

**Priscila Murador**

**Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células de músculo liso para implante em uretra de coelhos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, Área de Reparação, Regeneração e Transplante de Órgãos e Tecidos da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP para obtenção do título de Doutor.

**Orientador:** Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto  
**Co-orientadores:** Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho  
Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Murador, Priscila.

Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células de músculo liso para implante em uretra de coelhos / Priscila Murador. – Botucatu : [s.n], 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Hamilto Akihisa Yamamoto

Coorientador: José Carlos Souza Trindade Filho

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 40101002

1. Engenharia de tecidos. 2. Medicina regenerativa - Estudos experimentais. 3. Uretra - Cirurgia. 4. Coelho como animal de laboratório. 5. Citometria de fluxo. 6. Células - Cultura e meios de cultura. 7. Aparelho geniturinário – Cirurgia.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos; Matriz acelular, Músculo liso; *Scaffold*; Uretra de coelho.



*Dedicatória*



## *Dedicatória*

---

Dedico este trabalho aos meus pais **Alfio e Antonia**, por todo carinho, respeito e educação que me proporcionaram, por todos os esforços desmedidos que fizeram para eu chegar até aqui, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas. Pelo ensinamento da simplicidade da vida, isso me fez ser quem hoje sou. Sou muito grata por tudo, amo vocês!

“Os filhos não precisam de pais gigantes, mas de seres humanos que falem a sua linguagem e sejam capazes de penetrar-se o coração”.

**Augusto Cury**

---

*Priscila Murador*



*Agradecimentos Especiais*



## *Agradecimentos Especiais*

---

Ao Prof. Dr. Hamilto Akihissa Yamamoto, orientador deste trabalho que me conheceu no meio do caminho e acreditou em mim dedicando seu tempo e atenção. Por todo empenho no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. José Carlos S. Trindade Filho idealizador e co-orientador deste trabalho, pelos ensinamentos e confiança em mim depositados. Adversidades acontecem, mas quando somos parceiros com um propósito em comum, isso não é barreira, apenas um degrau a ser subido.

A Profa. Dra. Elenice Deffune idealizadora e co-orientadora deste trabalho, são poucas as palavras para expressar minha gratidão, sempre com um abraço amigo para confortar, com palavras sábias para orientar outras mais duras para educar. Agradeço pela profissional que me fez ser.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes’.

Cora Coralina



*Agradecimientos*



## *Agradecimentos*

---

À Faculdade de Medicina de Botucatu e seus professores, por ter sido minha casa por tantos anos, onde me formei e recebi cuidados quando precisei. Aprendi muito nessa escola e sou extremamente grata por isso. Levarei sempre a FMB – UNESP em meu coração.

Ao Curso de Pós Graduação em Bases Gerias da Cirurgia, pela oportunidade para realização deste trabalho.

À Juliany Gomes Quitzan docente do Depto de Cirurgia e Anestesiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, por ter “passado a bola” para continuidade de seu trabalho com várias dicas e sugestões.

Ao técnico José Lucas de Carvalho do Depto de Urologia Experimental – FMB por toda atenção, pelo cuidado com os animais nas cirurgias, nos testes realizados, nas técnicas desenvolvidas, seu empenho foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos Carlos Roberto Gonçalves Lima, Ednelson Henrique Bianchi dos Laboratórios Experimentais da FMB pela dedicação e disponibilidade para coleta de bexigas e aortas.



## *Agradecimentos*

---

Ao técnico Carlos Edwalter Bardela do Laboratório Experimental de Cirurgia da FMB pela realização dos ensaios de tração nas aortas.

À Prof. Dra. Renné Laufer Amorim patologista e docente do Depto de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu e profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues patologista e docente do Depto de Patologia da FMB pela atenção prestada na avaliação das lâminas histológicas

Aos técnicos do Depto de Patologia da FMB, Claudiney Jurandir Figueira e Marcos Roberto Franchi pelas técnicas de imunocitoquímica.

Ao Prof. Dr. Sérgio Augusto Rodrigues do Depto de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Tiago Tardivo e Lígia Costa do Centro de Microscopia Eletrônica - IBB pelas imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Às secretárias do Depto de Urologia da FMB Gláucia e Andréia Chiamante sempre muito prestativas e atenciosas.

## *Agradecimentos*

---

Às secretárias da Pós Graduação do Programa de Bases Gerais da Cirurgia, Simone Corvino, Luana e Márcia Fonseca pelas diversas informações importantes, principalmente para o cumprimento de prazos.

À coordenadora da Seção de Pós-Graduação da FMB – UNESP, Janete Aparecida H. Nunes Silva e aos funcionários Regina Spadin, Nathanael P. Salles e Andrea Devede por serem tão atenciosos e por sempre resolver ou mostrar o melhor caminho para o cumprimento dos prazos.

À Adnice e Abílio pelo excelente serviço prestado na arte da capa, divisórias e encadernação, além da incrível atenção nesse momento de tanto nervosismo e ansiedade. Adnice sua criatividade é o máximo!

À toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular. O trabalho conjunto é que determina o sucesso. Muito obrigada: Ana Carolina Paisan, Ana Cláudia Simões, Andrei Moroz, Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, Daniel Bassetto Jesuíno, Fátima Regina Guimarães, Helga Caputo, Henrique de Souza Vieira, Isabele Rosa, Juliana Ravelli Baldassare Martins, Matheus Bertanha, Mariele Gobo de Oliveira, Ondina Silvia Cotrim, Rodrigo Almeida, Woner Mion. Meu muito obrigada pela parceria e amizade!

## *Agradecimentos*

---

À equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo: Márjorie, Léia e Mariana pelas análises realizadas.

À Profa. Dra. Amiga Rosana não tenho palavras para expressar minha gratidão. Rô você sabe o quanto te admiro como profissional e pessoa. Quero que saiba que minha estória profissional e pessoal tem influência sua. Sou eternamente grata por tudo.

À Márjorie Golim, amiga incasável de tantos anos, pelo profissionalismo, ensinamentos, palavras amigas, incentivos e comemorações mútuas.

À Michele Janegitz companheira e parceira, sempre a disposição para qualquer tema a ser discutido. Grande profissional que batalha em busca de seus ideais.

À Regina Avelina, alegria de todos os dias no laboratório, parceira ativa no desenvolvimento deste trabalho, amiga sempre preocupa com o próximo. Os dias não são mais os mesmos sem você e sua alegria. Muito obrigada pela grande ajuda nessa reta final.

## *Agradecimentos*

---

À Josy Vicentini amiga e companheira, dedicada ao trabalho e sempre disposta a ajudar. Obrigada pelo imenso apoio na finalização deste trabalho com a parte chata das revisões, referências e impressões.

À Thaiane Evaristo, sempre muito responsável, pelas ajudas no desenvolvimento deste trabalho. Pelos vários “galhos quebrados” e pela alegria diária.

A todos os funcionários do Hemocentro pela amizade, ensinamentos e convivência, aprendi muito com vocês todos esses dez anos.

À toda equipe da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde em especial ao Coordenador Guilherme Genovez, à Jussara Cargnin Ferreira, responsável pela Gestão de Pessoas, Márcia Teixeira Gurgel do Amaral, responsável pela Gestão Financeira e Assessoria Técnica e Helder Teixeira Melo, responsável pelas áreas de Assessoramento Técnico em Coagulopatias e Hemoterapia, por todo o incentivo e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Às colegas do Programa Nacional da Triagem Neonatal: Ana Clésia, Ana Stela, Paula, Renata e Tânia, pela convivência diária e pelo incentivo para o desenvolvimento deste trabalho.

## *Agradecimentos*

---

À Ana Carolina Pasturczak pela amizade e carinho.

Às colegas da Área de Assessoramento Técnico em Hemoterapia, Jacqueline Viana e Reyjane Teixeira, pela torcida diária para finalização deste trabalho e obtenção do título de Doutora.

Às minhas sobrinhas Larissa, Letícia e Victória, minhas meninas. Minhas inspirações para seguir em frente sempre retamente, procurando ser exemplo para os seus passos.

Às minhas irmãs Sandra e Lúcia, amigas, torcedoras e incentivadoras em minhas decisões.

À querida amiga Sheley Gambero, sempre presente em minha vida oferecendo sempre seu ombro amigo e com palavras sábias e de conforto.

À todas as demais pessoas que me ajudaram, direta ou indiretamente. Meu muito obrigada!

## *Agradecimentos*

---

Aos animais utilizados neste trabalho experimental, sem o qual não poderíamos realizar buscas em benefício da humanidade. A estes seres inocentes e dóceis, todo o meu respeito e eterno agradecimento.

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”.

Jean de La Bruyère



*Epigrafe*



## *Epígrafe*

---

Não deixe que eu me esvazie, que me sinta triste e sem coragem, Não deixe que eu pare diante de situações difíceis...Que eu me distancie dos meus sonhos! Deus...só o Senhor tem o poder de me iluminar, então, faça da minha vida uma claridade plena, faça que meu coração sinta a luz do amor, e que eu possa dar amor ao meu irmão sem medir esforços. Deus...Lhe peço ainda: Não me deixe parar nunca, e que minhas esperanças se renovem a cada dia! Obrigada por este dia Senhor obrigada por este ano de vida, obrigada por estar me dando esta oportunidade e de poder compartilhar com todos, Te agradeço, em nome do Seu Santo Filho, JESUS CRISTO!! Amém!!





*Nota Explicativa*



## *Nota Explicativa*

---

A forma de apresentação desta Tese de Doutorado segue uma nova orientação da Coordenação do Programa de Pós Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com o objetivo de facilitar sua publicação em revistas científicas. Está dividido em três artigos:

**Artigo 1:** Engenharia de tecidos em urologia – revisão de literatura.

**Artigo 2:** Estudo para desenvolvimento de neo-uretra construída por técnica de engenharia de tecidos. *Escrito de acordo com as normas da Revista Tissue Engineering part C.*

**Artigo 3:** Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células de músculo liso para implante em uretra de coelhos. *Escrito de acordo com as normas da Revista Acta Brasileira de Cirurgia.*

Tal proposta visa ao aprendizado do pós graduando em redação de artigos científicos e divulgação do conhecimento, contemplando, assim, os objetivos finais dos programas de pós-graduação.



## *Sumário*



## Sumário

---

### Artigo 1

Engenharia de tecidos em urologia - Revisão de Literatura	
Introdução.....	31
Biomateriais, <i>Scaffolds</i> e Arcabouços.....	33
Referências.....	39

### Artigo 2

Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	48
Animais.....	48
Preparo da Matriz Heteróloga Acelular.....	50
Ensaio de Tração.....	51
Obtenção das Bexigas.....	51
Isolamento das Células Musculares da Bexiga.....	53
Contagem Celular.....	54
Cultura Celular.....	54
Caracterização por Citometria de Fluxo (CF).....	55
Caracterização por Imunocitoquímica.....	55
Ensaio de Adesão e Marcação Celular ao <i>scaffold</i> -	
Imunofluorescência.....	56
Avaliação de Toxicidade Residual dos <i>scaffolds</i> .....	57
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	58
Análise Estatística.....	59
Resultados.....	59
Preparo da Matriz Heteróloga Acelular.....	59
Ensaio de Tração.....	59
Cultura Celular.....	60
Caracterização do Perfil Fenotípico das Células por	
Citometria de Fluxo.....	60
Caracterização Imunocitoquímica.....	61
Ensaio de Adesão e Marcação Celular ao <i>scaffold</i> -	
Imunofluorescência.....	61
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	62
Avaliação de Toxicidade Residual dos <i>Scaffolds</i> .....	62
Discussão.....	62
Conclusão.....	67
Referências.....	68

## *Sumário*

---

### **Artigo 3**

Resumo.....	84
Abstract.....	85
Introdução.....	86
Métodos.....	87
Uretrografia.....	90
Coleta de Urina para Cultura Microbiológica.....	90
Eutanásia e Retirada do Pênis.....	91
Análise Histológica.....	91
Parâmetros Estudados.....	92
Análise Estatística.....	92
Resultados.....	92
Microbiologia da Urina.....	93
Análise Macroscópica.....	93
Análise Histológica.....	93
Discussão.....	98
Conclusão.....	99
Referências.....	100
Conclusões Finais.....	102
 Anexos.....	 104



*Lista de Figuras*



## *Lista de Figuras*

---

### **Artigo 1**

<b>Figura 1.</b>	Distribuição crescente de publicações ao longo de 12 anos.....	36
------------------	--	----

### **Artigo 2**

<b>Figura 1.</b>	Em A, preparo da aorta <i>in natura</i> para teste. Em B, aorta sendo tracionada.....	76
<b>Figura 2.</b>	Etapas da dissociação enzimática: Em A e B, obtenção de tecido muscular liso. Em C, bexigas e fragmentos de tecido muscular. Em D, fragmentos em meio de cultura.....	76
<b>Figura 3.</b>	Aorta acelular após tratamento com SDS 0,1% ( <i>scaffold</i> ).....	77
<b>Figura 4.</b>	Matriz acelular, Colágeno e fibras elásticas são mantidas em sua estrutura e morfologia normais. Coloração em A HE 200X, Em B Calleja 100X.....	77
<b>Figura 5.</b>	Média e desvio padrão do coeficiente de rigidez nos grupo <i>In Natura</i> e Acelular.....	78
<b>Figura 6.</b>	Em A, células de músculo liso em início de adesão. Em B, células em confluência de 100%. Ambas em contraste de fase ph1 e aumento 50X.....	79
<b>Figura 7.</b>	Análise do perfil das células por citometria de fluxo. Em A, histograma do controle negativo. Em B, células de bexiga, em terceira passagem com CD90-FITC. Em C, controle positivo.....	79
<b>Figura 8.</b>	Em A, células – tronco mesenquimais não marcadas representam o controle negativo. Em B, células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Células marcadas com o anticorpo alpha-SMA. Aumento de 100x.....	80
<b>Figura 9.</b>	Em A, matriz acelular de aorta com poucas células, indicadas pelas setas, sem Puramatrix®. Em B, matriz acelular de aorta com células indicadas pelas setas, com Puramatrix®.....	80
<b>Figura 10.</b>	Microscopia eletrônica de varredura. Em A, visão panorâmica da matriz de aorta. Em B, C e D, células de músculo liso em sua superfície com Puramatrix®. ....	81
<b>Figura 11.</b>	DotPlot indicando em A, controle negativo com 99,38% das células viáveis em 1 (Anex -/IP-) indicado no quadro. Em B, células teste com AnexinaV /Iodeto de Propídeo, demonstrando viabilidade celular em 99,31% como demonstrado em 1 no quadro.....	82

## Lista de Figuras

---

### Artigo 3

<b>Figura 1.</b>	Em A, coelho anestesiado e posicionado para cirurgia. Em B, uretra cateterizada por sonda e incisão da pele e subcutâneo expondo uretra. Em C, incisão de 1cm na uretra. Em D, <i>scaffold onlay</i> sendo implantado por ponto contínuo nos dois lados. Em E, implante todo suturado. Em F, pontos nas extremidades com fio radiológico. Em G, fechamento da pele com fio <i>catgut</i> cromado 5,0. Em H, depois do tempo de evolução cicatrização da cirurgia. Em I, retirada do pênis em bloco.....	89
<b>Figura 2.</b>	Uretrografias. Em A e B, após duas semanas de implante, visualização do local de implante indicado pelo fio radiológico demonstrado pelas setas e em B sonda com contraste radiológico. Em C e D, evolução de duas e quatro semanas respectivamente demonstrando adequado calibre uretral indicado pelas setas.....	90
<b>Figura 3.</b>	Secção longitudinal dos pênis. Em A, visualização do implante da matriz- evolução de 2 semanas. Em B, grupo de evolução de quatro semanas, visualização do fio radiológico e implante pouco evidente. Em C, grupo controle sem implante.....	91
<b>Figura 4.</b>	Porcentagens de presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear.	94
<b>Figura 5.</b>	Em A, proliferação fibroblástica recente evidenciada pelos núcleos vesiculosos dos fibroblastos jovens indicados pelas setas. Coloração HE. Em B, presença de tecido conjuntivo denso corado em azul. Tricrômio de Masson.....	94
<b>Figura 6.</b>	Em A, Tecido de granulação em processo de cicatrização, moderado infiltrado inflamatório com presença de células gigantes indicado pelas setas. Coloração HE. Em B, tecido conjuntivo de reparo em azul. Coloração Tricrômio de Masson.....	95
<b>Figura 7.</b>	Porcentagens de presença de infiltrado mononuclear.....	95
<b>Figura 8.</b>	Em A, reação granulomatosa recente com histiócitos epitelióides ao redor dos fios de sutura indicados pelas setas (corte transversal). Em B, reação granulomatosa madura com células gigantes multinucleadas indicadas pelas setas. A e B, coloração HE.....	96
<b>Figura 9.</b>	Em A, integração entre os tecidos da matriz e do animal em vermelho e azul. Aumento 200X. Em B, área de necrose indicada pelos asteriscos e deposição de colágeno na extremidade da matriz em azul. Aumento 400X. Colorações Tricrômio de Masson.....	97
<b>Figura 10.</b>	Em A, integração dos tecidos indicado pela seta, presença de colágeno na extremidade em azul. Aumento 200X. Em B, tecido integrado entremeado por uma rede vascular delicada. Aumento 400X. Colorações Tricrômio de Masson.....	97





*Lista de Quadros*



## *Lista de Quadros*

---

### **Artigo 1**

<b>Quadro 1.</b>	Polímeros de ocorrência natural frequentemente utilizados.....	34
<b>Quadro 2.</b>	Principais publicações de 2010 a 2013: nome do artigo, autores, ano de publicação.....	37



## *Lista de Tabelas*



## *Lista de Tabelas*

---

### **Artigo 2**

<b>Tabela 1.</b>	Perfis de interpretação de apoptose e necrose por citometria de fluxo.....	78
------------------	--	----

### **Artigo 3**

<b>Tabela 1.</b>	Média $\pm$ desvio padrão do ganho de peso segundo os momentos.....	93
------------------	---	----



## *Lista de Abreviaturas*



## *Lista de Abreviaturas*

---

BHI – *Brain Heart Infusion*  
CF – Citometria de Fluxo  
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
CTM – Célula Tronco Mesenquimal  
DMEM – *Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium*  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid  
ET – Engenharia de Tecidos  
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína  
FMB – Faculdade de Medicina de Botucatu  
GC – Grupo Controle  
GI – Grupo Implante  
HE – Hematoxilina Eosina  
HEPES - *Hydroxyethyl Piperazineethanesulfonic Acid*  
IBB – Instituto de Biociências de Botucatu  
ICQ – Imunocitoquímica  
IP – Iodeto de Propídeo  
LED – *Light Emitting Diode*  
MAC – Matriz Acelular  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
PGA – Ácido Poliglicólico  
POP – Procedimento Operacional Padrão  
PVPI – Povidine Iodine  
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SFB – Soro Fetal Bovino  
TA – Tecido Adiposo  
TM – Tricrômio de Masson  
UNESP – Universidade Estadual Paulista



*Artigo 1*  
*Engenharia de Tecidos em Urologia -*  
*Revisão de Literatura*



---

## Introdução

A Reconstrução uretral continua a ser um grande desafio para urologistas. A reparação de defeitos complexos da uretra, muitas vezes requer enxertos livres de tecidos<sup>1</sup>.

Defeitos como hipospádias, deformidades causadas pela ausência de fusão das placas uretrais durante o desenvolvimento embrionário<sup>2</sup>, são frequentemente associados com várias intervenções clínicas e enxertia. Técnicas atuais de enxerto incluem a utilização de tecidos como a pele, mucosa bucal ou prepucial. Na maioria dos casos, os resultados iniciais são satisfatórios. Entretanto, a longo prazo, estudos mostram resultados insatisfatórios e complicações, como formações de fístulas, estenoses recorrentes, e pode ocorrer necrose em até 54% dos pacientes<sup>3,4</sup>. Além disso, a disponibilidade de tecido do doador que é apropriado para o enxerto pode ser um fator limitante. Esses problemas podem ser mitigados por técnicas de engenharia de tecidos para reconstrução uretral. No entanto, o desenvolvimento de um biomaterial ideal para reconstrução uretral continua a ser um desafio importante<sup>5</sup>.

Para tanto, a engenharia de tecidos, a qual utiliza os princípios de transplante tecidual, ciência de materiais e engenharia biomédica no desenvolvimento de substitutos biológicos que podem restaurar e manter a função normal de tecidos ou órgãos danificados ou perdidos apresenta-se pertinente. A engenharia de tecidos pode envolver a deposição de células funcionais em um local para estimular a regeneração do tecido injuriado. Além disso, pode envolver a utilização de matrizes, frequentemente denominadas de *scaffolds*, que estimulam a habilidade natural do corpo de se reparar, norteadando o crescimento do novo tecido<sup>6</sup>.

Vários materiais sintéticos são estudados atualmente para reparo ou substituição de áreas lesadas como tetrafluoroetileno (teflon) e silicone<sup>7</sup>, e em



---

urologia: ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA) e ácido polilático co-glicólico (PLGA)<sup>8</sup>. Esses materiais abriram um novo campo que incluiu uma ampla variedade de dispositivos que podem ser aplicados para uso humano. No entanto, embora esses materiais possam fazer uma substituição estrutural, o componente funcional do tecido original não foi plenamente alcançado. Por isso, novas técnicas para coleta, cultivo e expansão de células *in vitro*, foram e estão sendo desenvolvidas. Estudos da matriz extracelular e a sua interação com as células e fatores de crescimento, abriram caminho para um novo entendimento das células, ou seja, sua diferenciação e construção de tecidos. O conceito de transplante de células culminou com o primeiro transplante de medula óssea em 1970. Neste momento, os pesquisadores começaram a combinar os dispositivos e materiais com os conceitos da biologia celular, criando um novo campo denominado **engenharia de tecidos**. Como mais cientistas de diferentes áreas se reuniram com o mesmo objetivo de substituição de tecidos, o campo da engenharia tecidual tornou-se mais formalmente estabelecido. Nas últimas três décadas os campos de transplante de células e engenharia de tecidos também foram combinados com a biologia de células-tronco. Nestas áreas todos tinham um conceito unificador: a regeneração de tecidos vivos e órgãos. Assim, em 1999, William Haseltine, Fundador e Chefe Científico da *Human Genome Sciences*, cunhou o termo **medicina regenerativa**, que abrange essas áreas em um único campo de atuação<sup>9</sup>. Embora o transplante de órgãos continue a ser o principal tratamento para os pacientes com a função do órgão severamente comprometida, o número de pacientes que necessita de tratamento excede em muito a oferta de órgãos, e o déficit deve piorar com o envelhecimento mundial da população. No entanto, avanços recentes na medicina regenerativa sugerem que ela pode proporcionar novas alternativas para doadores de órgãos<sup>7</sup>.

Visto que no campo da urologia, no qual doenças complexas do trato urogenital, nem sempre podem ser tratadas de forma eficaz com medicamentos ou intervenções cirúrgicas, a engenharia de tecidos surge como uma alternativa à

---

prática clínica convencional. Assim, lesões, estreitamentos e malformações complexas por defeitos congênitos, traumas diversos, falhas de esfíncter, sequelas de cirurgias oncológicas entre outras causas, tem direcionado os urologistas para busca de processos inovadores em função da necessidade de reconstrução da uretra, ou mesmo substituição. As técnicas de reconstrução dependem do local do defeito, do tamanho e da preferência terapêutica do urologista<sup>10</sup>.

A engenharia de tecidos agrega o uso de ferramentas, como os biomateriais, quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada naturalmente, sendo viável para o restabelecimento das funções normais do paciente<sup>11</sup>.

#### **Biomateriais, *scaffolds*, arcabouços**

Os biomateriais são materiais utilizados para reparo ou substituição de tecido ou órgão danificado, com comprometimento de sua função. Podem ser classificados em quatro diferentes categorias: metais, cerâmicas, polímeros e matrizes. Para a decisão da escolha do material a ser utilizado, levam-se em consideração quesitos como: resistência, tamanho, forma, imunogenicidade, composição do material, superfície (lisa ou rugosa) e disponibilidade. Os *scaffolds* ou arcabouços são estruturas tridimensionais de polímeros naturais ou sintéticos, absorvíveis ou não. Entre eles destacam-se o ácido polilático, ácido poliglicólico, celulose bacteriana, por serem promotores de adesão e facilitadores de crescimento celular. Outros polímeros ainda podem ser encontrados como agarose e alginato<sup>11</sup> (Quadro 1).

	Polímeros	Fonte
PROTEÍNAS	Colágeno	ANIMAL
	Seda (fibroína)	
	Queratina	
	Fibrinogenio/Fibrina	
	Elastina	
POLISSACARÍDEOS	Celulose	Plantas, bactérias, fungos
	Amido	Plantas
	Quitina	Animal
	Alginato	Algas marrons
	Ágar	Alga vermelha

**Quadro 1.** Polímeros de ocorrência natural frequentemente utilizados<sup>11,12</sup>.

Os biomateriais são estruturas tridimensionais preparadas como verdadeiros suportes biológicos, obtidos de diferentes fontes de materiais e preparados a partir da matriz extracelular (ECM) dos tecidos de mamíferos após sofrerem processo de remoção das células – descclularização – com intuito de neutralizar a expressão de antígenos de histocompatibilidade de animais de outra espécie, sendo esses indutores da resposta conhecida como *Graft versus host disease*-GVHD. Além disso, podem ainda serem produzidos por purificação e gelificação de proteínas específicas como é o caso da fibrina. Esses *scaffolds* têm de respeitar alguns critérios importantes de qualidade: serem biocompatíveis, biodegradáveis, ter baixa ou nula citotoxicidade, ausência nefrotoxicidade ou tumorigênese. Além destas características, a literatura ainda aponta outros indicadores de qualidade para a estrutura tridimensional que receberá o implante de células, sendo posteriormente, o conjunto transplantado. O *scaffold* ainda pode ser transportador de substâncias sinalizadoras liberando-as *in vivo*, permitir adesão junto aos compartimentos do tecido nativo, apresentar integração entre fibras de colágeno do tecido de reparo e nativo, elasticidade e também deve criar um micro ambiente estável que favoreça o crescimento celular<sup>11</sup>.

Para a obtenção dos *scaffolds* a partir de tecido animal, diferentes técnicas de descclularização tem sido descritas utilizando métodos físicos, químicos e

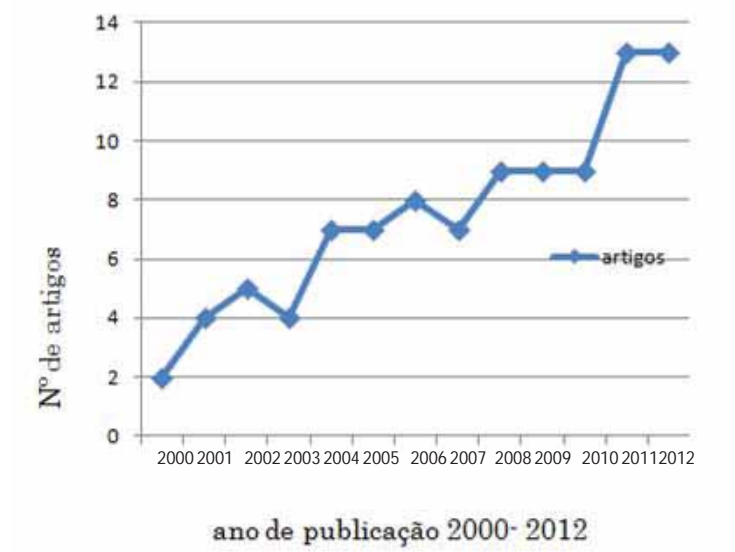
---

enzimáticos. Como método físico encontra-se a técnica de congelamento/descongelamento e mais recentemente a utilização de LEDs (*Light Emitting Diode*). Uma diversidade de produtos químicos é listada nos protocolos de descellularização química: detergentes como SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) e o Triton X-100, agentes alcalinos e ou ácidos. O método enzimático é amplamente divulgado, e o tipo de enzima juntamente com sua concentração depende do tecido que será tratado. As enzimas mais difundidas são a colagenase, a tripsina, a neuraminidase, dnase e rnase. O método enzimático é eficaz, porém apresenta um limitante: o custo<sup>13</sup>.

Diante disso, alternativas tangíveis vêm sendo propostas. Técnicas usando matrizes acelulares não-semeadas por células foram aplicadas experimentalmente numa forma bem sucedida no modo *onlay* em reparos da uretra. No entanto, quando matrizes tubulares foram usadas complicações surgiram, tais como contratura do enxerto e estreitamento do tubo<sup>14</sup>. Um ensaio clínico utilizando matrizes tubulares acelulares não semeadas de submucosa de intestino delgado, para reparação de estreitamento uretral, foi realizado em oito pacientes. Dois pacientes com estenose inflamatória mantiveram a obstrução uretral. Houve recorrência de estenose nos outros seis pacientes dentro de três meses da cirurgia<sup>15</sup>. Assim, matrizes não semeadas demonstraram serem capazes de substituir segmento uretral de até 0,5cm quando utilizados de maneira *onlay* por causa da curta distância requerida para crescimento interno de tecido<sup>16</sup>. No entanto, em caso de reparação tubular necessária, as matrizes devem ser semeadas com células autólogas, a fim de evitar o risco de estenose. Isto aponta para uma interligação das especialidades: urologia x medicina regenerativa x engenharia de tecidos = medicina personalizada<sup>17</sup>.

Numa análise detalhada de 134 publicações sobre engenharia de tecidos aplicável à uretra foi identificada especificidade em 108 deles. Os demais são artigos de revisão, ou focados na injeção de células-tronco para recuperação

esfincteriana. O gráfico abaixo representa a distribuição destes artigos ao longo dos últimos 12 anos, onde se observa uma tendência no aumento de publicações evidenciando o interesse da comunidade científica no tema (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição crescente de publicações ao longo de 12 anos.

No quadro a seguir, foram selecionadas as publicações de maior impacto, dos últimos três anos, listando seus autores e o ano de publicação (Quadro 2).

<b>Nome do artigo</b>	<b>Autores/Ano de publicação</b>
Urothelial cell culture: stratified urothelial sheet and three-dimensional growth of urothelial structure	Zhang Y, Atala A., 2013
Tissue engineering in urethral reconstruction-an update.	Mangera A, Chapple CR., 2013
Research progress of extracellular matrix material for tissue engineering	Yuan H, Pu C, Wei Q, Han P. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2012
Engineering complex tissues	Atala A, Kasper FK, Mikos AG, , 2012
In-vivo performance of high-density collagen gel tubes for urethral regeneration in a rabbit model	Micol LA, Arenas da Silva LF, Geutjes PJ, Oosterwijk E, Hubbell JA, Feitz WF, Frey P, 2012.
Application of tissue engineering technology and stem cells in urethral reconstruction	Wang Y, Fu Q. Zhonghua Nan Ke Xue, 2012.
Prepubertal follow-up after hypospadias repair with autologous in vitro cultured urothelial cells.	Fossum M, Skikuniene J, Orrego A, Nordenskjöld A, 2012
Comparative analysis of different surgical procedures for female stress urinary incontinence. Is stem cell implantation the future?	Surcel C, Savu C, Chibeleian C, Iordache A, Mirvald C, Sinescu I.,2012
A surface-modified biodegradable urethral scaffold seeded with urethral epithelial cells.	Fu WJ, Wang ZX, Li G, Zhang BH, Zhang L, Hu K, Hong BF, Wang XX, Cui FZ, Zhang X.,2011
Tissue engineering and stem cell application of urethroplasty: from bench to bedside	Fu Q, Cao YL., 2011
Tissue equivalent for the closure of extended urethral defects	Milanov NO, Adamian RT, Rogovaia OS, Vasil'ev AV, Zhidkov IL, Lipskii KB, Guliaev IV, Suvorov NA, Tagabiev DG, Kiselev IV, Terskikh VV.,2011
Cell-based tissue-engineered urethras	Yang B, Peng B, Zheng J.,2011
Reconstruction of three-dimensional neourethra using lingual keratinocytes and corporal smooth muscle cells seeded acellular corporal spongiosum.	Feng C, Xu YM, Fu Q, Zhu WD, Cui L., 2011
Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS): evolution of the grafting technique and results of 10-year experience.	Mantovani F, Tondelli E, Cozzi G, Abed El Rahman D, Spinelli MG, Oliva I, Finkelberg E, Talso M, Varisco D, Maggioni A, Rocco F., 2011
Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study.	Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A., 2011
The next step in urethral reconstruction	Sievert KD., 2011
Comparison of a poly-L-lactide-co-ε-caprolactone and human amniotic membrane for urothelium tissue engineering applications.	Sartoneva R, Haimi S, Miettinen S, Mannerström B, Haaparanta AM, Sándor GK, Kellomäki M, Suuronen R, Lahdes-Vasama T., 2011
Implantation of autologous bone-marrow-derived cells reconstructs functional urethral sphincters in rabbits.	Imamura T, Ishizuka O, Kinebuchi Y, Kurizaki Y, Nakayama T, Ishikawa M, Nishizawa O., 2011
Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra.	Selim M, Bullock AJ, Blackwood KA, Chapple CR, MacNeil S., 2011.
Morphological changes in paraurethral area after introduction of tissue engineering construct on the basis of adipose tissue stromal cells.	Makarov AV, Arutyunyan IV, Bol'shakova GB, Volkov AV, Gol'dshtein DV., 2009.
Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence.	Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, Yin Z, Ouyang HW, 2010.
Use of tissue engineering in treatment of the male genitourinary tract abnormalities.	Fu Q, Cao YL,2010.
Tissue-engineered transplants for the treatment of severe hypospadias.	Fossum M, Nordenskjöld A., 2010.

**Quadro 2.** Principais publicações de 2010 a 2013: nome do artigo, autores, ano de publicação.

A busca por um enxerto uretral desenvolvido por engenharia de tecidos foi impulsionada nos últimos anos devido à procura de material biológico substitutivo. Existem diferentes abordagens que variam de *scaffolds* com e sem células. O emprego desse enxerto depende das diferentes situações clínicas. Esses dados foram evidenciados nesse compilado.

---

**Referências Bibliográficas**

1. Feng C, Xu YM, Fu Q, Zhu WD, Cui L, Chen J. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Jul;94(1): 317-25.
2. Baran CN, Tiftikcioglu YO, Ozdemir R, Baran NK. What is new in the treatment of hypospadias? *Plast Reconstr Surg*. 2004 Sep;114(3):743-52.
3. Sorber M, Feitz WF, de Vries JD. Short- and mid-term outcome of different types of one-stage hypospadias corrections. *Eur Urol*. 1997;32(4):475-9.
4. Nuininga JE, DE Gier RP, Verschuren R, Feitz WF. Long-term outcome of different types of 1-stage hypospadias repair. *J Urol*. 2005 Oct;174(4 Pt 2):1544-8; discussion 1548.
5. Nuininga JE, Koens MJ, Tiemessen DM, Oosterwijk E, Daamen WF, Geutjes PJ, van Kuppevelt TH, Feitz WF. Urethral reconstruction of critical defects in rabbits using molecularly defined tubular type I collagen biomatrices: key issues in growth factor addition. *Tissue Eng Part A*. 2010 Nov;16(11):3319-28.
6. Atala A. Regenerative medicine and tissue engineering in urology. *Urol Clin North Am*. 2009 May;36(2):199-209.
7. Atala A. Regenerative medicine strategies. *J Pediatr Surg*. 2012 Jan;47(1):17-28.
8. Atala A. Tissue engineering of reproductive tissues and organs. *Fertil Steril*. 2012 Jul;98(1):21-9.
9. Haseltine W. A brave new medicine. A conversation with William Haseltine. Interview by Joe Flower. *Health Forum J*. 1999 Jul-Aug;42(4):28-30, 61-5.
10. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayghen E, Soker S, Atala A. Tissue-engineering autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet*. 2011 Apr;377(9772):1175-82.



- 
11. Shi D. Introduction to Biomaterials. 1<sup>a</sup> ed. Beijing: Tsinghua University Press; 2006. 253p.
  12. Huber A, Badylak SF. Biological Scaffolds for Regenerative Medicine. In: Atala A, Lanza R, Thomson JA, Nerem R, editors. Principles of Regenerative Medicine. 2<sup>a</sup> ed. London: Elsevier; 2011. 623-35.
  13. Evaristo, TC, Alves FC, Acorci-Valério MJ, Mion W, Moroz A, Felisbino S, Rossi-Ferreira R, Deffune E. Experimental Model of Neotrachea in Rabbits using Tissue Engineering Techniques. In: Fernandes PR, Bártolo PJ, Folgado J, Rodrigues HC, Ruben RB, Almeida H, Dias MR (Org.). Proceedings of II International Conference on Tissue Engineering. 1ed.Lisboa: IST Press, 2011;1: 257-64.
  14. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. J Urol. 2002 Oct;168(4):1789-92; discussion 1792-3.
  15. le Roux PJ. Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: a pilot study. J Urol. 2005 Jan;173(1):140-3.
  16. Dorin RP, Pohl HG, De Filippo RE, Yoo JJ, Atala, A. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? World J Urol. 2008 Aug;26(4):323-6.
  17. Kollhoff DM, Cheng EY, Sharma AK. Urologic applications of engineered tissue. Regen Med. 2011 Nov;6(6):757-65.



## *Artigo 2*

*Estudo para desenvolvimento de neo-uretra  
construída por técnica de engenharia de tecidos*

*Artigo escrito atendendo às normas da Revista Tissue Engineering, Part C*



**Resumo**

A engenharia de tecidos tem se mostrado promissora para o tratamento de lesões e doenças da uretra. No presente estudo, foi demonstrada a caracterização das células de músculo liso de bexiga de coelhos e seu implante em matrizes acelulares de aorta de suínos para reparo de lesão na uretra de coelhos. Aortas de dez suínos foram obtidas, descelularizadas e colocadas em cultura com células de músculo liso provenientes de bexiga de dez coelhos, para servirem como modelo no reparo de tecido uretral. As aortas foram descelularizadas com *sodium dodecyl sulfate* (SDS) a 0,1% e tiveram seu coeficiente de rigidez testado, cujos resultados demonstraram a mesma resistência antes e depois do processo. As células de músculo liso cultivadas foram caracterizadas por citometria de fluxo com o anticorpo anti-CD90 e por imunocitoquímica usando o anticorpo *Anti-Alpha Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ -SMA). Com os resultados da citometria de fluxo excluiu-se a possibilidade da presença de células-tronco mesenquimais ou fibroblastos junto à cultura de células de músculo liso, enquanto que com a imunocitoquímica comprovou-se o perfil das células de músculo liso. A viabilidade das células foi mantida em 99,31% quando em contato com a matriz, demonstrando que o modelo proposto é um excelente biomaterial para uso como *scaffold* de células. Seu uso na reconstrução de uretra com lesões complexas pode ser considerado com otimismo, podendo resolver problemas relacionados à quantidade insuficiente de tecido na região.

**Abstract**

Tissue engineering has shown promise for treatment in urethras injuries and diseases. In the present study, we demonstrated the rabbits smooth muscle cells of the bladder characterization and their implantation in an acellular porcine aorta for repairing injuries in rabbits urethras. Ten porcine abdominal aortas were obtained and placed in culture with rabbit bladders smooth muscle cells from ten animals to serve as a template for the repair of urethral tissue. The aortas were decellularized with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and had a coefficient of stiffness test, whose results showed the same resistance before and after the process. The smooth muscle cultured cells were characterized by flow cytometry with anti-CD90 antibody and by immunocytochemistry using Anti-Alpha Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) antibody. The results of flow cytometry excluded the possibility of the presence of mesenchymal stem cells or fibroblasts by the smooth muscle cells culture, whereas immunocytochemistry confirmed the profile of smooth muscle cells. When in contact with the matrix, cell viability was maintained at 99.31%, demonstrating that the proposed model is an excellent biomaterial for use as cell scaffold. Its use in urethral complex lesions reconstruction can be seen with optimism and solve problems related to insufficient quantities of urinary tissue.

## Introdução

O tratamento de doenças congênitas ou adquiridas na uretra masculina é um sério problema social e de saúde. Nos casos de estenose e alto grau de deformidade uretral há necessidade de correção cirúrgica e quando não se dispõe de tecidos adjacentes adequados e em quantidade suficiente para a reconstrução uretral, há necessidade de utilização de pele da região extragenital, que não contenha pelos ou de outro tecido como substituto<sup>1,2</sup>. A escassez de materiais biológicos para reconstrução urogenital implica na busca contínua de tecidos de outras partes do corpo para a substituição da lesão. O uso combinado de diferentes tecidos para enxerto é raro, particularmente em pacientes com complicações e deformações após correção cirúrgica para a hipospádia<sup>3</sup>. Os enxertos de pele extragenital, de espessura total ou parcial, apresentam resultados insatisfatórios devido à retração significativa, à formação de estenoses e o aparecimento de fístulas<sup>4,5</sup>.

Várias estratégias têm sido propostas ao longo dos anos para a regeneração do tecido uretral. Malhas de fios de ácido poliglicólico (PGA) sem células<sup>6,7</sup> ou com células foram usadas para reparar uretras em vários modelos animais. Derivados naturais de materiais à base de colágeno, tais como submucosa vesical acelular<sup>8</sup>, e submucosa uretral acelular<sup>9</sup> também têm sido testados experimentalmente em diferentes modelos animais para reconstrução uretral. A matriz de submucosa vesical<sup>8</sup> provou ser um enxerto adequado para reparo de defeitos uretrais em coelhos demonstrando um revestimento normal de urotélio luminal e feixes musculares organizados. Estes resultados foram

## Artigo 2

---

confirmados clinicamente em uma série de pacientes com história de hipospádia que foi corrigida usando matriz vesical acelular de colágeno humano<sup>10</sup>.

Quando há necessidade de reparo de longos segmentos da uretra, a uretroplastia com materiais adequados são necessários. Atualmente, tecidos autólogos, incluindo retalhos de pele genital e extragenital, bexiga e mucosa bucal são comumente usados. No entanto, resultados a longo prazo não são satisfatórios devido à agressão, cicatriz e morbidades do local de coleta do doador<sup>11-13</sup>, além disso, prolonga o tempo cirúrgico e anestésico e pode não estar disponíveis em alguns pacientes. A engenharia de tecidos tem proporcionado uma nova abordagem para a reconstrução da uretra uma vez que combina processos físicos, químicos, biológicos e novas estruturas tridimensionais com ou sem células que servem como suporte ou substituto do tecido lesado.

Os *scaffolds* biológicos ou sintéticos para hospedarem células cultivadas *ex vivo*, são os elementos fundamentais da engenharia de tecidos (ET). Na ET uretral, as matrizes acelulares (MAC) são comumente usadas como *scaffolds*, devido à estrutura mecânica e propriedades biológicas. No entanto, pesquisas demonstraram que somente MAC não são adequadas para substituição de segmentos muito longos da uretra devido à alta taxa de estenose e formação de fibrose<sup>14,15</sup>. Para evitar este fato, faz-se necessária a presença de células semeadas ao longo das MAC. Em estudos anteriores, células uroteliais<sup>16</sup>, células epidérmicas<sup>17</sup> e até mesmo queratinócitos orais<sup>18</sup> foram usadas como

## Artigo 2

---

células semeadas em MAC para substituição uretral. No entanto, a cultura *in vitro* dessas células apresenta uma taxa de sucesso relativamente baixa<sup>19</sup>.

Silva<sup>20</sup> afirma que o uso de membrana de quitosana a 2% demonstrou ser um bom modelo de *scaffold* para cultivo de células de músculo liso de bexiga de coelho quando implanta em sua superfície, apresentando viabilidade celular acima de 90%.

Estudos mais recentes demonstram sucesso no uso da submucosa de intestino de suínos. Fiala *et al.*<sup>21</sup> afirmam que *submucosa of small intestine* (SIS) parece ser benéfico para pacientes com estenose bulbar e bulbo peniana, seus resultados são comparáveis aos enxertos de pele e enxertos da mucosa. Outro autor relata que o uso de SIS em humanos pode ser considerado como uma alternativa para os procedimentos de enxerto mais difíceis<sup>22</sup>. Kawano *et al.*<sup>23</sup> alertam que SIS utilizado em quatro camadas é mais vantajoso do que SIS com apenas uma camada e o uso da mucosa bucal para a substituição da uretra em coelhos. Segundo Ahmad *et al.*<sup>24</sup>, o uso de mucosa oral, aparentemente apresenta menor morbidade e a uretroplastia produz resultados animadores na estenose da uretra bulbar, no entanto, necessita de acompanhamento a longo prazo, afirma. Mesmo assim a mucosa bucal ainda apresenta o inconveniente da cirurgia em região oral. Frente a isto, e com o objetivo de minimizar as morbidades, diferentes estudos testam uma diversidade de materiais<sup>8,25</sup>.

Goissis *et al.*<sup>26</sup> desenvolveram uma matriz acelular de aorta com objetivo de minimizar as morbidades e ter a vantagem de ser acelular. Esta

## Artigo 2

---

matriz foi validada por Trindade Filho *et al.*<sup>4</sup> em uretra de coelho na forma de enxerto e quando comparada com a mucosa bucal não apresentou diferenças significativas entre os mesmos após 30 dias.

Quitzan<sup>27</sup> demonstrou sucesso no uso de matriz acelular tubular heteróloga de aorta suína quando implantada em uretra de coelhos, observando boa integração da matriz, com intensa epitelização e vascularização.

Diante do exposto e da concepção de que o tratamento uretral (uretroplastia) é muitas vezes crítico e complexo, o sucesso do procedimento torna-se um grande desafio para os urologistas. Assim prova-se a relevância da ET que permite a combinação de células autólogas com biomateriais apropriados e podem fornecer, no futuro, soluções funcionais e bem-sucedidas para sérios distúrbios clínicos, podendo trazer novas esperanças para reconstrução da uretra. Dessa forma, no presente estudo propõe-se a análise de aorta suína como matriz heteróloga acelular com células semeadas de músculo liso de bexiga, para implante em uretra de coelhos. As análises vão desde sua obtenção, processamento para torná-la acelular, ensaio de tração, obtenção das células de músculo liso de bexiga de coelhos, expansão *in vitro*, caracterização e semeadura destas na matriz acelular.

Optou-se por utilizar células cultivadas, na terceira passagem, levando-se em consideração os seguintes pontos. A cultura celular funciona como um método de purificação da célula de interesse, tendo em vista que o processo de digestão enzimática promove a obtenção indiscriminada de células da camada



muscular, do epitélio, e também, células sanguíneas contaminantes. À medida que ocorre o plaqueamento, nos primeiros dias ocorre a adesão de células de perfis fenotípicos heterogêneos entre eles: macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células-tronco mesenquimais (CTM), células epidérmicas e as células de músculo liso de interesse. As primeiras serão eliminadas por um processo natural de meia vida curta e incapacidade de proliferação em cultura de longo termo. A CTM terá a sua multiplicação controlada por não estar em meio condicionado, o mesmo ocorre com as células epidérmicas que exigem hormônios de crescimento específicos não adicionados no meio de cultura preparado para este estudo<sup>28</sup>. Sabe-se que entre a terceira e sexta passagem obtém-se a purificação do perfil de células desejadas sem comprometimento importante do DNA celular<sup>28,29</sup>.

Os processos de tripsinização para promover as passagens induzem a um encurtamento dos telômeros e dano definitivo do DNA comprovado por testes como micronúcleo e cometa<sup>30</sup>. Este dano do DNA pode ser indutor de neoplasias. Entretanto, houve necessidade da amplificação até a terceira passagem para obtenção do número necessário de células para o experimento.

## **Material e Métodos**

### *Animais*

Foram utilizados coelhos machos da raça Grupo Genético Botucatu, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus Botucatu. Sendo que os animais utilizados apresentavam peso entre 2,5 – 4,0 Kg. A utilização desses

## Artigo 2

---

animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, previamente estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), como consta no protocolo nº 699/2008 (Anexo).

Os animais foram mantidos no Biotério da Cirurgia Experimental em gaiolas individuais com dimensões de 55 x 55 x 55cm e suspensas a 80cm do chão. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 20°C e com ciclos de luz variando entre 12-14h. Eles receberam ração para coelhos (Nutricoechos, Purina Nutrimentos Ltda.) água *ad libitum* durante todo o tempo do estudo, e foram mantidos sob os cuidados de técnicos especializados.

Os animais utilizados para a etapa de retirada das bexigas foram coelhos da mesma raça, provenientes de outros experimentos de alunos da pós-graduação, com eutanásia previamente agendada e sem complicações que pudessem interferir nesse estudo. Desta forma, nenhum animal precisou ser sacrificado exclusivamente para a pesquisa. A obtenção das bexigas foi realizada no mesmo tempo anestésico com intuito de minimizar o estresse cirúrgico dos animais. Anestesia utilizada foi cloridrato de ketamina 35-50mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 5-10mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrados via intramuscular.

Para obtenção das aortas foram utilizados dez suínos da raça Large-White obtidos da Faculdade de Agronomia de Botucatu – UNESP, pesando entre 12-15 Kg. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

## Artigo 2

---

Assim como os coelhos, os animais utilizados para retirada das aortas abdominais foram suínos provenientes de experimentos de alunos da pós-graduação, cujos procedimentos não interferissem na presente pesquisa, a fim de evitar a eutanásia desnecessária de outros animais. Os animais foram anestesiados para posterior retirada do segmento abdominal da aorta com cloridrato de ketamina 22mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) + cloridrato de xilazina 2mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrados via intramuscular. Quando foi necessária uma dose extra de anestésico durante a cirurgia, repetiu-se a metade da dose inicial utilizada.

Após o procedimento anestésico foi realizada a anti-sepsia com PVPI a 10% e colocado campos estéreis. Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico estéril iniciado com incisão mediana xifopúbica, seguida da dissecação e isolamento da aorta entre os segmentos supra-renal e ilíaco. Após retirada desse segmento de estudo, realizou-se a eutanásia dos animais com pentobarbital sódico 70-100mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) administrado via intravenosa.

### *Preparo da Matriz Heteróloga Acelular*

Uma vez retirados os segmentos de aorta, estes foram lavados com solução salina estéril a 0,9% e submetidos à dissecação microscópica para retirada da maior quantidade de tecido conjuntivo da parede externa. Em seguida, parte desses segmentos (*in natura*) foi mantida em PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) acrescido de 10% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e antimicótico (anfotericina B) - Gibco® Invitrogen, até que o teste de tração fosse

realizado. Outra parte dos segmentos foi submersa em solução contendo SDS (sodium dodecyl sulfate) a 0,1% sob agitação, por um período de 15 horas, sendo posteriormente lavada cinco vezes, sob agitação, durante 10 minutos, em PBS acrescido de 10% de antibiótico e antimicótico (Gibco®Invitrogen).

### *Ensaio de Tração*

O ensaio de tração foi realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UNESP – campus de Botucatu, e teve por objetivo comparar a resistência entre aortas *in natura* e após processamento de descélularização. O equipamento utilizado foi Máquina Universal de Ensaio Mecânico EMIC®, modelo DL 10.000, com precisão de  $\pm (0,018 + F/3700)$ kN, apurada dentro das especificações das normas ABNT NBR NM ISO 7500-1:2004 e ABNT NBR 6674:1999. O equipamento trabalha em conjunto com um microcomputador, em ambiente *Windows*™ 2000, utilizando o programa Mtest® (DDL, Minnesota – USA) para o controle gráfico e aferição dos resultados (Fig. 1).

Foram usados segmentos de aorta abdominal suína *in natura* (n=6) e segmentos após processo para torná-las acelulares (n=6). Cada segmento media entre 10-12cm.

### *Obtenção das Bexigas*

A retirada da bexiga dos animais teve por objetivo a expansão das células de músculo liso desse órgão. Para tanto, os animais receberam como medicação pré-anestésica acepromazina 1mg/kg (Syntec, SP, Brasil) e citrato de fentanila

## Artigo 2

---

3 $\mu$ L/kg (Baxter, USA), via subcutânea. Em seguida foram colocados em decúbito dorsal em goteira de Claude-Bernard com os quatro membros imobilizados com fios de algodão. Foi realizada tricotomia da região abdominal anti-sepsia PVPI a 10% e colocação de campo oftálmico estéril para delimitar a região cirúrgica. A indução anestésica foi feita com cloridrato de ketamina 35-50mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 5-10mg/Kg (Syntec®, SP, Brasil), via intramuscular.

A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal por meio de laparotomia mediana 3,5 cm de extensão, que se iniciou a 2,0cm do púbis. A incisão da parede abdominal foi realizada com bisturi frio e lâmina nº15 (Embramac®) na linha média, abrindo-se, a seguir, o peritônio. O afastamento das bordas cirúrgicas permitiu a localização da bexiga, que, após a liberação romba de tecido adiposo (TA) aderido em sua porção lateral e medial, foi exteriorizada pela incisão. Em seguida realizou-se a cistectomia total e a eutanásia do animal com injeção de pentobartibal sódico 70-100mg/Kg (Syntec®, SP, Brasil).

A bexiga foi lavada com solução fisiológica estéril 0,9% para retirada do excesso de urina e sangue, colocada em recipiente estéril contendo meio de cultura HEPES (Sigma®). Todo o procedimento cirúrgico e a manipulação vesical foram realizados de forma estéril.

---

*Isolamento das Células Musculares da Bexiga*

O processamento do órgão ocorreu de acordo com as normas padronizadas nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu.

As bexigas foram lavadas três vezes em meio HEPES (Sigma®) contendo 100µL de antibiótico e antimicótico (Gibco®, Invitrogen) para cada 10mL de meio.

- Dissociação Enzimática

Foi utilizada enzima Colagenase tipo II (Gibco®, Invitrogen), responsável pelo debridamento químico decompondo as fibras de colágeno que sustentam o tecido, deixando as células livres.

Com o auxílio de pinça e tesoura estéreis foi realizada a retirada de pequenos fragmentos da camada superficial da bexiga. O material foi pesado e colocado em solução de meio HEPES + Colagenase II (Gibco®, Invitrogen) em tubo Falcon BD® (Fig. 2). A proporção usada entre peso do tecido/meio/enzima foi 1: 2: 4, respectivamente em gramas (g), mililitros (mL) e miligramas (mg). Após a adição do tecido à solução contendo a enzima, todo o conteúdo foi mantido em estufa a 37°C com atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, por 15 horas.

Decorridas 15 horas de atuação enzimática, essa foi desativada com meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino–SFB (Gibco®, Invitrogen). O material contendo SFB foi centrifugado a 1200rpm por 10 minutos para

## Artigo 2

---

neutralização da enzima. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* homogeneizado em 1mL de meio de cultura com retirada de alíquota de 30µL para contagem e viabilidade celular em câmara de Neubauer.

### *Contagem Celular*

A contagem e viabilidade das células foram realizadas em câmara de Neubauer e, em seguida, foram semeadas em frascos de 25 ou 75cm<sup>2</sup> de superfície para células aderentes (Nunc®). O meio de cultura utilizado foi DMEM F12, suplementado com aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, antibiótico (penicilina e estreptomicina), antimicótico (anfotericina B) e SFB todos obtidos da Gibco® Invitrogen.

### *Cultura Celular*

As células permaneceram em estufa a 37°C, sob atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (ThermoClass 100®) com trocas de meio a cada 48h. No monitoramento por microscopia invertida (microscópio Axiovert 200, Zeiss™), ao apresentar confluência de 80 a 100%, as células foram destacadas dos frascos de cultura com 0,25% da enzima tripsina/1mm de EDTA (Gibco®,Invitrogen). Após tripsinização foi realizada contagem em câmara de Neubauer e viabilidade celular. As células foram semeadas novamente em frascos de 75cm<sup>2</sup> (Nunc®). Esse conjunto de procedimentos é denominado passagem celular. Após a terceira passagem as células foram criopreservadas em solução de Dimetilsulfóxido – DMSO (LGC Biotecnologia Ltda.) e 10% SFB, e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C.

### *Caracterização por Citometria de Fluxo (CF)*

Citometria de Fluxo consiste na técnica que avalia as características físico-químicas das células, individualmente, as quais são submetidas à passagem por um sistema fluido, sendo detectadas por sensores eletrônicos e ópticos. A caracterização das células foi realizada após a terceira passagem em cultura, incubando-se as mesmas com o anticorpo Anti-CD90 (anti-rat cross reacting with rabbit - Biolegend®). A análise do citômetro faz uso de software específico, CellQuest Pro®BD. A ausência no mercado de anticorpos específicos para o reconhecimento dos antígenos existentes nas células de coelhos demandou a utilização de tal anticorpo. No entanto, na bula indica reação cruzada com células de coelho.

### *Caracterização por Imunocitoquímica (ICQ)*

Etapa realizada no Departamento de Patologia da FMB. A imunocitoquímica (ICQ) foi realizada em células após terceira passagem em cultura. O protocolo utilizado para realização da técnica de ICQ envolveu a recuperação antigênica com solução *Trilogy (Cell Marque 920P)* pelo método de calor em banho-maria por 20 minutos. Após este procedimento foi feita incubação com o anticorpo primário *Alpha-Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)* (Sigma®) por 18 horas em geladeira à 4°C para confirmação do fenótipo de célula músculo liso. Posteriormente, nova incubação com anticorpo secundário (*Anti-Mouse*) e terciário (Amplificador). Utilizou-se kit de detecção por polímeros Hodef (*Cell Marque 954D*) por 10 minutos cada um, e posterior



revelação com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (*Spring* BGDAB-999). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina. Células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo de coelhos foram utilizadas como controle negativo.

### *Ensaio de Adesão e Marcação Celular ao Scaffold – Imunofluorescência*

A proposta de adesão foi feita utilizando duas técnicas, uma contendo um artifício promotor da adesão e a outra sem nenhum artifício, a título de comparação. O artifício promotor da adesão usado foi Puramatrix Peptide Hydrogel BD®, uma matriz sintética comercializada a qual, gelificada, tem a finalidade de criar microambientes tridimensionais definidos para uma variedade de experimentos com culturas celulares de diferentes linhagens. O protocolo utilizado, descrito por Bertanha<sup>32</sup>, foi modificado e adaptado ao presente estudo.

Utilizou-se uma amostra de células sendo procedida a contagem das células viáveis com uso de *Tripan Blue Stain* (Gibco®) em câmara de Neubauer, seguido de centrifugação a 1200rpm por 10 minutos para remoção do meio DMEM F12 e obtenção do *pellet*. As células foram marcadas com o marcador fluorescente *Qtracker® Cell Labeling Kits* - Invitrogen conforme instruções do fabricante.

- Ensaio sem artifício promotor da adesão

As células obtidas após marcação fluorescente foram depositadas gentilmente sobre o *scaffold* e deixadas em estufa por duas horas.

## Artigo 2

---

- Ensaio com artifício promotor da adesão

Após preparo das células com o marcador fluorescente, foi realizado o protocolo Puramatrix® conforme especificações do fabricante (BD Puramatrix® Peptide Hydrogel). A solução obtida foi colocada delicadamente sobre o *scaffold* e mantida em estufa por duas horas.

Em ambos os experimentos, após incubação de duas horas adicionou-se o meio de cultura às placas. A seguir, as mesmas foram mantidas por 72 horas em estufa para a efetivação do processo de adesão celular. Após o tempo previsto, os *scaffolds* contendo células de músculo liso marcadas, complementadas ou não com Puramatrix® foram transportados *in natura* para o Departamento de Patologia da FMB para a realização da técnica de congelamento seguida de cortes histológicos e análise da imunofluorescência em microscópio de fluorescência Olympus BX41 acoplado a câmera digital Olympus Camedia C-7070.

### *Avaliação de Toxicidade Residual dos Scaffolds*

- Teste de Anexina-V/Iodeto de Propídio

O teste de toxicidade residual da aorta acelular foi realizado para avaliar a possível indução de apoptose das células de músculo liso pelo *scaffold* de aorta acelular, devido à utilização do SDS para descelularização.

Utilizou-se o protocolo proposto por Bertanha<sup>32</sup> com modificações e o kit *BD Pharmingen™ FITC Annexin- V Apoptosis Detection* para CF.

Foram utilizadas células de músculo liso de bexiga previamente expandidas em cultura, seguido de contagem e viabilidade celular. Do total de

células obtidas, foram aplicadas  $1 \times 10^6$  células em cada poço da placa de cultura de 24 cavidades (não aderente Nunc®) conforme a seguir.

Para o teste de toxicidade, seis fragmentos de aortas acelulares foram colocados nos poços de cultura e as células aplicadas sobre os mesmos, enquanto que para o grupo controle, foram utilizados três poços da placa de cultura nos quais foram aplicadas somente as células de músculo liso (sem aorta).

As placas de cultura foram mantidas em estufa por 48 horas a 37°C a fim de garantir contato e adesão celular ao *scaffold*. Após esse tempo, as células foram retiradas dos *scaffolds* por dissociação mecânica com auxílio de *Cell Scrapper* (Nunc®) e por tratamento com tripsina nos poços do grupo controle. Imediatamente após a recuperação das células, foi realizada a marcação com Anexina-V/IP por CF, seguindo-se o protocolo do fabricante. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento FACSCalibur BD® e a reação analisada pelo software CellQuest™ BD, levando-se em consideração padrão anteriormente estabelecido no laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro por Guilherme *et al.*<sup>33</sup> (Tabela 1).

### *Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV*

Esta análise foi realizada em parceria com o Laboratório de Microscopia Eletrônica do IBB – UNESP de Botucatu.

Para análise ultraestrutural da superfície da matriz de aorta com células de músculo liso semeadas, o material foi pré fixado com glutaraldeído a 2,5%

em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3 durante 4 horas a 4°C. A preparação foi lavada três vezes com água destilada e, em seguida, fixada com 0,5% de tetróxido de ósmio durante 30-40min. A amostra foi desidratada em concentrações crescentes de etanol e seca em aparelho de ponto crítico. A matriz de aorta processada foi montada em superfície metálica e metalizada com ouro, e em seguida, feita a observação em microscópio eletrônico de varredura, Quanta 200, FEI, Company®.

### *Análise Estatística*

A análise estatística utilizada para o ensaio de tração foi o teste T para comparação dos grupos independentes, considerando variâncias homogêneas.

## **Resultados**

### *Preparo da Matriz Heteróloga Acelular*

Após obtenção das aortas abdominais dos suínos, estas foram processadas em Laboratório para se tornarem acelulares (Fig. 3). A ausência de elementos celulares foi confirmada pela análise histológica e as matrizes acelulares foram armazenadas em álcool 70° até o uso (Fig. 4).

### *Ensaio de Tração*

Em testes preliminares verificou-se a homocedasticidade das variâncias (variâncias iguais – valor-p=0,635) e dados com distribuição aproximadamente normal (valor-p=0,821).

A diferença entre as médias dos dois grupos não é grande suficiente para rejeitar a hipótese de que as diferenças são devido à aleatoriedade dos dados. Portanto, não existe diferença significativa entre os dois grupos (p-valor = 0,276) (Fig. 5).

### *Cultura Celular*

Após digestão enzimática para obtenção das células de músculo liso, as mesmas foram semeadas em frascos de cultura de 25cm<sup>2</sup> e começaram a aderir após três dias de cultivo. O meio de cultura foi trocado a cada 48h. Quando as células apresentaram confluência de 80 – 100% (Fig. 6) foram submetidas ao tratamento com tripsina-EDTA (LGC Biotecnologia Ltda), contadas e feita determinação de viabilidade. Em todos os momentos, as células apresentaram viabilidade acima de 80%, o que permitiu o re-plaqueamento em novos frascos de cultura (passagem celular).

### *Caracterização do Perfil Fenotípico das Células por Citometria de Fluxo*

A análise dos histogramas evidenciou três situações demonstradas na Fig. 7: em **A**, controle negativo correspondendo às células cultivadas, oriundas da bexiga, na terceira passagem, sem a colocação do anticorpo marcado com fluorocromo. Em **B**, desempenho das mesmas células em presença do anti-CD90-FITC. Em **C**, CTM obtidas de tecido adiposo de coelho, na terceira passagem como controle positivo. Foi padronizada a aquisição de 20.000 eventos por amostra para avaliação do percentual de expressão da positividade. No controle negativo (**A**) o percentual de positividade foi de 0,01%. No histograma **B**, o desempenho foi similar ao controle negativo

apresentando somente 1,61% de expressão para o marcador CD90-FITC, resultado este considerado negativo. O controle positivo (C) foi realizado com o mesmo anticorpo CD90-FITC, na presença de CTM de tecido adiposo, o qual expressou positividade de 95,81% conforme esperado.

### *Caracterização por Imunocitoquímica*

A imunocitoquímica (ICQ) foi realizada com células após terceira passagem em cultura, considerando-se o resultado da CF onde as mesmas não expressavam, na maioria, marcador de CTM. Neste caso, utilizou-se cultura de CTM-TA, na terceira passagem como controle negativo da reação imunohistoquímica com o marcador específico de músculo, anticorpo  $\alpha$ -SMA. Na Fig. 8 em **A** observa-se a reação de coloração clara identificando as células negativas. Em **B**, coloração marrom forte, confirmando o padrão imunocitoquímico de músculo liso.

### *Ensaio de Adesão e Marcação Celular ao Scaffold – Imunofluorescência*

Biomateriais se fundamentam nas interações entre tecidos vivos e materiais sintéticos visando a biofixação, bioreconhecimento e biocolonização. A utilização de um artifício promotor da adesão demonstrou quantitativa e visualmente, o contato celular com o biomaterial, por mecanismos artificiais. No entanto, justamente devido à constatação da “adesão provocada” ao *scaffold* (Fig. 9 B) foi possível estabelecer uma comparação visual perante os dois casos, evidenciando a adesão celular ao *scaffold* sem nenhum artifício promotor de adesão, mesmo que em menor quantidade (Fig. 9 A), mas ainda sim

corroborando os achados da literatura, viabilizando o uso da membrana com essa finalidade. Observou-se marcação do citoplasma das células em análise microscópica de aumento 200X (Fig. 9).

### *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura confirmaram a presença de células aderidas ao *scaffold* de matriz de aorta celular (Fig. 10).

### *Avaliação de Toxicidade Residual dos Scaffolds*

- Teste de Anexina-V/Iodeto de Propídio

A avaliação da citotoxicidade induzida pela exposição das células cultivadas à matriz acelular de aorta suína foi medida pelo kit *BD Pharmingen™ FITC Annexin-V Apoptosis Detection* que permite determinar apoptose e necrose celular. Os resultados indicam a preservação da viabilidade celular nas amostras avaliadas, visto pela ausência de marcação com a Anexina-V e Iodeto de Propídeo. Deste modo pode-se inferir que o contato das células de músculo liso ao *scaffold* não induziu à necrose ou apoptose celular, em todas as amostras testadas (Fig. 11).

## **Discussão**

Reconstrução uretral, especialmente em pacientes com defeitos uretrais de longo comprimento, é um grande desafio para os cirurgiões. A criação de um biomaterial ideal para essa reconstrução tem sido uma aspiração para a

## Artigo 2

---

medicina há mais de um século, sendo que durante as últimas décadas, a engenharia de tecidos tem sido proposta como uma estratégia para a reconstrução uretral. Alguns tipos de biomateriais têm sido utilizados em modelos animais<sup>34,35,36</sup> e em humanos<sup>37</sup>. No entanto, a literatura pouco relata a comparação das propriedades mecânicas e biocompatibilidade dos biomateriais<sup>38</sup>.

Segundo Atala<sup>39</sup> o biomaterial ideal deve ser biocompatível, promover interação celular no tecido desenvolvido, e possuir propriedades mecânicas e físicas. Três classes de biomateriais são usadas na engenharia de tecidos genitourinários: matérias de derivação natural, como colágeno e alginato; matrizes acelulares, como submucosa vesical e submucosa de intestino delgado; e polímeros sintéticos, como ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático e poli ácido láctico co-glicólico.

O uso de matrizes acelulares como *scaffolds* para reconstrução de uretra é bastante difundido em pesquisas<sup>8,40-44</sup>. A engenharia de tecidos ou medicina regenerativa visa utilizar *scaffolds* com células para regenerar e restaurar a função do tecido perdido devido a traumas, doenças e de origens congênitas<sup>45</sup>.

Neste estudo foi proposto o uso de matrizes acelulares de aorta suína, cujos resultados demonstraram tratar-se de material adequado. Além de fácil obtenção, a descelularização com SDS a 0,1% para torná-la acelar mostrou-se eficiente. Os ensaios de tração evidenciaram que sua resistência não foi alterada e que a força de tração das fibras de colágeno manteve-se semelhante nas duas amostras, sendo que apenas as células foram destruídas. Goissis *et*



## Artigo 2

---

*al.*<sup>26</sup> publicam resultados referentes à desvitalização de vasos, entre eles, aorta abdominal utilizando tampões alcalinos em presença de DMSO, onde o meio extremamente alcalino e a longa exposição ao tampão foram determinantes da melhor descelularização (36 a 48 horas). Os autores usaram segmentos menores (3cm), enquanto que no presente estudo os fragmentos apresentavam entre 5 e 10cm no momento da descelularização. Além dessa diferença de tamanho dos fragmentos, outro fato que diferencia as duas pesquisas é o reagente utilizado para descelularizar a amostra. No presente estudo, o método de remoção das células validado utilizou o detergente SDS, no qual o controle de pH não teve influência direta e a completa remoção ocorreu em 15 horas. As comparações dos dois estudos demonstraram que o uso do protocolo com detergente é rápido e eficaz.

A decisão de se preservar o material, após descelularização, em álcool 70°GL levantou a hipótese de que resquícios do álcool pudessem ser citotóxicos. Para minimizar a provável citotoxicidade para as células mantidas e expandidas em cultura, antes da aplicação sobre o *scaffold*, lavagens subsequentes com meio de cultura foram realizadas. Este método de preservação foi escolhido pela eficiência e simplicidade. As análises realizadas por citometria de fluxo não evidenciaram toxicidade para as células como demonstrado no testes de anexina V/iodeto de propídeo, em que as mesmas apresentaram viabilidade de 99,31%. Yaffe *et al.*<sup>46</sup>, descrevem o uso deste teste por citometria de fluxo para analisar a viabilidade celular.

## Artigo 2

---

A adesão das células ao *scaffold* utilizando Puramatrix® foi outro resultado de garantia da presença das células no material. O uso do Puramatrix® como suporte tridimensional para as células também serviu como agente promotor de adesão de células como demonstrado por Shroff et al.<sup>47</sup>.

Foram obtidos dois tipos celulares neste estudo: células musculares da parede de bexiga de coelhos e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de coelhos, estas últimas com a finalidade de servir de controle negativo para as reações imunocitoquímica e controle positivo para citometria de fluxo<sup>48</sup>. Isto se fez necessário tendo em vista que ambos os tipos celulares após o cultivo caracterizam-se como células aderentes ao plástico, responsável por unidades formadoras de colônias fibroblastóides, cujo monitoramento por microscopia invertida em contraste de fase não é suficiente para definir as características de um ou outro tipo de célula. Diante disto, optou-se pela análise de expressão utilizando-se anticorpo anti-CD90 acoplado com FITC frente aos dois tipos celulares. Como controle negativo foram utilizadas as células da bexiga, expandidas até a terceira passagem, sem a colocação do anticorpo fluoresceinado, medindo desta forma, a autofluorescência das células. Como controle positivo, utilizou-se a cultura de CTM-TA, que expressa positividade. De fato, o teste de citometria de fluxo teve como objetivo, eliminar a possibilidade de que as células expandidas mantivessem o perfil de CTM ou tivessem sofrido desdiferenciação durante o cultivo celular<sup>28</sup>. Os resultados mostraram que 95,81% das CTM-TA cultivadas apresentaram reação positiva ao anticorpo anti-CD90, enquanto que as células da parede da bexiga

expandidas tiveram resultado negativo diante do anti-CD90 (1,61%), considerado satisfatório uma vez que células de músculo liso não expressão CD90.

A obtenção, cultivo *in vitro*, expansão das células de bexiga foram realizadas com sucesso, sendo o método de imunocitoquímica utilizado para caracterização destas. O perfil de músculo liso foi confirmado após a análise da marcação com anticorpo  $\alpha$ -SMA, sendo que as CTM-TA expostas ao mesmo anticorpo não apresentaram coloração.

Ainda no presente estudo foi demonstrada a caracterização das células de músculo liso de bexiga de coelhos e sua implantação em matrizes acelulares de aorta de suínos para reparo de lesão na uretra em coelhos. Em 2007, Fu *et al.*<sup>17</sup> descreveram um modelo experimental de reparo de defeito uretral utilizando matriz de colágeno de submucosa vesical. Eles compararam o implante de matrizes acelulares e matrizes acelulares semeadas com células epidérmicas de prepúcio e seus resultados demonstraram claramente que apenas matrizes semeadas com células mantiveram seu calibre sem formação de estenose uretral.

Devido a esse e vários outros estudos<sup>19,42,49-53</sup> sobre a importância da presença de células nos *scaffolds*, optou-se por usar essa metodologia como proposta na reconstrução da uretra.

A utilização de *scaffold onlay* ao invés da estrutura tubular foi eleita devido a estudos demonstrarem desenvolvimento de estenose no uso da estrutura tubular como observado por Quitzan<sup>27</sup>e Magnan *et al.*<sup>54</sup>, que

## Artigo 2

---

relataram melhores resultados com o uso de matrizes acelulares *onlay* com presença de células semeadas, prevenindo a ocorrência de estenoses.

As imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura confirmaram a presença de células aderidas ao *scaffold* de matriz de aorta celular. É possível afirmar que as células estão em sua superfície devido à tridimensionalidade apresentada. As mesmas se encontram em formato arredondado, apresentando grande quantidade de vilosidades e prolongamentos em sua superfície, correspondendo à intensa ação secretora das células com a finalidade de promover a adesão das mesmas à superfície da matriz. A liberação das proteínas adesivas, dos proteoglicanos na constituição da matriz extracelular promoverá progressivamente o alongamento das mesmas sobre o *scaffold*. O aspecto observado não é o de grande quantidade de prolongamentos devido ao tempo em que as células foram cultivadas e mantidas em contato com a matriz (72 horas), não sendo tempo suficiente para que estas adquirissem o perfil esperado (fibroblastóide).

### Conclusão

A matriz acelular de aorta suína processada pela técnica descrita manteve sua resistência e qualidade das fibras colágenas após descelularização. Em contato com células de músculo liso, a matriz acelular obtida segundo o protocolo testado, não apresentou citotoxicidade. Esse biomaterial, recelularizado com células de músculo liso de bexiga de coelhos, deve ser considerado como opção terapêutica na reconstrução de uretra com lesões complexas tendo em vista sua integração com tecido subjacente.

**Referências**

1. Hendren, W.H., and Crooks, K.K. Tubed free skin graft for construction of male urethra. *J Urol* **123**, 858, 1980.
2. Theodorescu, D., Balcom, A., Smith, C.R., McLorie, G.A., Churchill, B.M., and Khoury, A.E. Urethral replacement with vascularized tunica vaginalis: defining the optimal form of use. *J Urol* **159**, 1708, 1998.
3. Slavov, C. Urethroplasty with combined free tissue grafts. *Khirurgiia (Sofia)* **6**, 23, 2006.
4. Trindade Filho, J.C.S. Avaliação funcional, morfométrica e histológica da matriz acelular de aorta e da mucosa bucal quando implantados na uretra: estudo experimental no coelho [Ph.D. thesis]. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.
5. Atala, A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatr Res* **63**, 569, 2008.
6. Bazeed, M.A., Thuroff, J.W., Schmidt, R.A., and Tanagho, E.A. New treatment for urethral strictures. *Urology* **21**, 53, 1983.
7. Olsen, L., Bowald, S., Busch, C., Carlsten, J., and Eriksson, I. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. An experimental study. *Scand J Urol Nephrol* **26**, 323, 1992.
8. Chen, F., Yoo, J.J., and Atala, A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology* **54**, 407, 1999.
9. Sievert, K.D., Bakircioglu, M.E., Nunes, L., Tu, R., Dahiya, R., and Tanagho, E.A. Homologous acellular matrix graft for urethral

- reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *J Urol* **163**, 1958, 2000.
10. Atala, A., Guzman, L., and Retik, A.B. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol* **162**, 1148, 1999.
  11. Barbagli, G., Guazzoni, G., Palminteri, E., and Lazzeri, M. Anastomotic fibrous ring as cause of stricture recurrence after bulbar onlay graft urethroplasty. *J Urol* **176**, 614, 2006.
  12. Özgök, Y., Özgür Tan, M., Kilciler, M., Tahmaz, L., and Erduran, D. Use of bladder mucosal graft for urethral reconstruction. *Int J Urol* **7**, 355, 2000.
  13. Levine, L.A., Strom, K.H., and Lux, M.M. Buccal mucosa graft urethroplasty for anterior urethral stricture repair: evaluation of the impact of stricture location and lichen sclerosus on surgical outcome. *J Urol* **178**, 2011, 2007.
  14. Dorin, R.P., Pohl, H.G., De Filippo, R.E., Yoo, J.J., and Atala, A. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? *World J Urol* **26**, 323, 2008.
  15. Shokeir, A., Osman, Y., Gabr, M., Mohsen, T., Dawaba, M., and el-Baz, M. Acellular matrix tube for canine urethral replacement: is it fact or fiction? *J Urol* **171**, 453, 2004.
  16. De Filippo, R.E., Yoo, J.J., and Atala, A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol* **168**, 1789, 2002.

- 
17. Fu, Q., Deng, C.L., Liu, W., and Cao, Y.L. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int* **99**, 1162, 2007.
  18. Li, C., Xu, Y.M., Song, L.J., Fu, Q., Cui, L., and Yin, S. Urethral reconstruction using oral keratinocyte seeded bladder acellular matrix grafts. *J Urol* **180**, 1538, 2008.
  19. Gu, G.L., Xia, S.J., Zhang, J., Liu, G.H., Yan, L., Xu, Z.H., and Zhu, Y.J. Tubularized Urethral Replacement Using Tissue-Engineered Peritoneum-Like Tissue in a Rabbit Model. *Urol Int* **89**, 358, 2012.
  20. Silva, R.A.M. Utilização de técnicas de engenharia de tecidos para validação do uso do *scaffold* de quitosana em ampliação vesical de coelhos [M.S. thesis]. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2012.
  21. Fiala, R., Vidlar, A., Vrtal, R., Belej, K., and Student, V. Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures. *Eur Urol* **51**, 1702, 2007.
  22. Mantovani, F., Tondelli, E., Cozzi, G., Abed El Rahman, D., Spinelli, M.G., Oliva, I., Finkelberg, E., Talso, M., Varisco, D., Maggioni, A., and Rocco, F. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS): evolution of the grafting technique and results of 10-year experience. *Urologia* **78**, 92, 2011.
  23. Kawano, P.R., Fugita, O.E., Yamamoto, H.A., Quitzan, J.G., Padovani, C., and Amaro, J.L. Comparative study between porcine small intestinal

- submucosa and buccal mucosa in a partial urethra substitution in rabbits. *J Endourol* **26**, 427, 2012.
24. Ahmad, H., Mahmood, A., Niaz, W.A., Akmal, M., Murtaza, B., and Nadim, A. Bulbar urethral stricture repair with buccal mucosa graft urethroplasty. *J Pak Med Assoc* **61**, 440, 2011.
25. Atala, A. Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering. *Urol Clin North Am* **26**, 157, 1999.
26. Goissis, G., Suzigan, S., Parreira, D.R., Maniglia, J.V., Braile, D.M., and Raymundo, S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs* **24**, 217, 2000.
27. Quitzan, J.G. Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelar arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos [Ph.D. thesis]. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2009.
28. Chamberlain, G., Fox, J., and Ashton, B. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739, 2007.
29. Safwani, W.K., Makpol, S., Sathapan, S., and Chua, K.H. Long-term *in vitro* expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. *J Tissue Eng Regen Med* – **not available** – doi: 10.1002/term.1501, 2012.



30. Wagner, W. Implications of long-term culture for mesenchymal stem cells: genetic defects or epigenetic regulation? *Stem Cell Res Ther* **3**, 54, 2012.
31. Fairbairn, D.W., Olive, P.L., and O'Neill, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* **339**, 37, 1995.
32. Bertanha, M. Estruturação *ex-vivo* de vasos sanguíneos a partir da diferenciação de células-tronco de coelhos [M.S. thesis]. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2011.
33. Guilherme, G.T.B., Souza, A.V.G., Moroz, A., Murador, P., Bittencourt, R.A.C., Golim, M.A., Rossi-Ferreira, R., and Deffune, E. Avaliação de morte programada de células: comparação do índice apoptótico progressivo em cultura de condrócitos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento (Impresso)* **37**, 70, 2007.
34. Atala, A., Vacanti, J.P., Peters, C.A., Mandell, J., Retik, A.B., and Freeman, M.R. Formation of urothelial structures *in vivo* from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds *in vitro*. *J Urol* **148**, 658, 1992.
35. El-Assmy, A., El-Hamid, M.A., and Hafez, A.T. Urethral replacement: A comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int* **94**, 1132, 2004.
36. Nuininga, J.E., van Moerkerk, H., Hanssen, A., Hulsbergen, C.A., Oosterwijk-Wakka, J., Oosterwijk, E., and de Gier, R.P. Rabbit urethra

- replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *Eur Urol* **44**, 266, 2003.
37. Palminteri, E., Berdondini, E., Colombo, F., and Austoni, E. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short-term results. *Eur Urol* **51**, 1695, 2007.
38. Feng, C., Xu, Y.M., Fu, Q., Zhu, W.D., Cui, L., and Chen, J. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived and synthetic scaffolds for urethral reconstruction. *J Biomed Mater Res A* **94**, 317, 2010.
39. Atala, A. Regenerative Medicine and Tissue Engineering in Urology. *Urol Clin North Am* **36**, 199, 2009.
40. Parnigotto, P.P., Gamba, P.G., Conconi, M.T., and Midrio, P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res* **28**, 46, 2000.
41. Atala, A. Experimental and clinical experience with tissue engineering techniques for urethral reconstruction. *Urol Clin North Am* **29**, 485, 2002.
42. Feng, C., Xu, Y.M., Fu, Q., Zhu, W.D., and Cui, L. Reconstruction of three-dimensional neourethra using lingual keratinocytes and corporal smooth muscle cells seeded acellular corporal spongiosum. *Tissue Eng Part A* **17**, 3011, 2011.
43. Mantovani, F., Tondelli, E., Cozzi, G., Abed El Rahman, D., Spinelli, M.G., Oliva, I., Finkelberg, E., Talso, M., Varisco, D., Maggioni, A., and Rocco, F. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS):

- evolution of the grafting technique and results of 10-year experience. *Urologia* **78**, 92, 2011.
44. De Filippo, R.E., Kornitzer, B.S., Yoo, J.J., and Atala, A. Penile urethra replacement with autologous cell-seeded tubularized collagen matrices. *J Tissue Eng Regen Med* – **not available** –doi:10.1002/term.1647, 2012.
45. Lomas, A.J., Webb, W.R., Han, J., Chen, G.Q., Sun, X., Zhang, Z., El Haj, A.J., and Forsyth, N. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/collagen hybrid scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part C Methods* – **not available** – doi:10.1089/ten.TEC.2012.0457, 2013.
46. Yaffe, P.B., Doucette, C.D., Walsh, M., and Hoskin, D.W. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. *Exp Mol Pathol* **94**, 109, 2013.
47. Shroff, K., Rexeisen, E., Arunagirinathan, M.A., and Kokkoli, E. Fibronectin-mimetic peptide-amphiphilic nanofiber gels support increased cell adhesion and promote ECM production. *Soft Matter* **6**, 5064, 2010.
48. Mitchell, J.B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z.E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R.W., Goh, B., Kilrov, G., Wu, X., and Gimble, J.M. Immunophenotype of human adipose – derived cells: Temporal changes in stromal – associated and stem cell – associated markers. *Stem Cells* **24**, 376, 2006.
49. Campodonico, F., Benelli, R., Michelazzi, A., Ognio, E., Toncini, C., and Maffezzini, M. Bladder cell culture on small intestinal submucosa as

- bioscaffold: experimental study on engineered urothelial grafts. *Eur Urol* **46**, 531, 2004.
50. Kim, B.S., Atala, A., and Yoo, J.J. A collagen matrix derived from bladder can be used to engineer smooth muscle tissue. *World J Urol* **26**, 307, 2008.
51. Wu, S., Liu, Y., Bharadwaj, S., Atala, A., and Zhang, Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 1317, 2011.
52. Micol, L.A., Arenas da Silva, L.F., Geutjes, P.J., Oosterwijk, E., Hubbell, J.A., Feitz, W.F.J., and Frey, P. *In-vivo* performance of high-density collagen gel tubes for urethral regeneration in a rabbit model. *Biomaterials* **33**, 7447, 2012.
53. Orabi, H., Aboushwareb, T., Zhang, Y., Yoo, J.J., and Atala, A. Cell-Seeded tubularized scaffolds for reconstruction of long urethral defects: A Preclinical Study. *Eur Urol* **63**, 531, 2013.
54. Magnan, M., Le´vesque, P., Gauvin, R., Dubé, J., Barrieras, D., El-Hakim, A., and Bolduc, S. Tissue engineering of a genitourinary tubular tissue graft resistant to suturing and high internal pressures. *Tissue Eng Part A* **15**, 197, 2009.

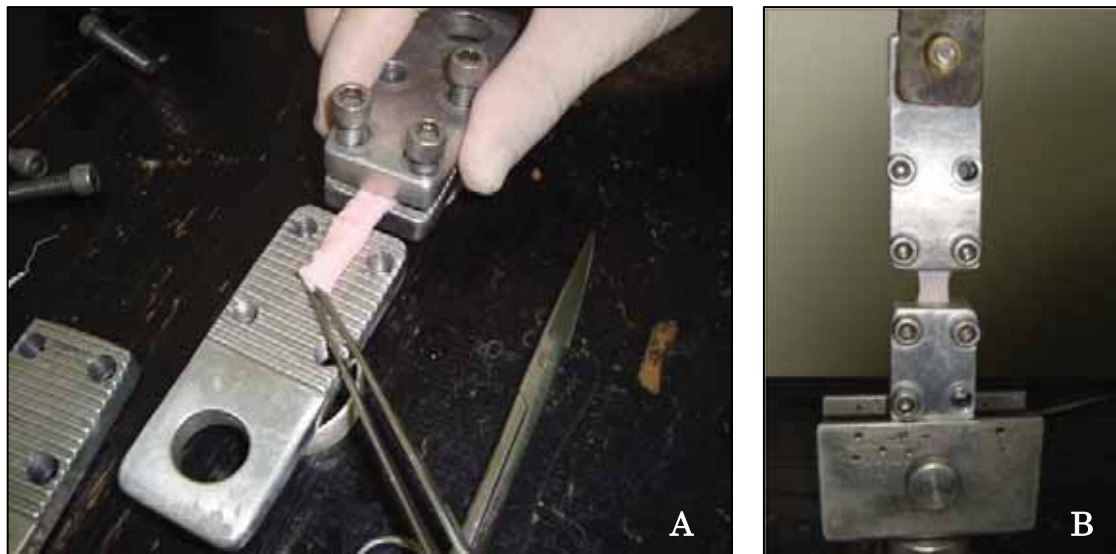
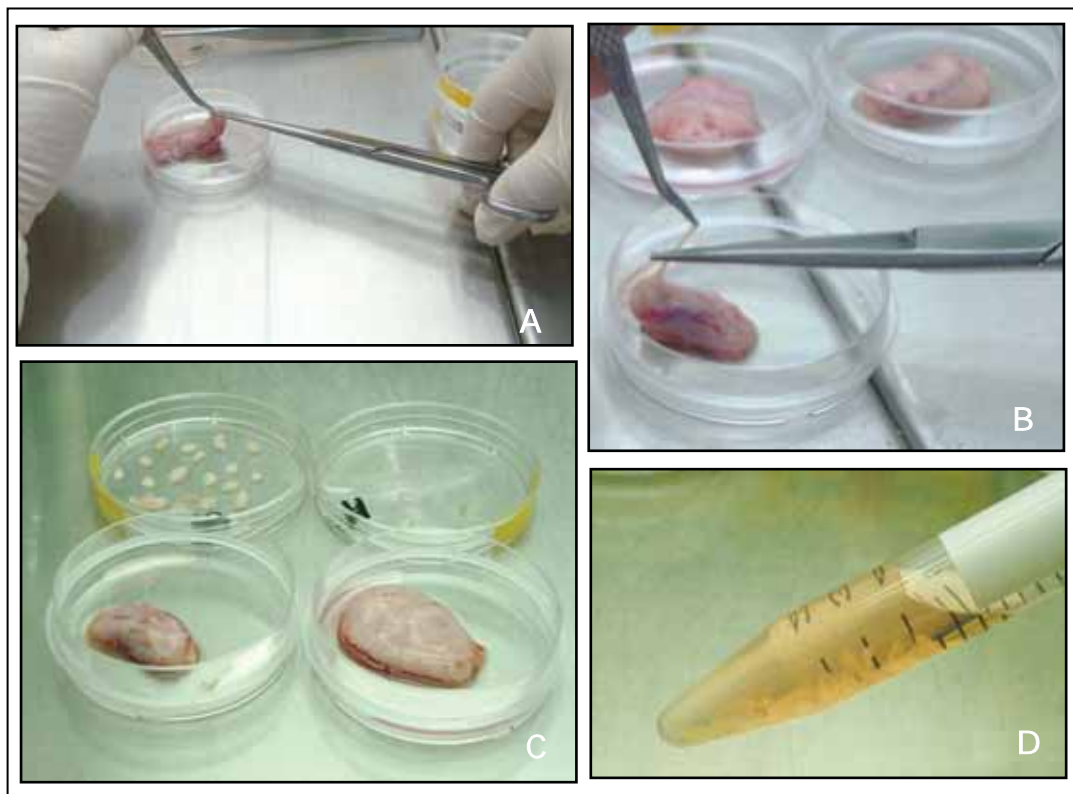


FIG. 1. Em A, preparo da aorta *in natura* para teste. Em B, aorta sendo tracionada.

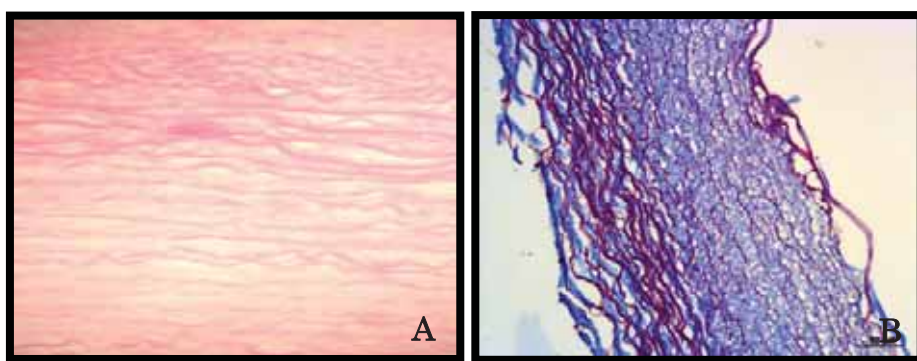


Silva<sup>20</sup>

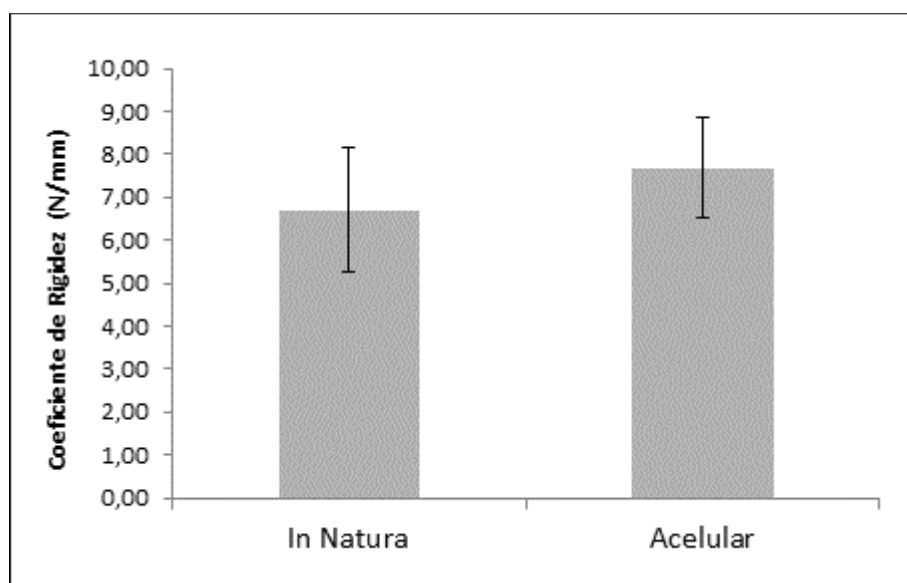
FIG. 2. Etapas da dissociação enzimática: Em A e B, obtenção de tecido muscular liso. Em C, bexigas e fragmentos de tecido muscular. Em D, fragmentos em meio de cultura.



**FIG. 3.** Aorta acelular após tratamento com SDS 0,1% (*scaffold*).



**FIG. 4.** Matriz acelular, Colágeno e fibras elásticas com estrutura e morfologia mantidas normais. Coloração em **A** HE 200X, Em **B** Calceja 100X.

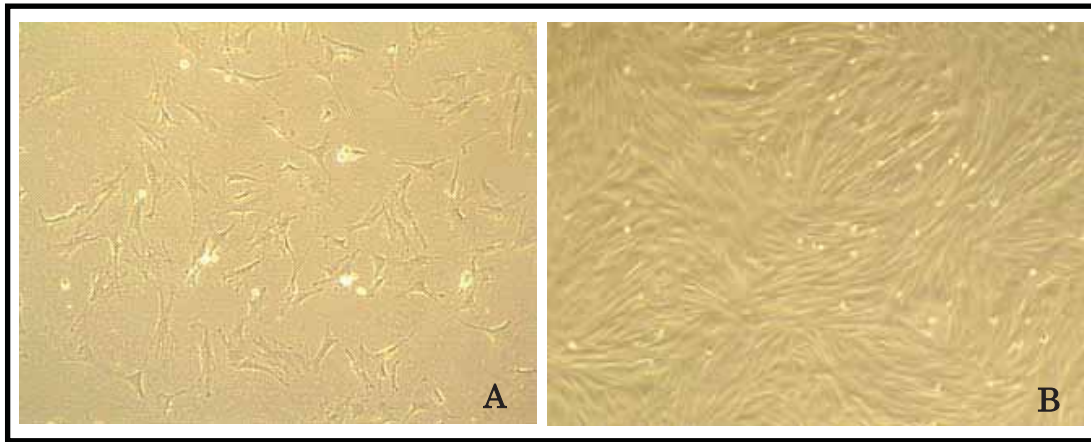


**FIG. 5.** Média e desvio padrão do coeficiente de rigidez nos grupo *in natura* e Acelular.

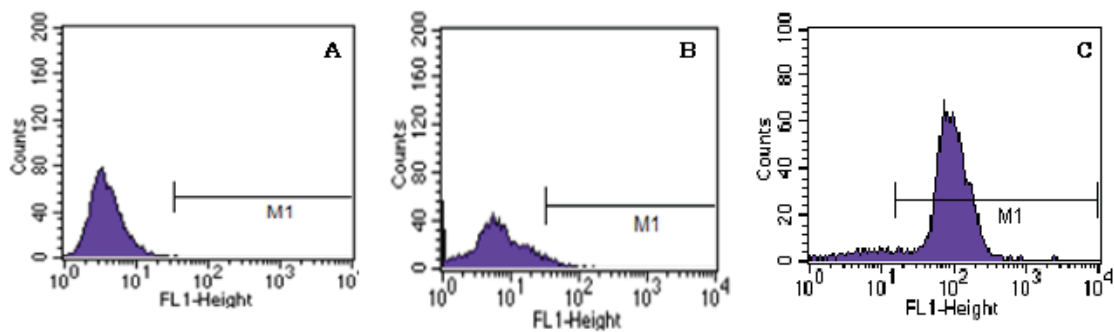
**TABELA 1.** Perfis de interpretação de apoptose e necrose por citometria de fluxo

Perfis	Interpretação
1. Expressão negativa de Anexina-V e IP	Células Viáveis
2. Expressão positiva de Anexina-V e Negativa de IP	Células nos estágios precoces de Apoptose Necrose celular
3. Expressão negativa de Anexina-V e positiva de IP	Estágios finais de apoptose
4. Expressão positiva de Anexina -V e IP	

Fonte: Adaptado de Guilherme *et al.*<sup>33</sup>.

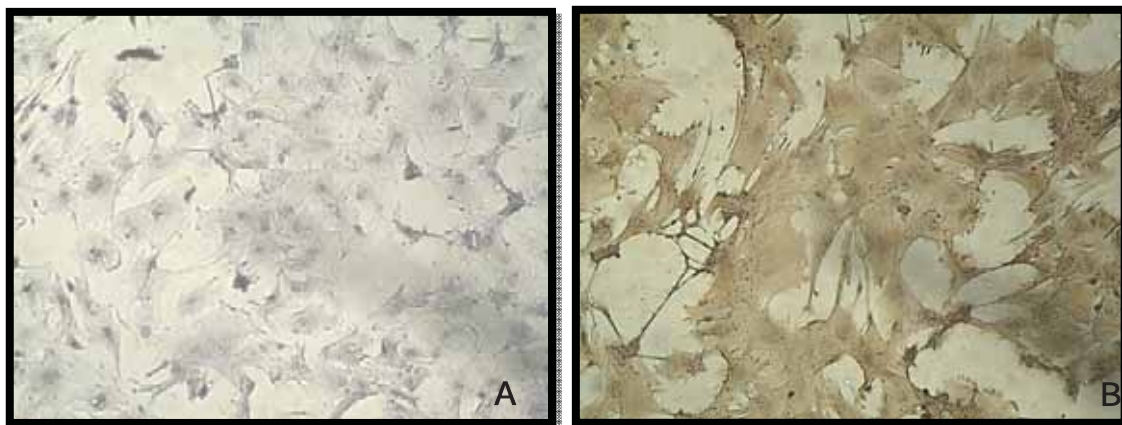


**FIG. 6.** Em **A**, células de músculo liso em início de adesão. Em **B**, células em confluência de 100%. Ambas em contraste de fase ph1 e aumento 50X.

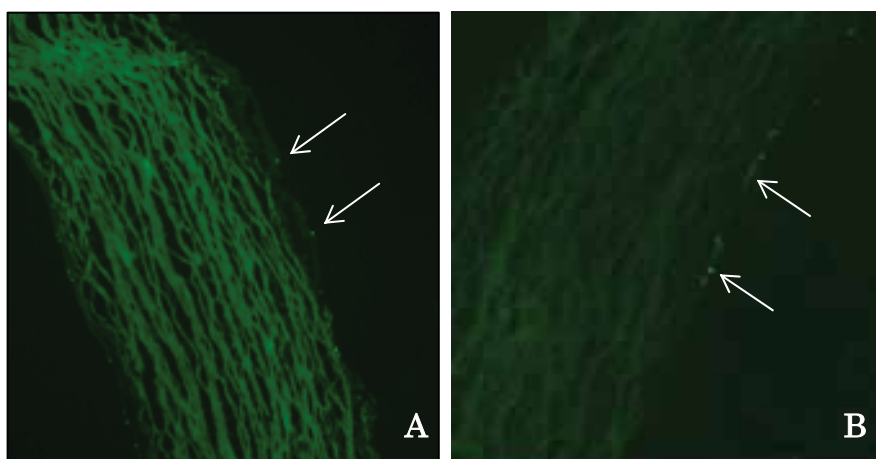


**FIG. 7.** Análise do perfil das células por citometria de fluxo. Em **A**, histograma do controle negativo. Em **B**, células de bexiga de coelho, em terceira passagem com CD90-FITC. Em **C**, controle positivo (CTM de tecido adiposo de coelho).

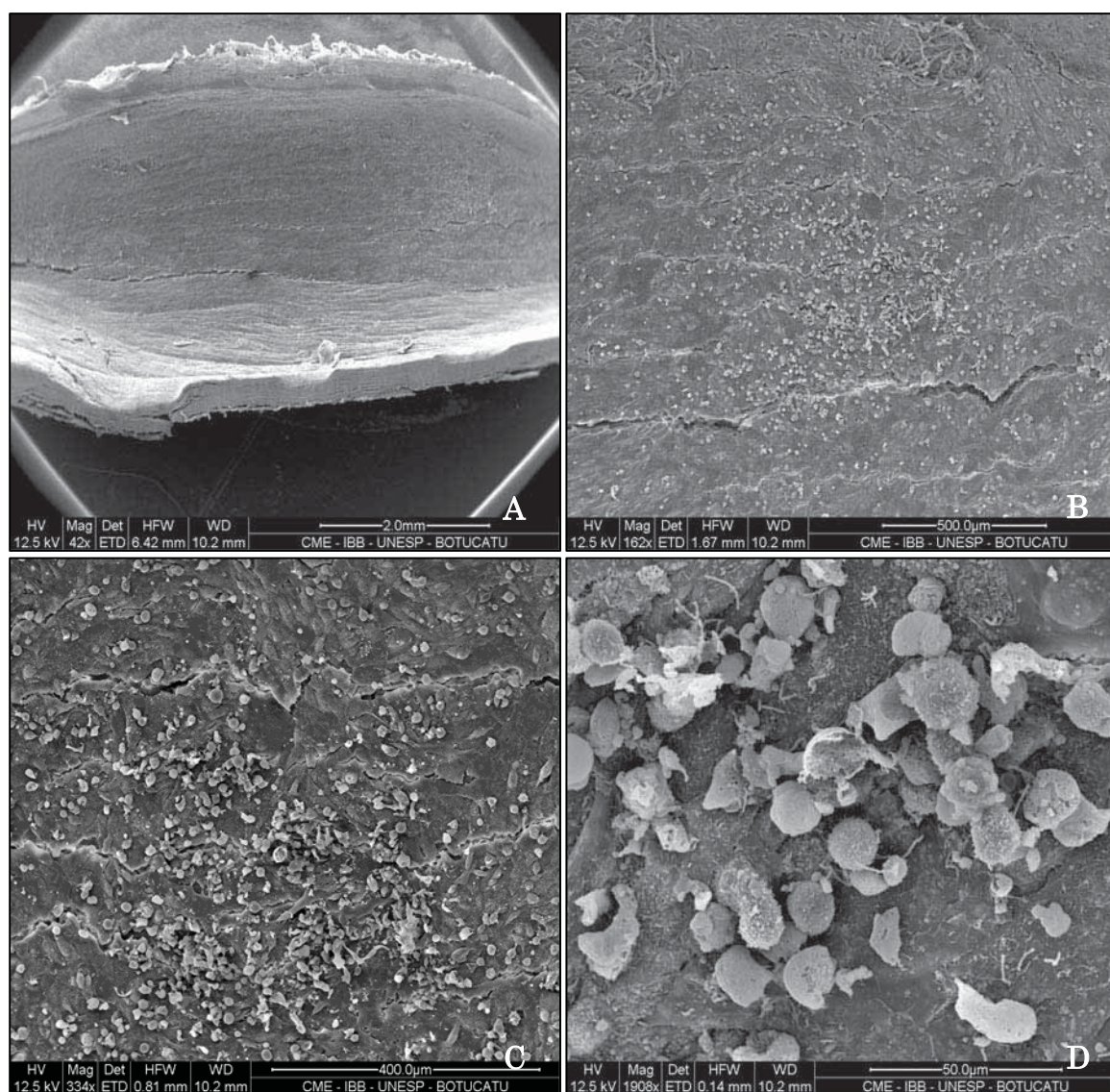




**FIG. 8.** Em **A**, células-tronco mesenquimais não marcadas representam o controle negativo. Em **B**, células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Células marcadas com o anticorpo  $\alpha$ -SMA. Aumento de 100x.

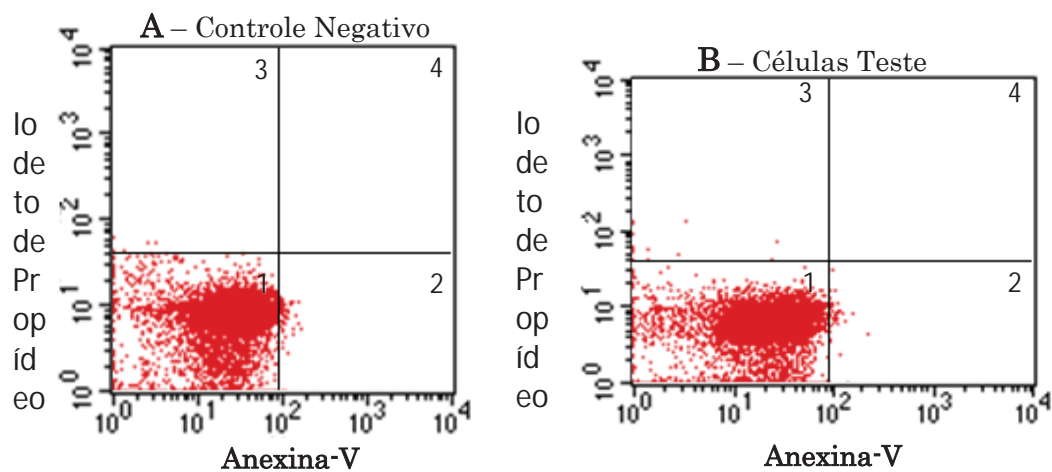


**FIG. 9.** Em **A**, matriz acelular de aorta com poucas células, indicadas pelas setas, sem Puramatrix®. Em **B**, matriz acelular de aorta com células indicadas pelas setas, com Puramatrix®. Aumento 200X.



**FIG. 10.** Microscopia eletrônica de varredura. Em **A**, visão panorâmica da matriz de aorta. Em **B**, **C** e **D**, células de músculo liso em sua superfície com Puramatrix®.

## Artigo 2



		Controle Negativo (%)	Células - Teste (%)
1	Anex - / IP -	99,38	99,31
2	Anex + / IP -	0,56	0,47
3	Anex - / IP +	0,07	0,22
4	Anex + / IP +	0	0

**FIG. 11.** DotPlot indicando em **A**, controle negativo com 99,38% das células viáveis em 1 (Anex -/IP-) indicado no quadro. Em **B**, células teste com AnexinaV /Iodeto de Propídeo, demonstrando viabilidade celular em 99,31% como demonstrado em 1 no quadro.



## Artigo 3

Avaliação histofuncional de matriz heteróloga acelular  
como *scaffold* para células de músculo liso para  
implante em uretra de coelhos

Artigo escrito atendendo às normas da Revista Acta Brasileira de Cirurgia



## Artigo 3

---

**OBJETIVO:** Este estudo visa à avaliação do implante de matriz de aorta acelular com revestimento de células musculares obtidas de bexiga de coelho quando implantada na uretra de coelhos.

**MÉTODOS:** Foram utilizados 26 coelhos machos, sendo distribuídos em dois grupos experimentais: GI – grupo implante de matriz de aorta revestido com células musculares e GC – grupo controle (sham) que foram avaliados com duas e quatro semanas após a cirurgia, GI: com implante do *scaffold onlay* e GC: sem implante de matriz. O peso, a urocultura, uretrografia e a avaliação histológica foram estudados.

**RESULTADOS:** Os animais apresentaram ganho de peso em ambos os grupos e as culturas de urina avaliadas tanto no pré-operatório quanto no momento da eutanásia foram todas negativas. Na uretrografia não foi observado área de estenose ou fístula nos dois momentos de avaliação. A histologia demonstrou evolução inflamatória padrão na região de implante caracterizado por processo inflamatório polimorfonuclear na fase inicial e na avaliação de duas semanas; mononuclear na de quatro semanas e também áreas de integração do enxerto.

**CONCLUSÃO:** A utilização da aorta acelular como *scaffold* semeado com células de músculo liso de bexiga em uretra de coelho demonstrou excelentes resultados clínicos e radiológicos.

**Palavras-chave:** *Scaffold*, Matriz de aorta acelular, Uretra, Estudo experimental

---

## ABSTRACT

**PURPOSE:** This study aims to evaluate the implantation of an acellular aortic matrix coated with bladder muscle cells obtained from rabbit when implanted in rabbit urethra.

**METHODS:** 26 male rabbits were distributed into two groups: GI - group matrix implant coated with aortic muscle cells with two weeks evolution and GC - control group (sham) evaluated with four weeks after surgery, GI : implant scaffold with onlay and GC: no matrix implant. Weight, urine culture, urethrography and histological evaluation were studied.

**RESULTS:** The animals showed weight gain in both groups, and urine cultures evaluated both preoperatively and at the time of sacrifice were all negative. In both time points stenosis or fistula areas in the Urethrography were not observed. Histology showed inflammatory changes in the standard implant region characterized by polymorphonuclear inflammatory process in the initial phase and in the evaluation of two weeks; and mononuclear in four weeks. There were also areas of graft integration.

**CONCLUSION:** The use of acellular aorta as scaffold seeded with smooth muscle cells of rabbit urethra into the bladder demonstrated excellent clinical and radiological results.

**Keywords:** Scaffold, Acellular aortic matrix, Urethra, Experimental Study

## Introdução

## Artigo 3

---

Várias doenças congênitas da uretra, como hipospádia ou epispádia, bem como patologias adquiridas, tais como estenose de uretra, podem prejudicar gravemente a sua função. A hipospádia é um defeito genital frequente no nascimento, exigindo a reconstrução cirúrgica que afeta 1 em 300 recém-nascidos do sexo masculino na Europa<sup>1</sup>. A estenose uretral afeta 1 em cada 1000 homens após os 60 anos sendo esses geralmente tratados através de uretrotomia e dilatação, embora estudo recente tenha sugerido a uretroplastia como uma técnica de caráter promissor<sup>2</sup>.

A correção cirúrgica destas condições, muitas vezes utiliza retalho de pele, mucosa oral ou intestinal, enxerto intestinal ou material xenoenxerto para substituir o tecido em falta ou para completar tecidos insuficientes. As regiões doadoras muitas vezes não são adequadas ou não apresentam medidas suficientes para restaurar a anatomia do órgão no qual serão enxertadas. Além disso, complicações pós-operatórias são comuns, com necessidade de futuras intervenções cirúrgicas<sup>3</sup>, causando insegurança e apreensão ao médico e paciente.

As complicações e limitações inerentes a estes procedimentos podem ser mitigadas pela disponibilidade de fontes alternativas de tecido. No entanto, tem havido um grande interesse no desenvolvimento de engenharia de tecidos a partir de materiais autólogos, tais como células de bexiga, de medula óssea derivadas de células-tronco e tecido adiposo. Idealmente, um tecido de engenharia teria que restaurar ou manter a função normal do tecido original. Além disso, produtos vindos da engenharia de tecidos não devem ser imunogênicos a fim de minimizar as reações de rejeição<sup>3</sup> como também disporem de fácil obtenção e manipulação. O objetivo desse estudo visa à avaliação do implante de matriz de aorta acelular com revestimento de células musculares obtidas de bexiga de coelho quando implantada na uretra de coelhos.

---

### Métodos

*Animais*

Foram utilizados 26 coelhos machos, raça Grupo Genético Botucatu, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP apresentando peso entre 2,5 – 4,0Kg. A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, previamente estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), como consta no protocolo 699/2008.

Os animais foram distribuídos, por sorteio, em grupos experimentais: GI – grupo implante, GC – grupo controle.

A indução anestésica foi feita com cloridrato de ketamina 35-50mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina 5-10mg/Kg (Syntec, SP, Brasil), via intra-muscular e localmente com cloridrato de levobupivacaína com epinefrina a 0,2 mL/kg (Novabupi® Laboratório Cristália). A cirurgia foi realizada sob condições de anti-sepsia.

Para o procedimento cirúrgico, a uretra foi cateterizada com sonda uretral 8-Fr depois de adequada lubrificação com cloridrato de lidocaína gel 2% (Laboratório Cristália) e a porção distal do pênis do coelho foi fixada com ponto de reparo (nylon 4-0). Procedeu-se a incisão da pele e tecido subcutâneo, exatamente entre o pênis e o ânus (região perineal). A uretra foi exposta e feita uma incisão longitudinal de 1cm na região ventral, a 1cm abaixo do meato uretral. Na sequência o *scaffold onlay* medindo 1,0 x 0,5cm foi fixado no vértice proximal e distal com ponto simples de fio de Poliglactina 7-0 (vicryl ETHICON, Johnson&Johnson), seguido de sutura com pontos contínuos do vértice proximal para o distal. O mesmo procedimento foi realizado do outro lado, no sentido inverso. O lado do *scaffold* com as células musculares aderidas foi mantido na região externa do implante (Figura 1).

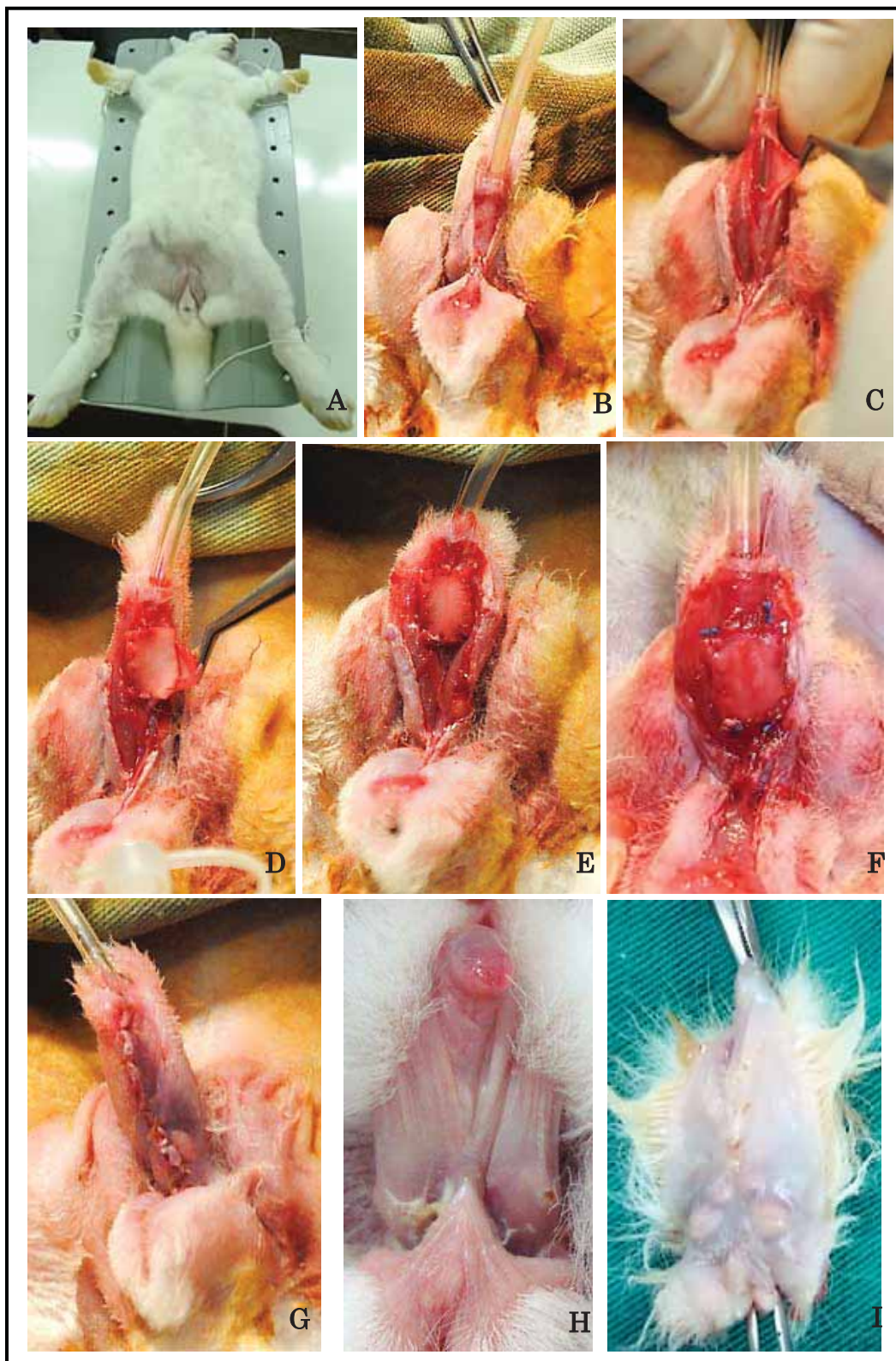
As margens proximais e distais foram marcadas com fio radiológico para auxiliar na visualização durante uretrografia miccional. Em seguida foi feita aproximação do tecido subcutâneo com vicryl 7-0 cobrindo completamente o *scaffold*. Para finalizar, a pele foi suturada com *catgut* cromado 5-0.



### Artigo 3

---

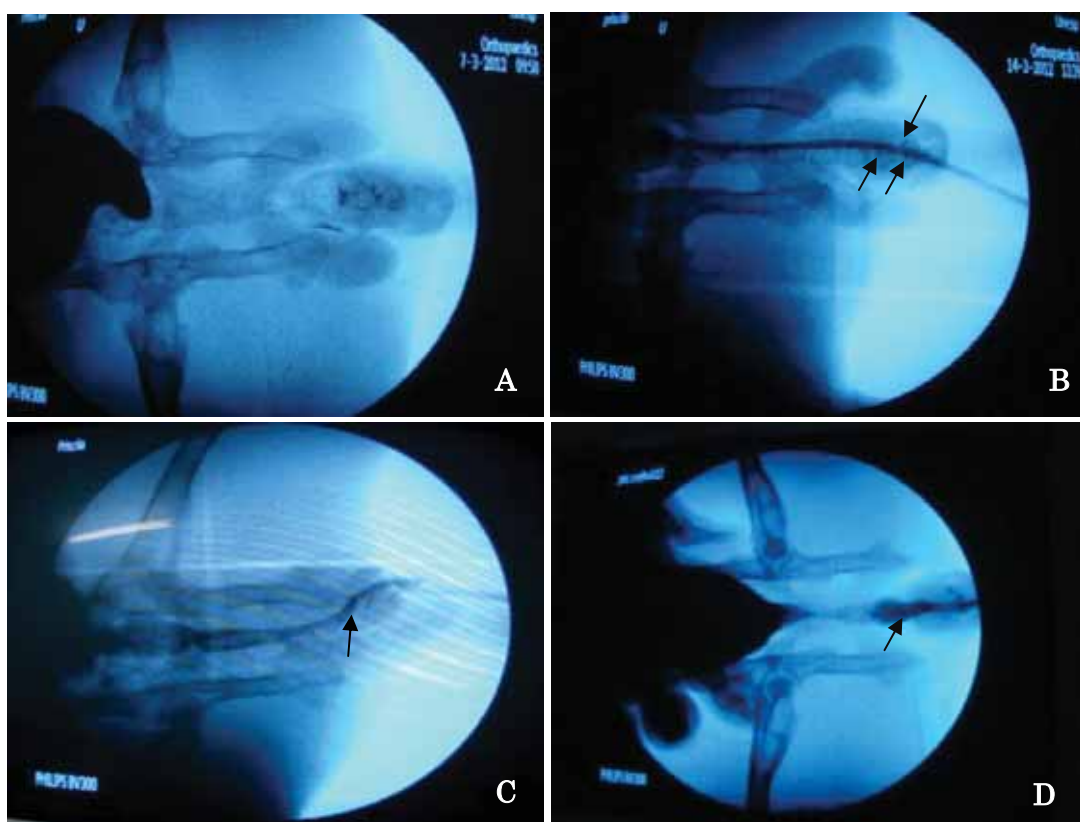
Os animais receberam 5 mg/kg/dia do antibiótico Enrofloxacin e 3mg/kg/dia do anti-inflamatório Cetoprofeno, iniciados no momento da indução anestésica e mantidos até o quinto dia de pós operatório (PO), via subcutânea. No pós-operatório os animais foram mantidos no biotério, em gaiolas individuais, com controle de temperatura, ciclos de luz, livre acesso à ração, água *ad libitum* e com supervisão de técnico especializado.



**FIGURA 1** - Em **A**, coelho anestesiado e posicionado para cirurgia. Em **B**, uretra cateterizada por sonda e incisão da pele e subcutâneo expondo uretra. Em **C**, incisão de 1cm na uretra. Em **D**, *scaffold onlay* sendo implantado por ponto contínuo nos dois lados. Em **E**, implante todo suturado. Em **F**, pontos nas extremidades com fio radiológico. Em **G**, fechamento da pele com fio *catgut* cromado 5,0. Em **H**, depois do tempo de evolução cicatrização da cirurgia. Em **I**, retirada do pênis em bloco.

### *Uretrografia*

A uretrografia foi realizada com duas e quatro semanas de pós-operatório, utilizando arco cirúrgico de radioscopia, Marca *Philips*, Modelo BV-300. Os animais foram sedados com acepromazina (1mg/kg) e cloridrato de fentanila (3µL/kg), via intramuscular. Na sequência foi feita infusão retrógrada na uretra de 20mL de contraste radiológico iodado (Pielograf<sup>®</sup>, Shering do Brasil) dissolvido em partes iguais com solução fisiológica 0,9% pela sonda uretral (8-Fr), previamente introduzida (Figura 2).



**FIGURA 2** - Uretrografias. Em **A** e **B**, após duas semanas de implante, visualização do local de implante indicado pelo fio radiológico demonstrado pelas setas e em **B** sonda com contraste radiológico. Em **C** e **D**, evolução de duas e quatro semanas respectivamente demonstrando adequado calibre uretral indicado pelas setas.

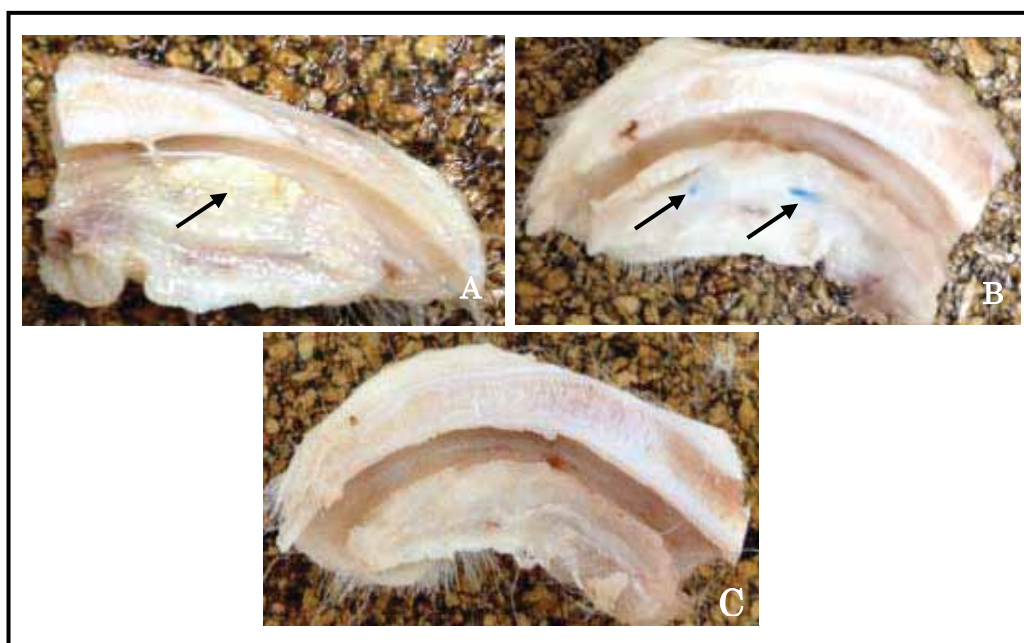
### *Coleta de Urina para Cultura Microbiológica*

A coleta da urina foi realizada com anti-sepsia em dois momentos: antes da cirurgia e antes da eutanásia. Foram utilizadas sonda 8-Fr e seringa de 10mL BD<sup>®</sup>. A sonda foi introduzida no canal da uretra depois de adequada

lubrificação com cloridrato de lidocaína gel 2% (Laboratório Cristália) e na sequência 2mL da urina foram coletados e transferidos para tubo Falcon BD® de 10mL estéril. Dez microlitros da urina foram semeados em cada um dos meios de cultura: ágar sangue, ágar MacConkey e meio líquido Brain Heart Infusion – BHI.

#### *Eutanásia e Retirada do Pênis*

Após uretrografia, os animais foram submetidos à eutanásia com pentobarbital sódico 70-100mg/Kg (Syntec, SP, Brasil) de peso vivo administrados via intravenosa. A seguir procedeu-se a retirada do pênis em bloco, com incisão próxima ao púbis. A peça foi fixada em formaldeído a 10% por 10 dias. Após esse período, a uretra foi dissecada e avaliada macroscopicamente (Figura 3).



**FIGURA 3** – Seção longitudinal dos pênis. Em **A**, visualização do implante da matriz, evolução de 2 semanas. Em **B**, grupo de evolução de 4 semanas, visualização do fio radiológico e implante pouco evidente. Em **C**, grupo controle, sem implante.

#### *Análise Histológica*

O implante foi seccionado longitudinalmente. Os segmentos de uretra foram preparados em blocos de parafina e as lâminas foram coradas com

## Artigo 3

---

hematoxilina e eosina (HE) para estudo de células epiteliais e resposta inflamatória, Tricrômio de Masson (TM) para estudo de fibras colágenas.

### *Parâmetros Estudados*

As variações de peso entre o pré-operatório e o momento da eutanásia foram comparadas entre os diferentes grupos. Os animais foram observados ao longo de todo o estudo para possível detecção de alterações clínicas.

A análise das lâminas foi realizada sem que o examinador tivesse prévio conhecimento dos grupos estudados. Os segmentos de tecido foram avaliados quanto à presença de necrose da matriz, infiltrado inflamatório mononuclear ou polimorfonuclear e tecido de granulação.

A classificação destas alterações baseou-se em escore estabelecido de 0 a 3 (0- ausente, 1- leve, 2- moderado e 3- intenso).

### *Análise Estatística*

A análise estatística para o ganho de peso dos animais foi: análise de variância para grupos independentes, já para os dados histológicos, foi utilizada análise descritiva por meio de tabelas de contingência e gráficos.

## **Resultados**

Todos os animais apresentaram ganho de peso tanto nos grupos de implante de duas e quatro semanas, quanto nos animais do grupo controle com o mesmo tempo de evolução. Os animais do grupo de quatro semanas ganharam mais peso devido à proporcionalidade do tempo em estudo (Tabela 1). Nenhum animal morreu ou apresentou complicações no pós-operatório como estenoses ou fístulas ao longo do estudo.

## Artigo 3

TABELA 1 - Média  $\pm$  desvio padrão do ganho de peso segundo os momentos.

Grupo	Momentos	
	2 semanas	4 semanas
Controle	381,7 $\pm$ 31,2	670,7 $\pm$ 236,5
Tratado	406,5 $\pm$ 117,7	643,3 $\pm$ 224,5
<b>Total</b>	400,8 $\pm$ 103,3 <sup>b</sup>	649,6 $\pm$ 217,4 <sup>a</sup>

*Letras minúsculas diferentes em uma linha indicam diferença significativa (valor  $p < 0,05$ ) entre os momentos 2 e 4 semanas*

### *Microbiologia da Urina*

As amostras de urinas avaliadas no pré-operatório e no momento da eutanásia foram todas negativas.

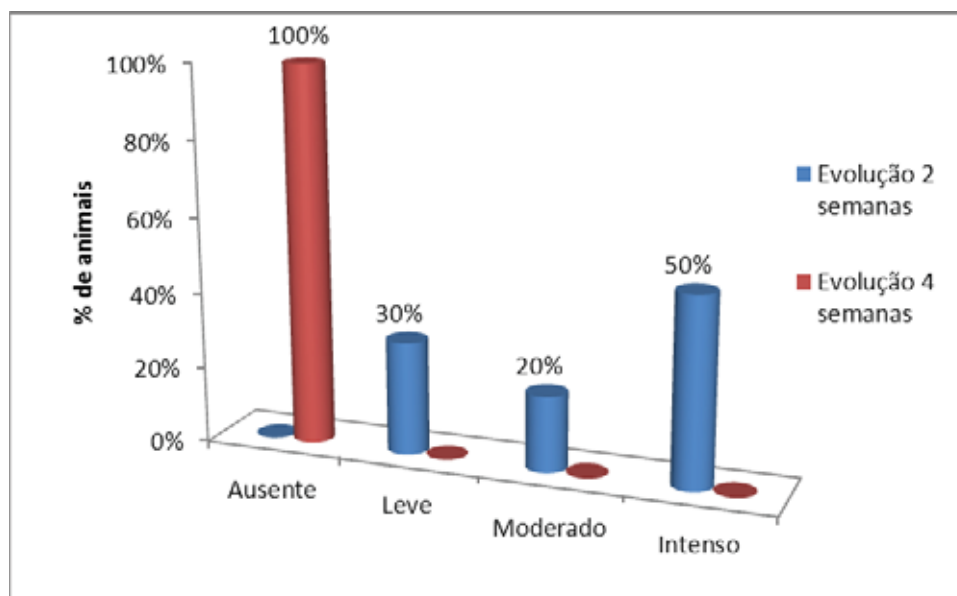
### *Análise Macroscópica*

A cicatrização das cirurgias evoluiu de forma adequada sem a presença de infecção, deiscência de sutura ou fístula durante o estudo.

Após a remoção cirúrgica do pênis para avaliação, foi observado no grupo de duas semanas a presença da matriz e um calibre uretral adequado. No grupo de quatro semanas a matriz não estava tão evidente e não apresentava área de estenose. Nos grupos controle não foi observado anormalidade uretral.

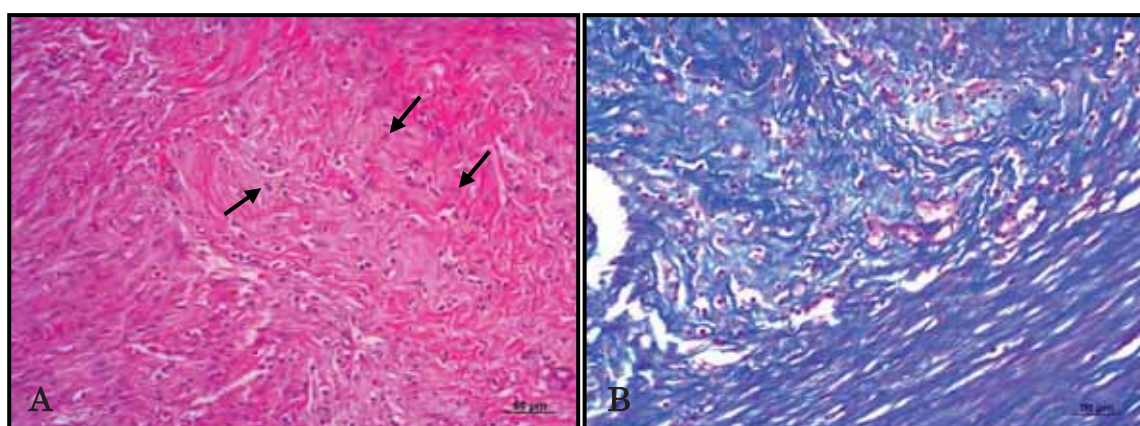
### *Análise Histológica*

Foi evidenciado infiltrado inflamatório polimorfonuclear no grupo de evolução de duas semanas, característica da resposta inflamatória aguda demonstrada pela Figura 4.

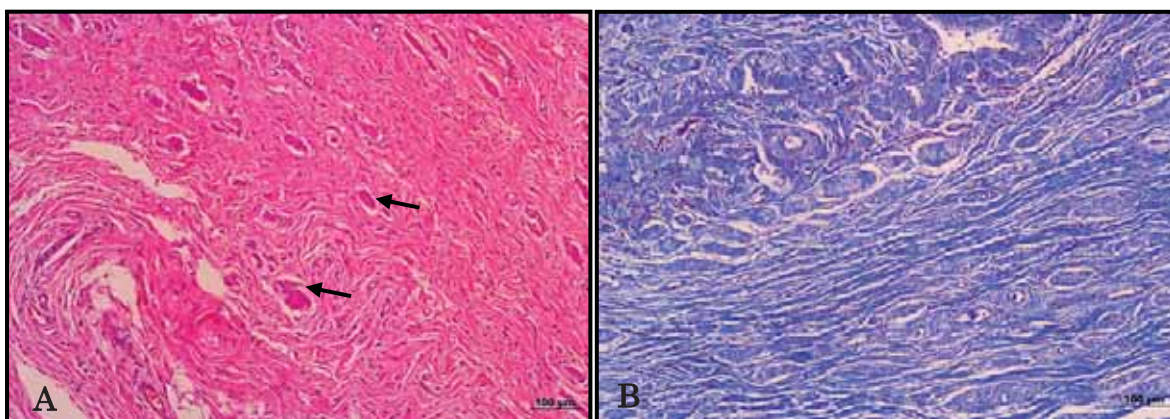


**FIGURA 4** - Porcentagens de presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear.

No grupo dos animais com evolução de quatro semanas foi notado proliferação fibroblástica recente evidenciada por núcleos vesiculosos de fibroblastos jovens e presença de tecido conjuntivo (Figura 5). Os animais com mesmo tempo de evolução do grupo controle apresentaram boa cicatrização com presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 6).

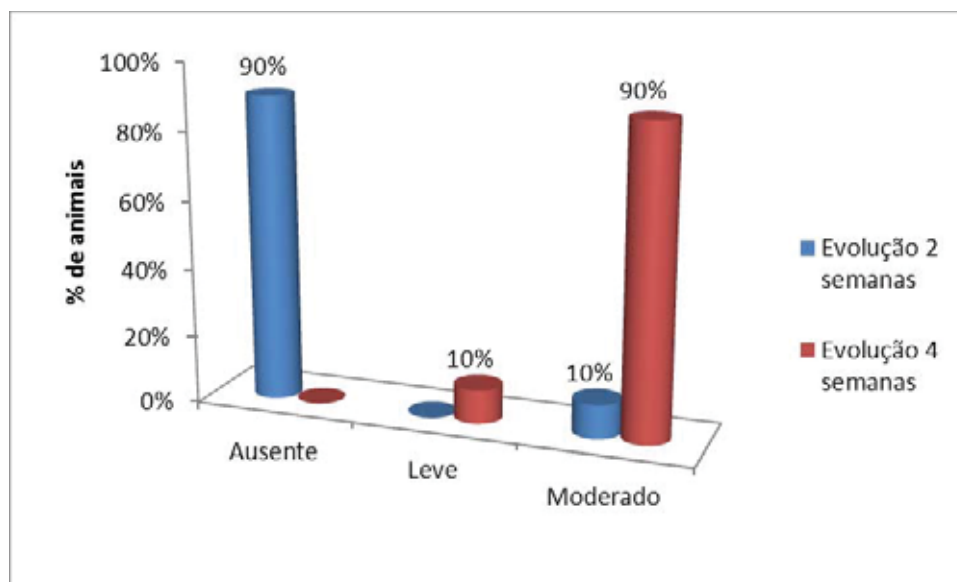


**FIGURA 5** - Em **A**, proliferação fibroblástica recente evidenciada pelos núcleos vesiculosos dos fibroblastos jovens indicados pelas setas. Coloração HE. Em **B**, presença de tecido conjuntivo denso corado em azul. Tricrômio de Masson.



**FIGURA 6** - Em **A**, Tecido de granulação em processo de cicatrização, moderado infiltrado inflamatório com presença de células gigantes indicado pelas setas. Coloração HE. Em **B**, tecido conjuntivo de reparo em azul. Coloração Tricrômio de Masson.

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear foi observado no grupo de quatro semanas de evolução, característica de reação inflamatória tardia demonstrada na Figura 7.

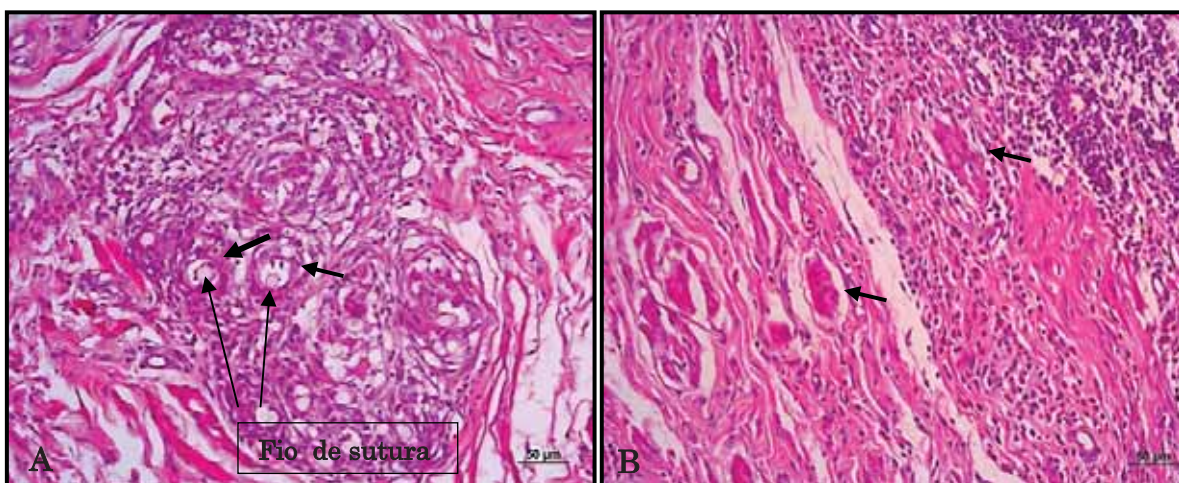


**FIGURA 7** - Percentagens de presença de infiltrado mononuclear.



## Artigo 3

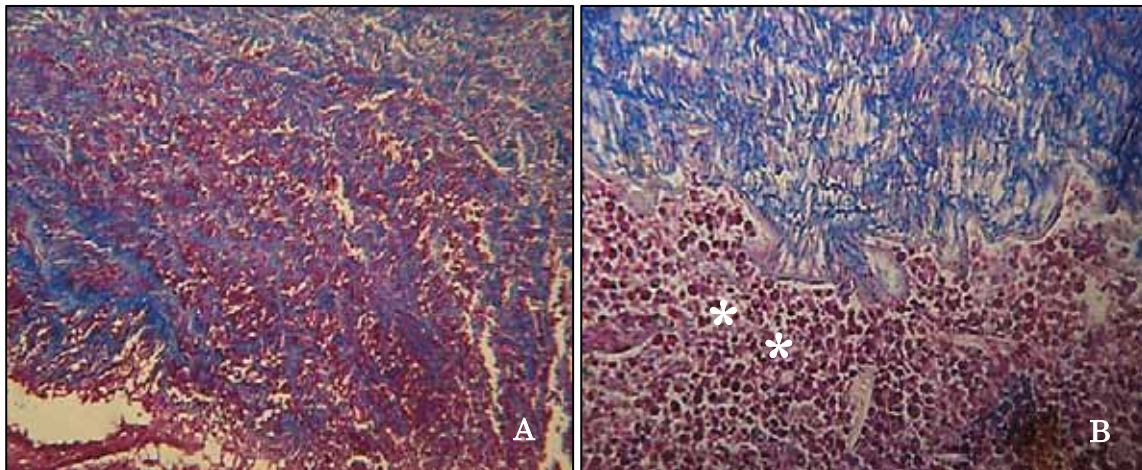
No grupo dos animais com evolução de duas semanas, verificou-se reação granulomatosa recente desenvolvida pelos fios de sutura como indicado na Figura 8 (A), em B, evolução de quatro semanas presença de reação granulomatosa madura com presença de células gigantes.



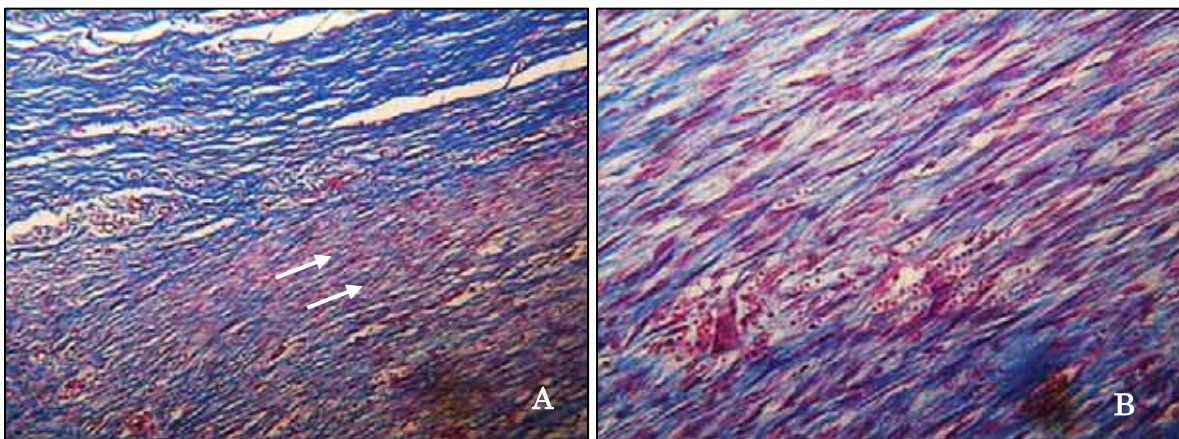
**FIGURA 8** - Em **A**, reação granulomatosa recente com histiócitos epitelióides ao redor dos fios de sutura indicados pelas setas (corte transversal). Em **B**, reação granulomatosa madura com células gigantes multinucleadas indicadas pelas setas. **A** e **B**, coloração HE.

Ao observar as lâminas histológicas nota-se que há integração da matriz implantada com o tecido da uretra do coelho. No grupo com duas semanas de evolução foi observado uma área de necrose cistificada na região central da matriz implantada devido a espessura da parede da aorta selecionada para matriz ser muito espessa e, por isso, ter causado uma hipovascularização por diferenças constitucionais entre os dois modelos: suíno e de coelho (Figura 9).

No grupo com quatro semanas de evolução observou-se tecido integrado entremeado por uma rede vascular delicada e raros linfócitos e nas áreas periféricas do implante existe integração e produção de colágeno (Figura 10).



**FIGURA 9** - Em **A**, integração entre os tecidos da matriz e do animal em vermelho e azul. Aumento 200X. Em **B**, área de necrose indicada pelos asteriscos e deposição de colágeno na extremidade da matriz em azul. Aumento 400X.



**FIGURA 10** - Em **A**, integração dos tecidos indicada pela seta, presença de colágeno na extremidade em azul. Aumento 200X. Em **B**, tecido integrado entremeadado por uma rede vascular delicada. Aumento 400X. Colorações Tricrômio de Masson.

### Discussão

A engenharia de tecidos vem auxiliando diversas áreas da medicina, desenvolvendo materiais sintéticos e biológicos para substituir ou reconstruir tecidos lesados<sup>4</sup>. Na reconstrução uretral a utilização de material biológico é essencial para evitar complicações apresentadas por materiais sintéticos. A utilização de implante de tecidos acelulares vem sendo amplamente estudada.

Técnicas usando matrizes acelulares não semeadas por células foram aplicadas experimentalmente numa forma bem sucedida em reparos da uretra, mas trabalhos demonstram que quando o implante é recoberto por células os resultados clínicos são superiores<sup>5</sup>. Em 2007, Fu *et al.*<sup>6</sup> descreveram um modelo experimental de reparo de defeito uretral utilizando matriz de colágeno de submucosa vesical. Eles compararam matrizes acelulares semeadas com células epidérmicas de prepúcio com matrizes acelulares e seus resultados demonstraram claramente que apenas matrizes semeadas com células mantiveram seu calibre sem formação de estenose uretral. A escolha pelo cultivo de células de músculo liso para semear na matriz em sua porção externa se deu devido a facilidade do cultivo e a ampla expansão *in vitro* em curto espaço de tempo, além de considerar que a repopulação celular na região interna, se dá por células urotelias naturalmente<sup>7</sup>.

A metodologia empregada no estudo foi o implante *onlay* de aorta suína acelular recoberta por células de músculo liso de bexiga de coelho em uretra de coelho, padronizada e caracterizada no Artigo 2, sendo o procedimento cirúrgico de fácil realização. Tal técnica não trouxe implicações clínicas pós-operatórias como: perda de peso, retenção de urina, infecção urinária ou no local da cirurgia, nem ocorreu morte de nenhum animal, pelo contrário, foi evidente o ganho de peso.

A utilização dessa matriz acelular como tecido de implante em uretra de coelhos mostrou ser um bom biomaterial, de fácil manuseio, com boa elasticidade e resistência à sutura observados durante o procedimento cirúrgico. Na avaliação uretrográfica foi verificado que a uretra manteve um bom calibre sem área de fístula ou estenose uretral nos grupos de estudo com

## Artigo 3

---

o implante da matriz, demonstrando sucesso no reparo uretral. É importante destacar que o experimento utilizou animais com uretras íntegras e virgens de manipulação ou complicações. Análise posterior se faz necessária com o uso de modelo experimental de lesão uretral prévia e também avaliação histológica e radiográfica mais tardia.

As análises microbiológicas das amostras de urina foram negativas para todos os grupos demonstrando a não interferência da técnica cirúrgica e da matriz na evolução do pós-operatório.

Na avaliação histológica ao verificar resposta celular observou-se maior infiltrado inflamatório polimorfonuclear no grupo de duas semanas devido ao procedimento cirúrgico, sendo essas típicas de uma resposta inflamatória aguda. No grupo de quatro semanas, contudo, foi evidente a presença de infiltrado inflamatório mononuclear característico de resposta reacional tardia, sugerindo que processo inflamatório à matriz segue a evolução de resposta inflamatória padrão. Nesse grupo observou-se tecido integrado e entremeado por uma rede vascular delicada sugerindo sucesso no implante.

### Conclusão

A utilização da aorta acelular como *scaffold* semeado com células de músculo liso de bexiga em uretra de coelho demonstrou resultados clínicos, radiológicos (funcionais) e histológicos satisfatórios. Há necessidade de novos estudos para avaliações tardias de implantes com segmentos maiores, finos e tubulares a fim de validar a matriz para uso clínico.

**Referências**

1. Dolk H, Loane M, Garne E. The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol.* 2010;686:349-64.
2. Anger JT, Buckley JC, Santucci RA, Elliott SP, Saigal CS, Urologic Diseases in America Project. Trends in stricture management among male medicare beneficiaries: underuse of urethroplasty? *Urology.* 2011;77(2):481-5.
3. Kollhoff DM, Cheng EY, Sharma AK. Urologic applications of engineering tissue. *Regen Med.* 2011;6(6):757-65.
4. Atala A. Regenerative Medicine and Tissue Engineering in Urology. *Urol Clin North Am.* 2009;36(2):199-209.
5. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol.* 2002;168(4):1789-92; discussion 1792-3.
6. Fu Q, Deng CL, Liu W, Cao Y. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int.* 2007;99(5):1162-5.
7. Dorin RP, Pohl HG, De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Tubularized urethral replacement with unseeded matrices: what is the maximum distance for normal tissue regeneration? *World J Urol.* 2008;26(4):323-6.

## Conclusões Finais

---

Diante do inequívoco interesse pela comunidade científica pelas técnicas de engenharia de tecido, envolvendo as propostas para reparo de lesões de uretra complexas observado na revisão realizada no artigo 1, conclui-se:

- A matriz acelular de aorta suína processada pela técnica descrita manteve sua resistência e qualidade das fibras colágenas após descelularização. Em contato com células de músculo liso, a matriz acelular obtida segundo o protocolo testado, não apresentou citotoxicidade. Esse biomaterial, recelularizado com células de músculo liso autólogas, deve ser considerado como opção terapêutica na reconstrução de uretra com lesões complexas tendo em vista sua integração com tecido subjacente.
- A utilização da aorta acelular como *scaffold* semeado com células de músculo liso de bexiga em uretra de coelho demonstrou resultados clínicos, radiológicos (funcionais) e histológicos satisfatórios. Há necessidade de novos estudos para avaliações tardias de implantes com segmentos maiores, finos e tubulares a fim de validar a matriz para uso clínico.



*Conclusões Finais*





*Anexos*







Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Dalrio Ruzão Junior, MSc - Botucatu - SP  
CEP: 16.815-870  
Fone/Fax: (06614) 3811-0143  
e-mail: secretaria\_capellup@fmb.unesp.br

Instituto de Especialidade de Medicina Animal da Faculdade de Medicina - Botucatu - SP - CEP: 16.815-870




Comissão de Ética em Experimentação Animal

## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 699 sobre o Projeto de Pesquisa "Avaliação histológica e funcional do enxerto de neo-uretra desenvolvido por bioengenharia, quando implantado em uretra de coelho", a ser conduzido por Priscila Murador, orientada pela Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, Co-orientada pela Prof.ª Dr.ª Elenice Deffune, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de certificar a sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 30 de outubro de 2.008

  
Prof. Dr.ª Regina Helena G. Martins  
Presidente da CEEA

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA