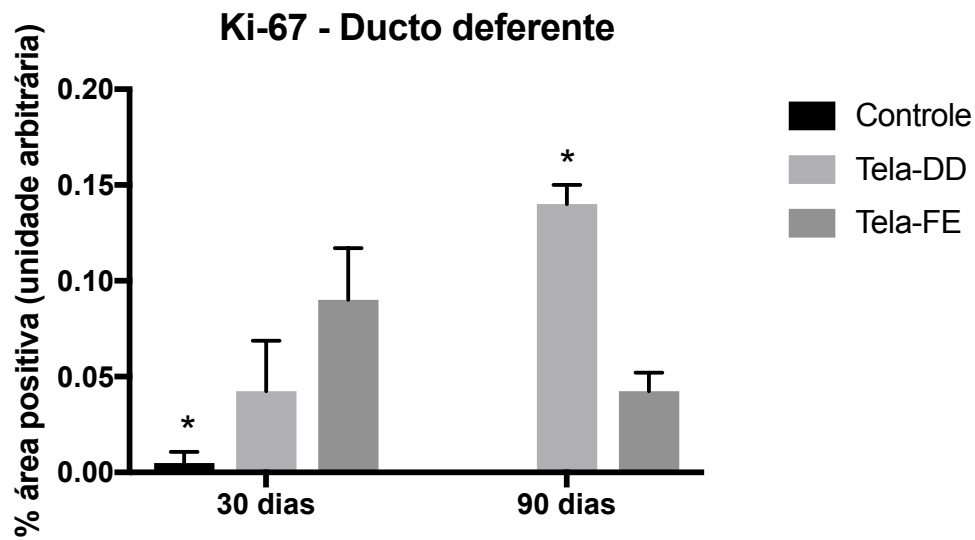
Valores de médias ± desvio padrão.

Medidas em unidade arbitrária/ μm^2

* $p < 0,05$ Ki-67 30 dias Controle x Tela-FE

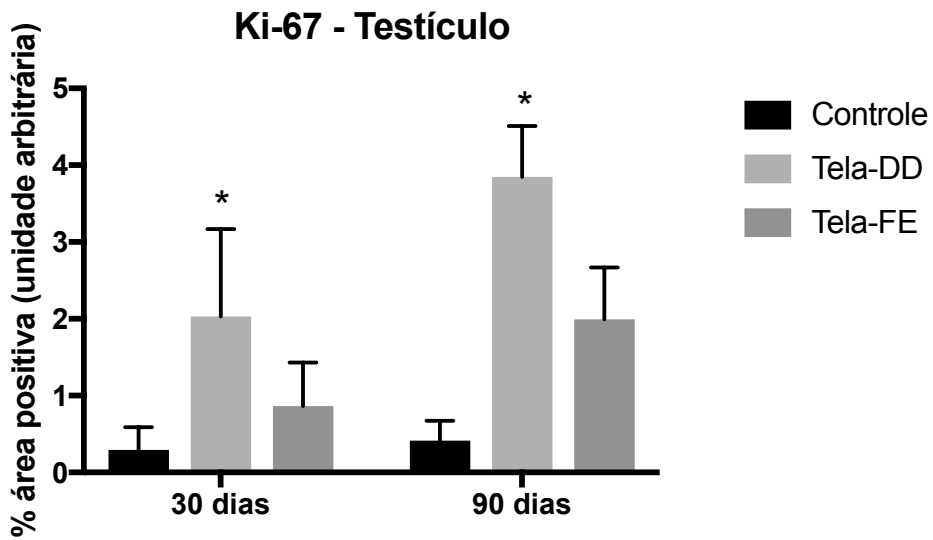
$p < 0,05$ Ki-67 90 dias Controle x Tela-DD

ANOVA *two-way*



* $p < 0,05$. ANOVA Two-way.

Figura 25 - Quantificação do Ki67 no ducto deferente



* $p < 0,05$. ANOVA Two-way.

Figura 26 - Quantificação do Ki67 no testículo

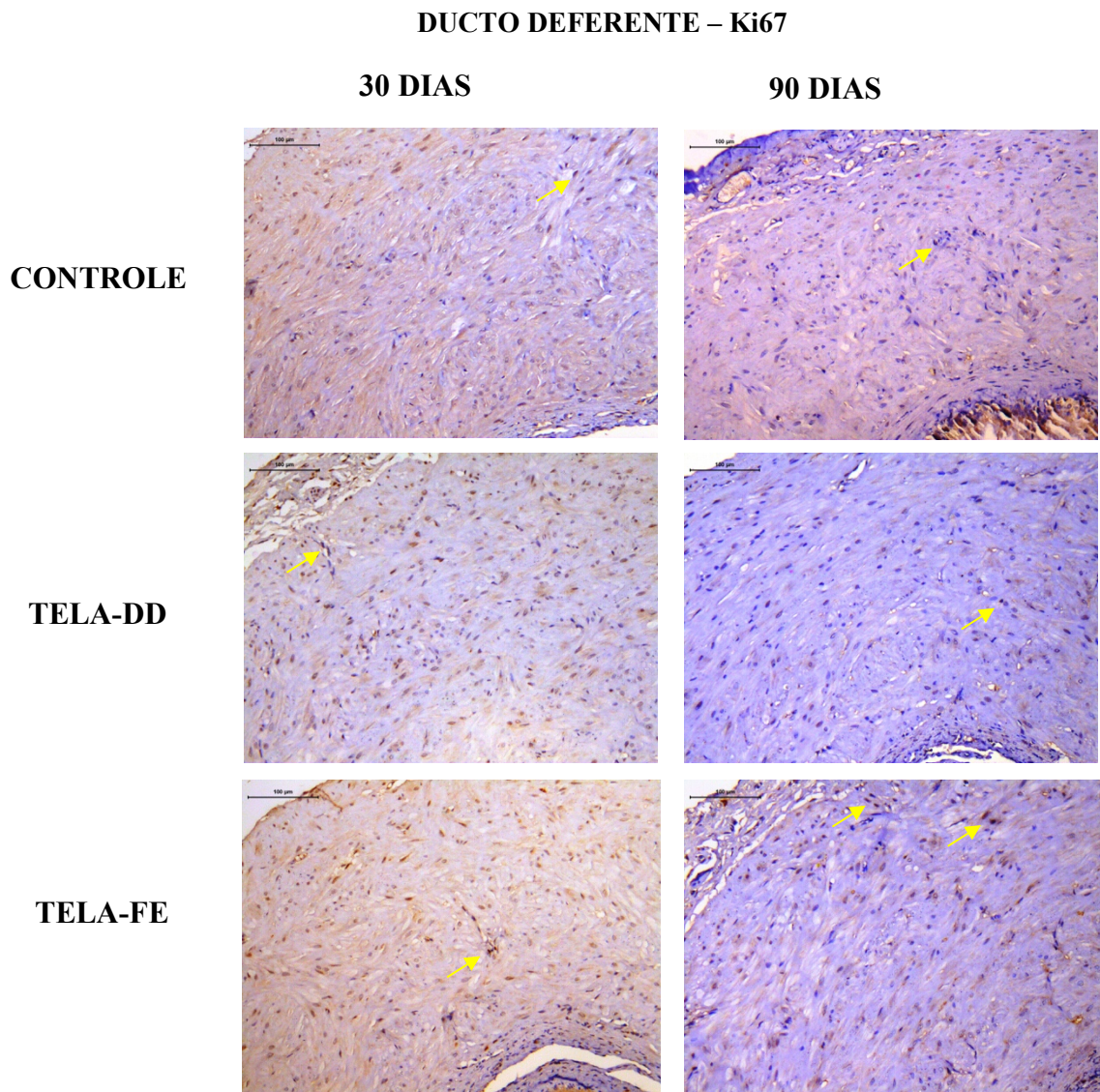


Figura 27 - Fotomicrografias do Ki-67 no ducto deferente de ratos submetidos à inguinitomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 50x

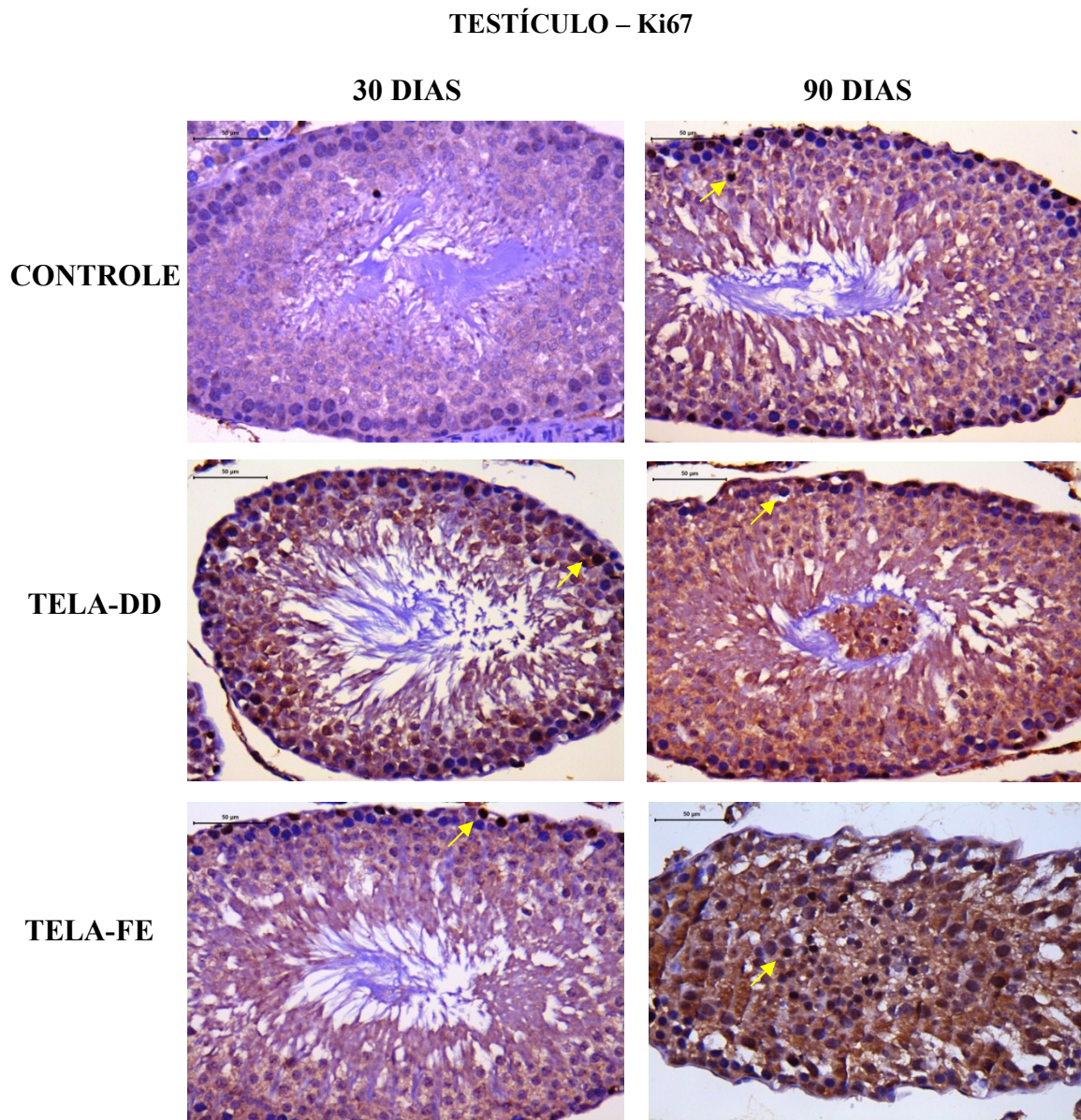


Figura 28 - Fotomicrografias do Ki-67 no testículo de ratos submetidos à inguinotomia bilateral sem tela (Controle) e com colocação de tela (Tela-DD e Tela-FE), em 30 e 90 dias de pós-operatório. Células marcadas em marrom escuro são consideradas positivas (setas). Zoom 400x

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Racional do trabalho

A hernioplastia inguinal é uma das operações eletivas mais realizadas na cirúrgica geral ⁶². O uso de telas sintéticas foi um marco no tratamento das hérnias. Desde a utilização por Usher em 1958 ⁶³, e a sua popularização por Lichtenstein ⁷ na década de 80, ocorreu redução expressiva nos índices de recidiva, com baixa taxa de complicação em comparação às técnicas sem tela ¹⁰ e proporcionou retorno mais rápido às atividades físicas. O tratamento tornou-se eficaz, proporcionando melhor qualidade de vida ⁸.

O tipo de tela mais utilizada é a de material sintético de PP, tanto por via aberta quanto laparoscópica. As telas de PP são hidrofóbicas, eletricamente neutras e macroporosas, o que facilita a sua integração nos tecidos e reduz a possibilidade de infecção. Esse material provoca uma reação inflamatória do tipo corpo estranho ao seu redor, seguida por fibrose e formação de cicatriz em rede na parede abdominal ^{13, 15, 18, 64}. Esse é o mecanismo responsável pela redução das recidivas. Entretanto, têm sido motivo de discussão por supostamente estar relacionado com a infertilidade, uma complicação iatrogênica rara e antes subestimada ²¹.

No reparo da hérnia inguinal, os elementos do funículo espermático são amplamente manipulados, de forma que a dissecação cirúrgica pode acarretar trauma no ducto deferente, causando mudanças tróficas nos testículos, com consequente infertilidade. Para tanto, existem dois mecanismos descritos: 1) Lesão direta dos

elementos do cordão espermático durante a manipulação cirúrgica; ou 2) Reação inflamatória tipo corpo estranho induzida pela tela. A lesão do testículo, que eventualmente leva à atrofia, é relatada em 0,5% dos pacientes com hérnia primária e 5% com reparos de hérnia recorrente ^{24, 65}. Entretanto, a relação causal com obstrução dos ductos deferentes e/ou alterações testiculares ainda não foi comprovada ²¹.

5.2 Situação atual do problema

Em revisão sistemática com sete ensaios clínicos randomizados, os dados sugerem que a hernioplastia com tela, tanto via aberta quanto laparoscópica, não tem efeito significativo sobre a fertilidade masculina ⁴⁷, pois as alterações no fluxo sanguíneo testicular são transitórias e não há reação autoimune clinicamente relevante ⁴⁹. Se estas alterações nos parâmetros de fluxo permanecem no período pós-operatório tardio, e se elas têm impacto clínico relevante em eventuais complicações, devem ser avaliadas em estudos clínicos e experimentais adicionais ⁴⁰.

5.3 Modelo experimental

Embora existam limitações nos modelos experimentais, pelas características inerentes a cada espécie, estes modelos são de grande contribuição para fazer o translacional com humanos pois permite realizar análises impossibilitadas por razões éticas. As avaliações histomorfométricas, de fibras colágenas e imunohistoquímicas realizadas no presente estudo só seriam possíveis em humanos por meio de exames invasivos para obtenção de amostras histológicas, o que as inviabiliza. A análise da

espermatogênese é amplamente utilizada em estudos clínicos mas, em sua maioria, não faz correlação com os achados histológicos e marcadores de apoptose e inflamação, por não dispor de amostras de tecido do ducto deferente e testículo.

A maioria dos trabalhos experimentais que avaliam o impacto da hernioplastia sobre a fertilidade masculina são de mais de 10 anos, com resultados diversos e divergentes. Estes modelos experimentais utilizam técnicas cirúrgicas diferentes para cada lado da região inguinal do mesmo animal ou diferentes tipos de tela em cada lado, e analisa apenas a região do ducto deferente em contato com a tela. No presente estudo, foi utilizado o mesmo tipo de tela de PP em todos os animais e a mesma técnica cirúrgica em ambas regiões inguinais do mesmo animal, simulando o posicionamento da tela de PP, em relação ao ducto deferente e o músculo, nas duas técnicas utilizadas na prática clínica, a via anterior e a via posterior. Com isso, se elimina vieses relacionados a um possível efeito humoral do lado contralateral. Para as análises aqui realizadas, foi padronizado sempre o lado direito de todos os animais.

Estudo prévio do nosso Grupo de Parede Abdominal da Divisão de Clínica Cirúrgica III do Hospital das Clínicas da FMUSP, comparou ratos adultos intactos com ratos submetidos à inguinotomia bilateral, dissecação do ducto deferente, sem implante de tela. Identificamos a existência de um estreitamento anatômico no 1/3 inferior (caudal) do ducto deferente de ratos adultos, em que a espessura da parede é menor e o diâmetro da luz maior ⁵⁹. Achados como estes mostram a relevância do grupo controle (sem cirurgia) e do grupo com cirurgia sem uso de tela (inguinotomia) em um modelo experimental, ambos fundamentais para descrever a anatomia do animal, possibilitar uma avaliação mais detalhada neste órgão ou de outras variáveis

envolvidas (tais como imunohistoquímica e fibrose, por exemplo), além de nortear estudos futuros dentro da linha de pesquisa.

Dessa forma, julgamos ser passível de questionamentos os resultados de modelos experimentais que avaliam os efeitos da tela sem ter um grupo controle para comparação, mesmo que o objetivo desses seja comparar diferentes tipos de tela entre si no mesmo animal. Baseado neste estudo preliminar e também no preceito da ética quanto ao uso racional de animais em pesquisa, no presente estudo foi padronizado como grupo controle animais submetidos à inguinotomia bilateral, dissecação do ducto deferente, sem uso de tela pois julgamos não ser mais necessário incluir animais intactos em estudos futuros.

Ainda com base neste estudo prévio, as análises foram realizadas em diferentes segmentos do ducto deferente: proximal (acima da tela), medial (em contato com a tela) e cranial (abaixo da tela). A cirurgia, com ou sem uso de tela por duas técnicas diferentes, não alterou a histomorfometria dos diferentes segmentos do ducto deferente. Uma vez comprovado que não há alteração funcionalmente relevante no ducto deferente, nem à montante (acima) nem à jusante (abaixo) ao segmento com tela ⁵⁹, no presente estudo julgamos ser relevante avaliar apenas o segmento em contato com a tela para otimizar as análises.

Como em humanos algumas alterações descritas são transitórias ^{13, 21, 36, 47}, foram realizadas duas datas de eutanásia, tanto no ducto deferente quanto no testículo: 30 e 90 dias de pós-operatório, que refletirão achados a médio e longo prazo, respectivamente. Como o metabolismo do rato é mais acelerado do que o humano, optou-se por não realizar análises anteriores a 30 dias de pós-operatório, que seriam consideradas de curto prazo ⁶⁶.

5.4 Macroscopia

Na avaliação macroscópica da região inguinal, os animais do grupo controle não apresentavam aderências na região operada. Já os animais com tela apresentavam aderências envolvendo estruturas adjacentes, sem complicações como hematomas, abscessos ou deiscências da ferida operatória na avaliação aos 30 e 90 dias de pós-operatório. Estes achados são semelhantes a análise macroscópica da implantação de tela de PP no defeito da parede abdominal de ratos ⁶⁷ e observados em cães ao se comparar a necropsia de animais submetidos à inguinotomia com ou sem implante de tela de PP ⁵⁸.

Após a colocação da tela tanto por via anterior ou posterior (pré-peritoneal) em animais de experimentação, a reação inflamatória que incorpora a tela aparece entre a 1^o a 12^o semana ^{42, 51, 52, 54, 58}. A extensão da reação inflamatória ao redor da tela implantada depende da estrutura e do material incorporado. Os estudos de biocompatibilidade mostraram que as telas com poros maiores e quantidade reduzida de PP (baixa densidade) resultam em menor inflamação e fibrose após o implante, em comparação com as telas de alta densidade ^{64,68}, como a tela de PP utilizada em nosso estudo.

No grupo controle, submetido apenas à manipulação da região inguinal (sem tela), não havia aderências e nos animais com tela havia aderências no músculo, funículo espermático e ducto deferente, sendo a maior aderência entre a tela e o ducto deferente no grupo Tela-DD.

5.5 Morfologia, morfometria e espermatogênese

O implante da tela de PP não alterou a morfologia do ducto deferente ou do testículo após 30 e 90 dias de pós-operatório, e também não foi observado reação inflamatória, mesmo no grupo em que a tela fica em contato direto com o ducto deferente, que teria um risco teórico maior de reação inflamatória. Pode ser que a escassez de achados inflamatórios, principalmente no ducto deferente, em que há contato direto com a tela, seja pela avaliação ser mais tardia, e coincidem com os relatos da literatura, em que a grande maioria a avaliação é realizada após 90 dias do implante da tela ^{41, 42, 51, 52, 55, 57}.

O uso da tela reduziu a luz do ducto deferente após 30 dias, mas em 90 dias os valores estavam semelhantes ao grupo controle. Estes achados nos fazem supor que a manipulação cirúrgica da região inguinal por si só promove alterações transitórias sobre o ducto deferente. Após 90 dias, o grupo Tela-FE apresentou espessamento da parede, sem repercussão sobre a sua luz. Tais achados histomorfométricos não tiveram impacto sobre a espermatogênese, que se encontrava preservada em todos os animais, à semelhança de outros relatos ^{41, 52, 57}.

Talvez a presença da tela e o processo inflamatório gerado por ela, não sejam o mais importante para alterar a morfometria do ducto deferente, pois quando analisamos a lesão iatrogênica (compressão direta) do ducto deferente em ratos, sem uso de tela, as mudanças histopatológicas são mais intensas e graves, quanto maior for o trauma, com aparecimento de granuloma espermático, fibrose e obstrução da luz ³⁹.

Nossos achados coincidem com os relatos de Berndsen e col. (2004)⁵⁵ que relataram a patência do ducto deferente de ratos após 90 dias do implante de tela PP simulando a técnica de Lichtenstein, além de níveis séricos normais de testosterona. Estes autores relataram ainda maior inflamação e fibrose com o uso da tela, mas sem repercussão nos animais. Estudos semelhantes corroboram que a tela de PP não altera os níveis hormonais de testosterona⁵⁹, FSH e LH⁵⁶.

Uzzo e col. (1999)⁵² foram os primeiros autores a descrever alterações induzidas pelo reparo com tela em experimento com animais. Avaliando após 6 e 12 meses, cães da raça beagle submetidos a reparo da hérnia experimentalmente induzida com tela de Marlex®, observaram redução da luz do ducto deferente e alterações testiculares, como hidrocele e isquemia, em metade dos animais analisados, embora os ductos deferentes estivessem patentes nos exames de vasografia e o espermograma normal. Além destas alterações, outro modelo experimental em cães, também relatou redução da espermatogênese. Entretanto, este modelo experimental falha pela falta de homogeneidade da amostra – foram utilizados cães com variação de peso de mais de 10kg, sem relato da idade ou raça e sem avaliação fidedigna do estado de saúde previamente ao procedimento, o que pode ser um grande viés⁵⁸.

Um dos poucos estudos que relatam alterações no ducto deferente de ratos com comprometimento da sua função foi realizado após 90 e 120 dias do implante da tela de PP. Os autores descrevem dificuldade na condução dos espermatozoides, com consequente dilatação e acúmulo destes no ducto deferente antes da tela de PP, sem repercussão sobre o testículo. Estes autores analisaram cortes transversais do ducto deferente⁵⁴. Os resultados diferem de estudo prévio realizado por nosso grupo em

que não observamos alteração no ducto deferente em contato com a tela, tanto em situação proximal ou distal à mesma ⁵⁹. Estudo em coelhos comparou o efeito da tela de PP de alta densidade com a tela de PP de baixa densidade (UltraPro®), também observou obstrução de até 50% dos ductos deferentes no lado em que foi utilizada a tela de PP de alta densidade, avaliado através de vasografia, sem afetar a espermatogênese, apoptose ou proliferação celular ⁵⁷. Os modelos citados utilizaram o lado contralateral como controle, diferentemente do nosso estudo em que foi utilizada a mesma técnica em ambos os lados do mesmo animal, o que pode justificar as diferenças nos achados.

5.6 Fibroplasia

O implante da tela de PP induz uma reação de corpo estranho local e inflamação crônica, com envolvimento de fatores inflamatórios sistêmicos ⁶⁴. Sendo assim, o aumento da fibrose após o implante é um achado esperado. A questão crucial é saber se este aumento é autolimitado e com o tempo, ocorre estabilização da produção de colágeno, com equilíbrio na proporção entre colágeno imaturo e maduro. Se a reação for exacerbada e houver produção contínua e desordenada de fibras colágenas imaturas, há um risco teórico de obstrução da luz do ducto deferente, seja através de mecanismo direto (aumento da espessura da parede) ou indireto (compressão extrínseca).

Os primeiros estudos com hérnia e síntese de colágeno já mostravam que uma alteração no balanço do colágeno tipo III pode estar relacionado ao desenvolvimento de hérnias ⁶⁹. A análise da proporção de colágeno I/III permite avaliar a qualidade do

colágeno no ducto deferente, pois quanto menor a relação de colágeno I/III, menor a força tênsil, já que o colágeno tipo I é maduro e forte e o colágeno tipo III é imaturo e mais fino, encontrado nas fases iniciais da cicatrização. A cicatrização prejudicada, com alterações na produção e degradação do colágeno, pode levar a menor estabilidade mecânica do tecido conjuntivo e aumento na recidiva de hérnias. Neste contexto, o estudo dos tipos de colágeno pode identificar pacientes de risco para recidiva ⁷⁰. No presente estudo, a quantificação do tipo de fibras colágenas foi realizada na parede do ducto deferente e não no tecido conjuntivo circunjacente como realizados em trabalhos prévios.

O implante da tela de PP aumentou o colágeno tipo III (imaturo) no ducto deferente de ambos grupos após 30 e 90 dias de pós-operatório, sem interferir no colágeno tipo I (maduro). Nossos achados nos fazem supor que a produção de colágeno tipo III é estabilizada já em médio prazo (30 dias), com integração da tela ao hospedeiro e menor chance de possíveis obstruções na luz do órgão em longo prazo (a partir de 90 dias). Mesmo com a produção aumentada de colágeno tipo III nos grupos com tela, não houve alteração histomorfométrica no ducto deferente.

Kolbe e col. (2007) ⁵³ também relataram aumento de fibras colágenas ao redor da tela de PP após 30 e 120 dias do implante em ratos, sem diferença entre as datas analisadas, entretanto estes autores não individualizaram o tipo de fibra colágena (I e III), como realizado no presente estudo. Em outro estudo mais recente, os autores avaliaram o depósito de colágeno na região em contato com a tela de PP na parede abdominal de ratos. Houve maior resposta inflamatória tecidual na fase precoce (7 dias) com conseqüente maior depósito de colágeno na fase tardia (40 dias) comparado com outros dois tipos de tela (PP+Poliglactina e PP+Titânio). Estes

autores ressaltam que a resposta inflamatória aguda mais intensa nas fases iniciais do processo, levam a maturação tecidual mais rápida, e o consequente aumento do depósito de colágeno na fase mais tardia ^{71, 72}. Em nosso estudo, não observamos o aumento de fibras colágenas em fase mais tardia como descrito por estes autores, e sim que a proporção de fibras colágenas foi semelhante em médio e longo prazo (30 e 90 dias, respectivamente). Esta diferença de achados pode ser devido os parâmetros adotados, pois este autor considerou tardio 40 dias após o implante e em nosso estudo foi considerado 90 dias, ocasião em que já deve ter ocorrido estabilização do processo cicatricial.

5.7 Apoptose

A tela de PP não induziu apoptose no ducto deferente, mas no testículo promoveu aumento em longo prazo (90 dias). Na verdade, esse resultado no testículo se deu pela maior redução da apoptose de 30 para 90 dias no grupo controle em comparação com os grupos com tela. Nestes últimos, os valores permaneceram praticamente semelhantes em ambas as datas de observação e coincidem com os relatos na literatura de análises tardias, com 120 e 180 dias pelo bcl-2 e TUNEL, respectivamente ^{53, 56}.

Estudo mais recente relata alterações morfológicas nos túbulos seminíferos de ratos após 90 dias do implante (formação de cavidades), além da redução no número de espermatozoides tipo a+b e aumento de anticorpos anti-esperma e do fator indutor de hipóxia (HIF-1 α) nos testículos ⁵⁰. A significância clínica destes achados poderia ser mais bem avaliada se os animais fossem acasalados, o que não foi realizado.

5.8 Proliferação

O implante da tela de PP induziu aumento na proliferação celular no ducto deferente e testículo apenas no grupo Tela-DD. Nossos resultados coincidem com dois autores que utilizaram o PCNA como marcador de proliferação celular em ratos, comparando os achados de 7 para 90 dias ⁶⁴ e 30 para 120 dias ⁵³. Entretanto, ambos autores não deixam claro qual tecido foi analisado – no ducto deferente em contato com a tela ou no tecido circunjacente. É válido ressaltar que mesmo com o aumento da proliferação celular e das fibras colágenas, não houve redução da fertilidade desses animais quando acasalados ⁵³.

Os resultados da imunohistoquímica devem ser analisados em conjunto: embora tenha ocorrido aumento da proliferação celular, não houve aumento concomitante da apoptose, o que mostra que as alterações da proliferação celular em longo prazo podem ser compensatórias às alterações inflamatórias que ocorreram nas fases iniciais e não comprometem a funcionalidade do órgãos avaliados, já que não houve obstrução da luz do ducto deferente ou alteração na espermatogênese.

Considerações finais

Ressaltamos a importância do modelo experimental pois permite a análise de múltiplas variáveis em conjunto de dois órgãos do aparelho reprodutor masculino. A consistência de tais achados fornece subsídios para a pesquisa translacional na linha de pesquisa de infertilidade e hérnia, embasando paradigmas já existentes ou novos que venham a surgir.

A maioria dos trabalhos experimentais analisaram o ducto deferente ou o testículo separadamente, sendo este último menos explorado. A análise do testículo

pela histologia, imunohistoquímica e espermatogênese é um diferencial do nosso trabalho.

A quantificação e análise da qualidade das fibras colágenas no ducto deferente, é uma grande contribuição deste trabalho pois os poucos estudos prévios com análise semelhante, a fizeram no tecido conjuntivo circunjacente à tela, e não na parede do ducto deferente. Com isso, mostramos que o aumento de colágeno no ducto deferente, induzido pela tela de PP, se deve às custas de colágeno tipo III (imaturo e menos firme), não alterando a histomorfometria desta estrutura.

Analisados em conjunto, nossos resultados mostram que a tela de PP, seja em contato direto ou não com as estruturas do funículo espermático, induz alterações transitórias e sem impacto negativo na funcionalidade do ducto deferente e do testículo.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

O implante da tela de PP na região inguinal bilateral de ratos, em contato direto ou não com as estruturas do funículo espermático:

- Promoveu a formação de aderências;
- Não alterou a morfologia do ducto deferente e do testículo;
- Preservou a espermatogênese;
- No ducto deferente promoveu redução do diâmetro da luz (30 dias), aumento da espessura da parede (90 dias), aumento do colágeno tipo III e da proliferação celular (30 e 90 dias), sem alteração no colágeno tipo I e apoptose ($p>0,05$);
- No testículo, a apoptose foi mantida nos grupos com tela (90 dias) e a proliferação celular foi maior no grupo em que a tela estava em contato direto com o ducto deferente em 90 dias.

Analisados em conjunto, nossos resultados mostram que a tela de PP, seja contato direto ou não com as estruturas do funículo espermático, induz alterações transitórias sem impacto negativo na funcionalidade do ducto deferente e testículo.

Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Impacto da hernioplastia inguinal bilateral na fertilidade de ratos: Estudo do ducto deferente e testículos**” protocolo nº **089/15** sob a responsabilidade de **Edivaldo Massazo Utiyama** e **Sérgio Henrique Bastos Damous**, apresentado pelo Departamento de Cirurgia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSAO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 24.06.2015.

Vigência do Projeto	Maio/2017
Espécie/linhagem	rato
Nº de animais	30
Peso/Idade	250 grs
Sexo	macho
Origem	Biotério do ICB

CEUA-FMUSP, 24 de Junho de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

- 1 Goulart A; Martins S. Hérnia inguinal: anatomia, patofisiologia, diagnóstico e tratamento. *Rev Port Cir.* 2015;33:25-42.
- 2 EU Hernia Trialist Collaboration. Mesh compared with non-mesh methods on open groin hernia repair. Systematic review of randomized controlled trial. *Br J Surg.* 2000;87:854-9.
- 3 Maingot R. Operations for inguinal hernia. New York: McGraw-Hill; 1980.
- 4 Ruhl CE, Everhart JE. Risk factors for inguinal hernia among adults in the US population. *Am J Epidemiol.* 2007;165:1154-61.
- 5 Brasil. Ministério da Saúde. Informações de Saúde. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude/tabnet>
- 6 Bassini E. Sulla cura radicale dell'ernia inguinale. *Arch Soc Ital Chir.* 1887:380.
- 7 Lichtenstein IL, Shulman AG, Amid PK, Montllor MM. The tension-free hernioplasty. *Am Surg.* 1989;157(2):188-93.
- 8 Lockhart K, Dunn D, Teo S, Ng JY, Dhillon M, Teo E, van Driel ML. Mesh versus non-mesh for inguinal and femoral hernia repair. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018;9:CD011517.
- 9 McCormack K, Scott NW, Go PM, Ross S, Grant AM; EU Hernia Trialists Collaboration. Laparoscopic techniques versus open techniques for inguinal hernia repair. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(1):CD001785.

- 10 Scott NW, McCormack K, Graham P, Go PM, Ross SJ, Grant AM. Open mesh versus non-mesh for repair of femoral and inguinal hernia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(4):CD002197.
- 11 Zendejas B, Ramirez T, Jones T, Kuchena A, Martinez J, Ali SM, Lohse CM, Farley DR. Trends in the utilization of inguinal hernia repair techniques: a population-based study. *Am J Surg.* 2012;203(3):313-7.
- 12 The Hernia Surge Group. International guidelines for groin hernia management. *Hernia.* 2018;22:1-165.
- 13 Sosin M, Nahabedian MY, Bhanot P. The perfect plane: a systematic review of mesh location and outcomes, update 2018. *Plast Reconstr Surg.* 2018;142(3 Suppl):107S-116S.
- 14 Iakovlev V, Koch A, Petersen K, Morrison J, Grischkan D, Oprea V, Bendavid R. A pathology of mesh and time: dysejaculation, sexual pain, and orchialgia resulting from polypropylene mesh erosion into the spermatic cord. *Ann Surg.* 2018;267(3):569-75.
- 15 Fang Z, Ren F, Zhou J, Tian J. Biologic mesh versus synthetic mesh in open inguinal hernia repair: system review and meta-analysis. *ANZ J Surg.* 2015;85(12):910-6.
- 16 Willaert W, De Bacquer D, Rogiers X, Troisi R, Berrevoet F. Open preperitoneal techniques versus lichtenstein repair for elective inguinal hernias. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;(7):CD008034.
- 17 Patel H, Ostergard DR, Sternschuss G. Polypropylene mesh and the host response. *Int Urogynecol J.* 2012;23(6):669-79.
- 18 Sternschuss G, Ostergard DR, Patel H. Post-implantation alterations of polypropylene in the human. *J Urol.* 2012;188(1):27-32.

- 19 Champault G, Bernard C, Rizk N, Polliand C. Inguinal hernia repair: the choice of prosthesis outweighs that of technique. *Hernia*. 2007;11(2):125-8.
- 20 Matthews RD, Anthony T, Kim LT, Wang J, Fitzgibbons RJ Jr, Giobbie-Hurder A, Reda DJ, Itani KM, Neumayer LA. Factors associated with postoperative complications and hernia recurrence for patients undergoing inguinal hernia repair: a report from the VA Cooperative Hernia Study Group. *Am J Surg*. 2007;194(5):611-7.
- 21 Bouchot O, Branchereau J, Perrouin-Verbe MA. Influence of inguinal hernia repair on male fertility. *J Visc Surg*. 2018;155 Suppl 1:S37-S40.
- 22 Birolini C, Utiyama EM, Rodrigues Jr AJ, Birolini D. Elective colonic operation and prosthetic repair of incisional hernia: does contamination contraindicate abdominal wall prosthesis use? *J Am Coll Surg*. 2000;191:366-72.
- 23 James R. DeBord MD. The historical development of prosthetics in hernia surgery. *Surg Clin North Am*. 1998;78(6):973-1006.
- 24 Fitzgibbons RJ. Can we be sure polypropylene mesh causes infertility? *Ann Surg*. 2005;241(4):559-61.
- 25 WHO, WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. Disponível em:
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9780521431361/en/>
- 26 Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci*. 2015;8(4):191-6.

-
- 27 Matsuda T, Horii Y, Yoshida O. Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril.* 1992;58:609-13.
 - 28 Pollack R, Nyhus LM. Complications of groin hernia repair. *Surg Clin N Amer.* 1983;83:1363.
 - 29 Lynn HB, Johnson WW. Inguinal herniorrhaphy in children. A critical analysis of 1,000 cases. *Arch Surg.* 1961;83:573-9.
 - 30 Sparkman RS. Bilateral exploration in inguinal hernia in juvenile patients. *Surgery.* 1962;51:393.
 - 31 Shin D, Lipshultz LI, Goldstein M, Barmé GA, Fuchs EF, Nagler HM, McCallum SW, Niederberger CS, Schoor RA, Brugh VM, Honig SC. Herniorrhaphy with polypropylene mesh causing inguinal vasal obstruction: a preventable cause of obstructive azoospermia. *Ann Surg* 2005;241(4):553-8.
 - 32 Ridgway PF, Shah J, Darzi AW. Male genital tract injuries after contemporary inguinal hernia repair. *BJU Int.* 2002;90(3):272-6.
 - 33 Wantz GE. Testicular atrophy as a sequela of inguinal hernioplasty. *Int Surg.* 1986;71:159-63.
 - 34 Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Wein AJ (ed) *Campbell–Walsh urology.* 9th edn. China: Saunders Elsevier; 2007. p 38-77.
 - 35 Dohle GR, van Rooijen JH, Pierik FH, Vreeburg JT, Weber RF. Subtotal obstruction of the male reproductive tract. *Urol Res.* 2003;31(1):22-4.

-
- 36 Tekatli H, Schouten N, van Dalen T, Burgmans I, Smakman N. Mechanism, assessment, and incidence of male infertility after inguinal hernia surgery: a review of the preclinical and clinical literature. *Am J Surg*. 2012;204(4):503-9.
- 37 Lee SL, DuBois JJ, Rishi M. Testicular damage after surgical groin exploration for elective herniorrhaphy. *J Pediatr Surg*. 2000;35(2):327-30.
- 38 Sheynkin YR, Hendin BN, Schlegel PN, Goldstein M. Microsurgical repair of iatrogenic injury to the vas deferens. *J Urol*. 1998;159(1):139-41.
- 39 Abasiyanik A, Güvenç H, Yavuzer D, Peker O, Ince U. The effect of iatrogenic vas deferens injury on fertility in an experimental rat model. *J Pediatr Surg*. 1997;32(8):1144-6.
- 40 Dilek ON. Hernioplasty and testicular perfusion. *Springerplus*. 2014;3:107.
- 41 Junge K, Binnebösel M, Kauffmann C, Rosch R, Klink C, von Trotha K, Schoth F, Schumpelick V, Klinge U. Damage to the spermatic cord by the Lichtenstein and TAPP procedures in a pig model. *Surg Endosc*. 2011;25(1):146-52.
- 42 Peiper C, Junge K, Klinge U, Strehlau E, Krones C, Ottinger A, Schumpelick V. The influence of inguinal mesh repair on the spermatic cord: a pilot study in the rabbit. *J Invest Surg*. 2005;18(5):273-8.
- 43 Turgut AT, Olçücüoğlu E, Turan C, Kiliçoğlu B, Kosar P, Geyik PO, Kosar U, Dogra V. Preoperative ultrasonographic evaluation of testicular volume and blood flow in patients with inguinal hernias. *J Ultrasound Med*. 2007;26(12):1657-66;1667-9.
- 44 Yavetz H, Harash B, Yogev L, Homonnai ZT, Paz G. Fertility of men following inguinal hernia repair. *Andrologia*. 1991;23(6):443-6.

- 45 Hallén M, Westerdahl J, Nordin P, Gunnarsson U, Sandblom G. Mesh hernia repair and male infertility: a retrospective register study. *Surgery*. 2012;151(1):94-8.
- 46 Kordzadeh A, Liu MO, Jayanthi, NV. Male infertility following inguinal hernia repair: a systematic review and pooled analysis. *Hernia*. 2017;21(1):1-7.
- 47 Dong Z, Kujawa SA, Wang C, Zhao H. Does the use of hernia mesh in surgical inguinal hernia repairs cause male infertility? A systematic review and descriptive analysis. *Reprod Health*. 2018;15(1):69.
- 48 Roos MM, Clevers GJ, Verleisdonk EJ, Davids PH, van de Water C, Spermon RJ, Mulder LS, Burgmans JPJ. Bilateral endoscopic totally extraperitoneal (TEP) inguinal hernia repair does not impair male fertility. *Hernia*. 2017;21(6):887-94.
- 49 Stula I, Družijanić N, Sršen D, Capkun V, Perko Z, Sapunar A, Kraljević D, Bošnjak N, Pogorelić Z. Influence of inguinal hernia mesh repair on testicular flow and sperm autoimmunity. *Hernia*. 2012;16(4):417-24.
- 50 Xu H1, Chen M1, Xu Q1, Wang Z1, Qiu Z. Application of tension-free hernioplasty with hernia meshes of different materials and the postoperative effects on the reproductive function of male rats. *Mol Med Rep*. 2014;9(5):1968-74.
- 51 Peiper C, Junge K, Klinge U, Strehlau E, Ottinger A, Schumpelick V. Is there a risk of infertility after inguinal mesh repair? Experimental studies in the pig and the rabbit. *Hernia*. 2006;10(1):7-12.
- 52 Uzzo RG, Lemack GE, Morrissey KP, Goldstein M. The effects of mesh bioprosthesis on the spermatic cord structures: a preliminary report in a canine model. *J Urol*. 1999;161(4):1344-9.

-
- 53 Kolbe T, Lechner W. Influence of hernioplastic implants on male fertility in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81(2):435-40.
- 54 Maciel LC, Glina S, Palma PC, Nascimento LF, Costa NF, Netto NR. Histopathological alterations of the vas deferens in rats exposed to polypropylene mesh. *BJU Int.* 2007;100(1):187-90.
- 55 Berndsen FH, Bjursten LM, Simanaitis M, Montgomery A. Does mesh implantation affect the spermatic cord structures after inguinal hernia surgery? An experimental study in rats. *Eur Surg Res.* 2004;36(5):318-22.
- 56 Taneli F, Aydede H, Vatansever S, Ulman C, Ari Z, Uyanik BS. The long-term effect of mesh bioprosthesis in inguinal hernia repair on testicular nitric oxide metabolism and apoptosis in rat testis. *Cell Biochem Funct.* 2005;23(3):213-20.
- 57 Junge K, Binnebösel M, Rosch R, Ottinger A, Stumpf M, Mühlenbruch G, Schumpelick V, Klinge U. Influence of mesh materials on the integrity of the vas deferens following Lichtenstein hernioplasty: an experimental model. *Hernia.* 2008;12(6):621-6.
- 58 Goldenberg A, Paula JF. Effects of the polypropylene mesh implanted through inguinoscopy in the spermatic funiculus, epididym and testis of dogs. *Acta Cir Bras.* 2005;20(6):461-7.
- 59 Damous SHB, Birolini C, Miranda JS, Montero EFS, Damous LL, Utiyama EM. Analysis of duct deferens and testis of rats submitted to bilateral inguinal hernioplasty. In: *Anais do American College of Surgeons Clinical Congress; 2017 22-26 outubro; San Diego, California; American College of Surgeons; 2017. 225:4S2.*
- 60 Fitzgibbons RJ, Salermo GM, Filipi CJ, Hunter WJ, Watson P. A laparoscopic intraperitoneal onlay mesh technique for the repair of an indirect inguinal hernia. *Ann Surg.* 1994;219(2):144-56.

-
- 61 Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
- 62 LeBlanc K. Hernias: Inguinal and Incisional. *Lancet*. 2003;362:1561-71.
- 63 Usher FC. Further observations on the use of marlex mesh: a new technique for the repair of inguinal hernias. *Am Surg*. 1959;25:792-5.
- 64 Rosch R, Junge K, Schachtrupp A, Klinge U, Klosterhalfen B, Schumpelick V. Mesh implants in hernia repair. Inflammatory cell response in a rat model. *Eur Surg Res*. 2003;35(3):161-6.
- 65 Wantz GE. Complications of inguinal hernial repair. *Surg Clin North Am*. 1984;64(2):287-98.
- 66 Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(1):49-51.
- 67 Biondo-Simões ML, Moura PA, Colla K, Tocchio AF, Morais CG, Miranda RA, Robes RR, Ioshii SO. Inflammatory reaction and tensile strength of the abdominal wall after an implant of polypropylene mesh and polypropylene/poliglecaprone mesh for abdominal wall defect treatment in rats. *Acta Cir Bras*. 2014;29 Suppl 1:45-51.
- 68 Klinge U, Klosterhalfen B, Müller M. Shrinking of polypropylene mesh in vivo: an experimental study in dogs. *Eur J Surg*. 1998;164:965-9.
- 69 Friedman DW, Boyd CD, Norton P, Greco RS, Boyarsky AH, Mackenzie JW, Deak SB. Increases in type III collagen gene expression and protein synthesis in patients with inguinal hernias. *Ann Surg*. 1993;218(6):754-60.

- 70 Junge K, Klinge U, Rosch R, Mertens PR, Kirch J, Klosterhalfen B, Lynen P, Schumpelick V. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses. *Langenbecks Arch Surg*. 2004;389(1):17-22.
- 71 Pereira-Lucena CG, Artigiani-Neto R, Lopes-Filho GJ, Frazao CVG, Goldenberg A, Matos D, Linhares MM. Experimental study comparing meshes made of polypropylene + polyglactin and polypropylene + titanium: inflammatory cytokines, histological changes and morphometric analysis of collagen. *Hernia*. 2010;14:299-304.
- 72 Pereira-Lucena CG, Artigiani Neto R, de Rezende DT, Lopes-Filho Gde J, Matos D, Linhares MM. Early and late postoperative inflammatory and collagen deposition responses in three different meshes: an experimental study in rats. *Hernia*. 2014;(4):563-70.