



Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”

PAULO ROBERTO KAWANO

**COLÁGENO ACELULAR E MUCOSA ORAL NA SUBSTITUIÇÃO
PARCIAL DA URETRA: Estudo comparativo em coelhos**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina da Botucatu – UNESP, na área de Regeneração de Tecidos e Órgãos, para obtenção de título de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Amaro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Kawano, Paulo Roberto.

Colágeno acelular e mucosa oral na substituição parcial da uretra: estudo comparativo em coelhos / Paulo Roberto Kawano. – Botucatu : [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: João Luiz Amaro

Assunto CAPES: 40102092

1. Uretra - Cirurgia 2. Uretra - Enxerto

CDD 617.462

Palavras chave: Matriz de colágeno acelular; Mucosa oral; Uretra

DEDICATÓRIA

“ . . . Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo . . .

(Hermann Hesse)

Dedico esta obra ao meu querido orientador, mestre e amigo que com admirável paciência, seriedade e destreza soube conduzir-me pelo árduo caminho em busca do conhecimento. Como um filho que, instigado pela curiosidade busca a segurança nos braços do pai para dar seus primeiros passos, sinto-me confiante ao iniciar minha longa caminhada amparado por tuas mãos amigas.

Meu querido mestre, estejas certo de que as lições aqui aprendidas vão muito além desta obra e que serão para mim, acima de tudo, exemplos de caráter, dedicação e profissionalismo dos quais me lembrarei para sempre com carinho . . .

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente **A DEUS ...**

. . . pela Sua presença constante em minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nos momentos mais difíceis. Agradeço a Deus, do qual todas as coisas dependem, e que em sua infinita sabedoria e bondade, concedeu-me tudo aquilo que um simples homem pode almejar: família, trabalho e respeito.

Aos meus pais **PAULO e MARIA ...**

. . . pelo carinho, dedicação e respeito em que me educaram e pelo maravilhoso exemplo de vida deixado; agradeço pelas oportunidades que me proporcionaram, independentemente do sacrifício necessário. Agradeço por suas preocupações, pelas noites mal dormidas e pelos fios de cabelos brancos, pois eu sei que jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha esposa **ANA CLAUDIA ...**

. . . magia que é a fonte da minha energia, persistência e luta. A você o meu carinho especial e meu agradecimento por compreender o quanto este momento significa para mim e por seu apoio incondicional. Obrigado por sua companhia, pelo seu amor, dedicação e incentivo durante mais esta etapa de nossa longa jornada juntos.

A minha filha **RAFAELA . . .**

. . . que é hoje, para mim, a razão de minha existência e a força que me impulsiona a prosseguir nesta longa jornada. Seus desejos e sonhos serão para mim objetivos traçados, os quais perseguirei persistentemente sem jamais esmorecer.

Aos meus irmãos **DANIEL** e **ROSE** . . .

. . . que testemunharam meus esforços e sempre me incentivaram a continuar sonhando. Obrigado pelas palavras de afeto e atos de vida que sempre serão para mim modelos de conduta e espelhos de caráter.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório Experimental de Urologia da Faculdade de Medicina - UNESP, sendo fruto do esforço conjunto e da participação de inúmeros colegas, amigos e funcionários, sem os quais sua conclusão jamais teria sido possível. Sendo assim, gostaria de expressar minha gratidão a todos os profissionais que de forma direta ou indireta, contribuíram para sua realização.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Padovani, docente do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – UNESP, pela orientação paciente e impecável análise estatística dos resultados;

Ao Prof. Dr. Viciany Henrique Fabris, docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, pelo auxílio, orientação e leitura dos parâmetros histológicos;

À profa. Dra. Silvana Artioli Schellini, professora adjunta do Departamento de Oftalmologia da Faculdade de Medicina - UNESP, pela orientação e fornecimento do *software* Scion Image[®] utilizado na leitura dos parâmetros histomorfométricos;

Aos colegas do Departamento de Urologia: Aparecido Donizete Agostinho, Carlos Alberto Monte Gobbo, Carlos Marcio Nóbrega de Jesus, Eliana Milanesi Rubio, Fernando da Rocha Câmara, Hamilto Akihissa Yamamoto, José Carlos

Souza Trindade, José Carlos Souza Trindade Filho, José Goldberg, Luis Antonio Corrêa e Márcia Delneri e Oscar Eduardo Hidetoshi Fugita pela colaboração e amizade;

À médica veterinária Juliany Gomes Quitzan pelo auxílio na anestesia dos animais e na leitura dos parâmetros histomorfométricos, mas acima de tudo, pela inestimável amizade;

Aos residentes do Departamento de Urologia: Fábio G. O. Lepper, Felipe de Almeida e Paula, Leandro de Britto, Nuno M. E. Gaiato, Rodrigo H. Fallashi e Rogério Cardoso da Silva e aos "fellowship" de Endourologia Leonardo Abreu, Marcelo Travassos e Rodrigo A. P. Otsuka pela paciência e compreensão pelos eventuais momentos de ausência junto às atividades assistenciais durante a fase final de execução deste projeto;

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental José Lucas de Carvalho, Lindalva Casteletto Gangliani e Mara Elizabeth G. Seabra pelos cuidados com os animais bem como pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto e confecção das lâminas;

Às funcionárias do Departamento de Urologia Andréa Garcia Chiamente e Gláucia Garcia Chiamente que auxiliaram durante toda a fase de desenvolvimento deste trabalho;

À coordenadora e aos funcionários da seção de pós-graduação Janete Aparecida Nunes Silva, Lílian Cristina Nadal Bianchi Nunes, Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin que com muito profissionalismo, mas acima de tudo como amigos, colaboraram com orientações e conselhos imprescindíveis à conclusão deste projeto;

À professora Célia S. Guimarães que com dedicação e profissionalismo procedeu à correção desta obra;

Aos funcionários do Laboratório Clínico do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNESP, pela leitura dos exames de urina;

Aos funcionários do Departamento de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – UNESP – Seção de Radiologia Diagnóstica, pela revelação das chapas de uretrografia;

À Cook Urological® pelo fornecimento das membranas de colágeno celular e auxílio financeiro que possibilitou a aquisição de materiais de consumo utilizados neste trabalho;

E, finalmente, a todos os animais que participaram da execução deste experimento contribuindo com suas vidas para obtenção destes resultados, em nome da ciência, meu profundo agradecimento e respeito.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	16
RESUMO.....	18
SUMMARY.....	21
INTRODUÇÃO.....	24
OBJETIVO.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	40
2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
2.1. GRUPO EXPERIMENTAL GI	41
2.2. GRUPO EXPERIMENTAL G II	41
2.3. GRUPO EXPERIMENTAL G III	41
3. TÉCNICA CIRÚRGICA DE SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA URETRA...	42
3.1. ANESTESIA.....	42
3.2. PREPARO DA MATRIZ DE COLÁGENO ACELULAR	42
3.3. PREPARO DO ENXERTO DE MUCOSA ORAL	43
3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	44
3.5. TERAPÊUTICA PROFILÁTICA ANTIMICROBIANA NO PÓS OPERATÓRIO.....	47
4. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	48
5. PARÂMETROS ESTUDADOS	49
5.1. PESO DOS ANIMAIS	49
5.2. CULTURA DE URINA	49
5.3. TÉCNICA DE URETROGRAFIA.....	50
5.4. SACRIFÍCIO E AVALIAÇÃO DO ENXERTO URETRAL.....	53
5.4.1. DETERMINAÇÃO MATEMÁTICA DA ÁREA DO ENXERTO.	54
5.4.2. DETERMINAÇÃO COMPUTADORIZADA DA ÁREA DO ENXERTO.....	55
5.4.3. ANATOMIA PATOLÓGICA.....	57

5.4.4. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO ENXERTO.....	63
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
7. ASPECTOS ÉTICOS.....	67
RESULTADOS.....	68
1. PESO CORPÓREO	69
1.1 DADOS INDIVIDUAIS DO PESO CORPÓREO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	69
1.2 ANÁLISE DO PESO CORPÓREO	69
2. URINOCULTURA	71
3. AVALIAÇÃO DA FÍSTULA URETRAL	72
4. DETERMINAÇÃO DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA ..	73
4.1. DADOS INDIVIDUAIS DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS	73
4.2. ANÁLISE DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA	73
5. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ENXERTO.....	74
5.1. DADOS INDIVIDUAIS DA ÁREA DO ENXERTO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	74
5.2. ANÁLISE DA ÁREA DO ENXERTO.....	74
6. ANÁLISE HISTOLÓGICA DA URETRA.....	76
6.1. DADOS INDIVIDUAIS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA DA URETRA NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	76
6.2. ANÁLISE DA HISTOLOGIA URETRAL.....	76
7. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO COLÁGENO.....	81
7.1. DADOS INDIVIDUAIS DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	81
7.2. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO.....	81
DISCUSSÃO.....	83
1. METODOLOGIA.....	84
1.1. MODELO EXPERIMENTAL.....	84
1.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E DELINEAÇÃO DO TRABALHO.....	85
2. PESO CORPÓREO.....	89
3. URINOCULTURA.....	90
4. FÍSTULA URETRAL.....	91
5. AVALIAÇÃO DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA.....	93

6. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ENXERTO.....	94
7. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA URETRA.....	96
8. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO ENXERTO.....	99
CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	102
APÊNDICE.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- °C: graus Celsius.
 - cm: centímetro.
 - Cm²: centímetro quadrado
 - Fr: French.
 - g: grama.
 - GI: grupo I.
 - GII: grupo II.
 - GIII: grupo III.
 - HC: Hospital de Clínicas.
 - HE: hematoxilina / eosina.
 - Kg: kilograma.
 - kV kilovolt.
 - M0: momento inicial.
 - M1: momento final.
 - MCA: matriz de colágeno acelular.
 - min: minuto.
 - ml: mililitro.
 - mm: milímetro.
 - mm²: milímetro quadrado.
 - NaCl: cloreto de sódio.
 - PO: pós-operatório.
 - RX: raio X.
 - SIS: submucosa intestinal suína.
 - UNESP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
-

RESUMO

COLÁGENO ACELULAR E MUCOSA ORAL NA SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA URETRA: Estudo comparativo em coelhos.

Objetivo: A estenose uretral complexa, frequentemente, requer tecidos extragenitais para seu adequado tratamento. Estudos recentes têm sugerido, nestes casos, a utilização de um novo biomaterial à base de colágeno acelular derivado da submucosa intestinal suína (SIS). O objetivo deste estudo foi comparar os resultados da matriz de colágeno acelular (SIS) em uma ou quatro camadas à mucosa oral na substituição parcial da uretra em coelhos.

Material e Métodos: Realizou-se um estudo prospectivo e randomizado utilizando-se 36 coelhos machos da raça *North Folk* divididos em 3 grupos. Os animais foram submetidos à ressecção padronizada da uretra ventral (segmento de 0,5 x 1 cm) que foi substituído por um enxerto tipo ilha de SIS com 1 camada no Grupo I (G1), SIS com 4 camadas no Grupo II (G2) e mucosa oral no Grupo III (G3). Nenhuma derivação urinária foi utilizada no pós-operatório. A uretrografia foi realizada no pré-operatório e antes do sacrifício. Os enxertos obtidos a partir da uretra regenerada foram avaliados 12 semanas após o implante por meio de exames histológicos de rotina. A retração do enxerto foi caracterizada objetivamente pelo cálculo matemático da área e pela análise computadorizada utilizando-se o *software* Scion Image®. A quantificação do colágeno foi obtida

pela análise da coloração pelo *Picrosirius red* sob luz polarizada que permitiu a diferenciação das fibras de colágeno tipos I e III.

Resultados: A uretrografia confirmou a manutenção de um calibre uretral adequado sem sinais de estenose. Fístulas uretrais foram diagnosticadas por meio de exame radiológico em 8,3% dos casos nos diferentes grupos (1 animal por grupo). A análise da área do enxerto pós-sacrifício pelos métodos matemático e computadorizado foi significativamente menor no grupo III. A retração do enxerto avaliada por análise computadorizada foi significativamente menor no Grupo 2 em relação aos demais grupos ($p < 0.05$). A intensidade da reação inflamatória crônica, neovascularização, fibrose e regeneração epitelial foi semelhante entre os três grupos ($p > 0.05$). A análise do índice de colágeno tipo III:I foi significativamente maior nos animais do grupo II.

Conclusões: A área do enxerto analisada por computador, assim como pelo método matemático, foi menor no grupo III (mucosa oral) que apresentou um alto percentual de retração. Os parâmetros histológicos foram semelhantes entre os três grupos avaliados. O colágeno tipo III foi mais prevalente em todos os grupos e o índice de colágeno tipo III:I foi maior no grupo II. Com relação ao SIS, apesar de não terem sido demonstradas diferenças nos achados histológicos e radiológicos, observamos uma maior retração e fibrose no SIS em camada única quando comparado ao SIS com quatro camadas.

SUMMARY

ACELLULAR COLLAGEN AND BUCCAL MUCOSA IN THE PARTIAL SUBSTITUTION OF URETHRA: COMPARATIVE STUDY IN RABBITS

Objective: Several urethral conditions often require nongenital tissues for reconstruction. One collagen-based biomaterial that has recently emerged is small intestinal submucosa (SIS). The aim of our study was to compare the results between SIS and oral mucosa membrane in the partial substitution of the urethra in rabbits.

Material and Methods: A prospective and randomized study was performed using 36 North Folk male rabbits divided into 3 equal groups. The animals were submitted to a ventral urethral defect (resection of 0,5 x 1 cm segment of the urethra) that was replaced by a patch graft of 1 layer SIS in group I (G1), 4 layers SIS in Group II (G2) and buccal mucosa in Group III (G3). No urethral catheter was left behind. Urethrography was performed pre-operatively and before sacrificing. The grafts of regenerated urethras were harvested at 12 weeks after implantation. The urethra was excised and evaluated by Hematoxylin and eosin stained sections. The patch retraction was objectively measured using mathematic calculation and *Scion Image*® computer analysis. The quantification of collagen was obtained by *Picrosirius red* analysis under polarized light. This technique allowed the differentiation of collagen fibers types I and III.

Results: Urethrograms confirmed the maintenance of a wide urethral caliber without any signs of strictures. Urethral fistulae was diagnosed by radiology in 8,3% of all groups (1 animal each group). Average graft shrinkage evaluated by computer analysis was significantly lower in G2 ($p < 0.05$). The intensity of chronic inflammation, neovascularization, fibrosis and epithelium regeneration was similar among the three groups ($p > 0.05$). The analysis of type III:I collagen index was higher in the animals of group II.

Conclusions: The patch area analyzed by computer or mathematic method was smaller in group III (buccal mucosa) which showed a high percentage of retraction. Histological parameters were similar among the three groups. Type III collagen was prevalent in all groups, and type III:I collagen index was higher in group II. Regarding SIS, in spite of not being found differences in radiological and histological findings, we observed a higher retraction and fibrosis in SIS with one layer when compared to SIS with four layers.

A cirurgia reconstrutiva da uretra representa um dos maiores desafios da urologia moderna ¹ estando indicada tanto na correção de problemas congênitos, como hipospádias e epispádias, como no tratamento de lesões estenóticas secundárias da uretra ². Na maioria dos casos, a estenose ocorre devido ao estreitamento do lúmen ou pela perda da distensibilidade da parede uretral. Sua etiopatogenia pode estar relacionada à instrumentação endoscópica e manipulação uretral, ou ainda ser decorrente de lesões traumáticas ³. As uretrites bacterianas e as lesões ulcerativas como a tuberculose e a sífilis, também podem produzir estenose da uretra ³. Nestes casos, o tratamento endoscópico pela uretrotomia interna é controverso, com risco de formação de fístulas urinárias e altos índices de recidivas ¹.

As cirurgias reparadoras da uretra apresentaram significativa melhora nos seus resultados estéticos e funcionais ao longo dos anos, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e à utilização de biomateriais que contribuíram para o aumento das taxas de sucesso ². Numerosas técnicas têm sido propostas para o tratamento cirúrgico das estenoses da uretra, incluindo a excisão cirúrgica completa do segmento acometido ou sua substituição por materiais autólogos ou sintéticos ^{4,5,6,7,8,9}.

Atualmente são descritas mais de 200 técnicas para reconstrução uretral sendo que, a maioria delas, utiliza enxertos autólogos de pele peniana ou retalhos pediculados de prepúcio ^{10,11,12,13}. Quando o tecido doador local é escasso ou inexistente, o emprego de enxertos de mucosa oral ou vesical, dura máter liofilizada, veia safena, *túnica vaginalis*, mucosa intestinal, peritônio ou enxertos parciais ou totais de pele têm sido utilizados, tanto em ensaios clínicos quanto experimentais ^{5,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26}.

A partir da última década houve um aumento significativo na pesquisa por novos materiais capazes de proporcionar adequada regeneração da uretra²⁷. Diferentes materiais foram ou estão sendo propostos como possíveis substitutos uretrais. Estes podem ser classificados como biodegradáveis ou sintéticos de acordo com sua capacidade de integração ao tecido hospedeiro, autólogos ou heterólogos em função da área doadora, ou ainda como enxertos ou retalhos de acordo com sua vascularização²⁸.

O termo retalho refere-se a qualquer tecido utilizado para reconstrução ou tratamento de uma lesão, que mantenha parte ou todo o seu suprimento sanguíneo de origem, mesmo após sua remoção ou transferência para uma nova região. Já os enxertos, por sua vez, constituem fragmentos de tecido removidos da área doadora sem preservação do pedículo vascular. Neste último caso, sua viabilidade dependerá do contato com o leito receptor bem como da adequada vascularização do tecido hospedeiro. Estes fatores irão promover a neovascularização permitindo assim a adequada nutrição do implante²⁹.

O material ideal deve ser biocompatível, apresentar resistência mecânica à tração e às infecções, além de ser de fácil manuseio favorecendo assim o implante cirúrgico^{30,31}. Além disso, não pode conter pêlos ou poros que favoreçam incrustações calcáreas ou bacterianas, devendo ainda ser de fácil obtenção para não aumentar a morbidade cirúrgica. Deve também apresentar elasticidade semelhante à da uretra para evitar o turbilhonamento durante o fluxo de urina em seu interior²⁸.

Diferentes tipos de tecidos sintéticos como o silicone, teflon, dacron, moldes de acrílico e polietileno, esponjas de polivinil ou gelatina, politetrafluoretileno (Gore-tex[®]) e *sylastic* já foram utilizados em cirurgias

reconstrutivas da uretra. As vantagens destes materiais estariam relacionadas à facilidade na sua obtenção, sem a necessidade de cicatrizes adicionais com conseqüente diminuição do tempo cirúrgico, além de permitir a confecção de próteses em vários formatos e tamanhos ²⁸. Entretanto, estudos clínicos e experimentais utilizando estes materiais demonstraram taxas de sucesso relativamente baixas devido à ocorrência de reações imunológicas do tipo corpo estranho ^{32,33,34,35,36,37,38,39,40,41} acarretando erosões, fístulas, estenoses, infecções e incrustações ^{42,43,44}.

Gilbaugh ⁴⁵, em 1969, foi o primeiro autor a relatar uso de tubos de silicone como prótese uretral em um estudo experimental em cães. Entretanto, na maioria dos casos, o autor observou a ocorrência de fístulas, estenoses ou extrusão pela luz uretral. Robinette ⁴⁶, em 1973, relatou obstruções devido à incrustação calculosa em 21% das próteses de silicone utilizadas no tratamento de gatos com estenoses uretrais extensas. Vincent ⁴⁷, em 1976, foi o primeiro autor a utilizar implantes de silicone na substituição da uretra peniana em humanos com bons resultados.

O fato de o silicone ser um material não absorvível impede que o mesmo seja incorporado pelo organismo, aumentando assim as chances de extrusão ²⁸. Alguns autores, na tentativa de evitar complicações com a utilização do silicone, propuseram sua associação com outros materiais, tais como o dacron ^{43,48}, ou ainda seu implante prévio no subcutâneo ⁴⁹. Este fato resultaria na epitelização do implante decorrente da proliferação tecidual entre os poros do silicone. No entanto, seus resultados foram controversos ⁴⁹, razão pela qual tais procedimentos foram abandonados.

Outros materiais como o politetrafluoroetileno (PTFE) também foram implantados na uretra como enxertos tubulares ou em ilha. Anwar 42, utilizando este material em forma de ilha na uretra de cães, observou fibrose e estenose na região da anastomose sem epitelização da prótese. Choi 50, em 1989, utilizou o PTFE em seres humanos na substituição parcial da uretra e, após seis meses de segmento, observou extrusão da prótese pela luz uretral.

Kelami 20 e colaboradores, comparando a malha de teflon com a duramáter humana liofilizada na substituição uretral, observaram que a esta última foi completamente absorvida e substituída por um tecido cicatricial, ao contrário do material sintético, minimizando as taxas de complicações.

Estes achados demonstram que os materiais inabsorvíveis, por não serem incorporados ao tecido uretral receptor, apresentam maior risco de extrusão ao longo do tempo quando comparados aos enxertos autólogos 28.

A utilização de tecidos autólogos extra-genitais não usuais como o peritônio associado à fáscia abdominal também foram propostos 51 . Neste caso, os autores observaram que, ao final do primeiro mês, o peritônio havia sido substituído por epitélio uretral, porém em 30% dos coelhos, houve formação de fístulas urinárias.

O emprego de enxertos tubulares de túnica vaginalis como substituto uretral demonstrou resultados desfavoráveis com significativa obstrução à micção, provavelmente causada pela contração das fibras cremastéricas 3,52. Desta forma, seus autores contra-indicaram o uso da túnica vaginalis sob a forma de enxertos tubulares na uretra, recomendando sua utilização apenas sob a forma de enxertos do tipo ilha.

A opção da utilização de tecidos autólogos tais como o uso de segmentos intestinais de íleo, apêndice 53 ou mesmo segmento distal do ureter 54 é pouco vantajosa na prática clínica, uma vez que implicaria em incisões adicionais para sua obtenção e aumentaria de maneira considerável o tempo anestésico e a morbidade cirúrgica 28.

Existem poucos relatos do uso de retalhos de bolsa escrotal na substituição da uretra. Por ser pediculado, o retalho escrotal acarretaria menor retração tecidual, porém teria como desvantagem o crescimento de pêlos no lúmen da uretra com conseqüente incrustação e formação de cálculos. Mokhless 55, na tentativa de evitar essa complicação, propôs a utilização do septo escrotal demonstrando a ocorrência de pêlo intra-uretral em apenas um dos sete casos de hipospádias severas tratados por esta técnica. Portanto, nos casos onde a pele escrotal for a única alternativa disponível, o septo constitui a opção mais indicada.

Neve-Josserand (apud 56), em 1987, foi primeiro autor a reconstruir a uretra masculina utilizando enxerto livre de pele. Os resultados tardios foram insatisfatórios com alta incidência de retração e estenose da neouretra. Burbige 56, em 1984, utilizando enxerto de pele em onze pacientes, observou estenose local em 18% dos casos e fístulas em outros 20%. Em 9% dos pacientes tratados houve retração do enxerto com conseqüente formação de acentuada curvatura peniana.

Além das estenoses e retrações, outra complicação freqüente com enxertos ou retalhos de pele, é a formação de pseudodivertículos ou uretroceles. A presença de urina residual infectada no pseudodivertículo pode facilitar o desenvolvimento de estenoses e cálculos 28.

Para muitos autores, a mucosa vesical seria o material ideal para substituir a uretra. Este tecido estaria bem adaptado à exposição crônica à urina e, por não ser espesso, favoreceria o desenvolvimento de uma irrigação por embebição capilar a partir da uretra normal 28. Memmelar 57, em 1947, foi o primeiro autor a sugerir o seu uso como substituto uretral, porém estudos posteriores (TZ:apud 18) demonstraram resultados desfavoráveis, onde a grande maioria dos pacientes tratados apresentou estenoses e fístulas no pós-operatório. Devido às baixas taxas de sucesso, o enxerto de mucosa vesical não foi considerado uma opção viável, com a maioria dos autores ainda dando preferência à utilização de pele extragenital.

O tratamento proposto para estenoses curtas da uretra anterior menores que oito centímetros tem sido a excisão do segmento acometido e anastomose término-terminal, com excelentes resultados. Em estenoses mais longas da uretra bulbar, as melhores taxas de sucesso foram obtidas com retalhos de pele peniana e enxertos autólogos de mucosa oral 58. Humby 26, em 1941, foi o primeiro a sugerir o uso da mucosa oral no tratamento de lesões da uretra em trabalhos experimentais. Em 1992, Burger e colaboradores 59 relataram as primeiras experiências clínicas com reconstrução uretral empregando-se enxertos de mucosa oral com excelentes resultados. Este fato estimulou outros autores 60,61,62,63 a desenvolverem uma série de novos experimentos, tornando a mucosa oral um dos materiais mais utilizados no reparo de lesões uretrais.

A mucosa bucal é constituída por um epitélio espesso não queratinizado com uma lâmina própria altamente vascularizada e muito fina, a qual facilitaria a embebição do enxerto favorecendo assim, a neovascularização 62,64. Como vantagens em relação aos retalhos de pele genital, a mucosa oral apresenta

resultado estético superior e redução considerável do tempo operatório. Quando comparada à mucosa vesical, o tempo cirúrgico é ainda menor, além da baixa morbidade relacionada à sua obtenção 28.

As taxas globais de sucesso oscilam em torno de 92% no reparo das estenoses da uretra bulbar utilizando enxertos de mucosa 65. Entretanto, na maioria das séries, o tempo de segmento pós-operatório é curto e as técnicas empregadas não estão padronizadas 66,67.

Apesar do alto índice de sucesso utilizando esta técnica, estudos recentes relataram taxas globais de complicações de até 50% 68, sendo maiores com enxertos tubulares (39%) do que com enxertos em ilha (29%). Por outro lado, em um estudo de revisão com 573 pacientes submetidos à uretroplastia com mucosa bucal, Aldrich 67 encontrou uma taxa global de sucesso de apenas 77%.

Outro importante fator a ser considerado, são as complicações descritas no sítio doador tais como os danos causados à submucosa oral e as lesões inadvertidas do ducto parotídeo 69,70,71. Tais situações podem causar limitação na abertura da boca, mioartropatia da articulação têmporo-mandibular e boca seca. A redução do vestíbulo bucal pode resultar em impacto protético desfavorável com necessidade de correção cirúrgica 64.

Desta forma, o tamanho do enxerto obtido a partir da mucosa oral fica limitado a amostras de, no máximo, três centímetros de largura por sete centímetros de comprimento 64. Tal fato é particularmente relevante em pacientes que já foram submetidos a vários procedimentos cirúrgicos e onde não existe outra alternativa que não a mucosa oral.

Embora existam muitas vantagens dos enxertos e retalhos autólogos em relação aos materiais sintéticos 72, a necessidade da abordagem de outro local

para sua retirada pode implicar no aumento do tempo cirúrgico e da morbidade intra-operatória.

Em pacientes multi-operados mesmo os materiais autólogos podem apresentar resultados insatisfatórios se as condições do leito vascular junto ao tecido receptor forem desfavoráveis. A incorporação do enxerto pode resultar em fibrose devido à formação de um complexo vascular ineficaz durante o processo de cicatrização, podendo acarretar estenoses e/ou divertículos uretrais, ou ainda, ocasionar o desenvolvimento de fistula uretrocutânea 73.

Devido à dificuldade em encontrar o material ideal para adequada substituição da uretra, alguns pesquisadores têm proposto a utilização de materiais biodegradáveis capazes de permitir um adequado processo de regeneração uretral com mínima antigenicidade e morbidade 74. Estudos preliminares têm demonstrado que a uretra submetida à ressecção total ou parcial pode ser substituída por tecidos biocompatíveis e biodegradáveis, apresentando regeneração e remodelação a partir do tecido implantado com mínima reação local 75,76 .

A submucosa intestinal suína (SIS) é constituída por uma membrana xenogênica, praticamente acelular, obtida a partir da submucosa do intestino delgado de suínos após remoção mecânica das túnicas mucosa, serosa e muscularis. Isto resulta em uma membrana rica em colágeno, translúcida, com aproximadamente 0,1 milímetro de espessura, que tem apresentado propriedades mecânicas e de resistência à infecção bastante satisfatórias 27. Ela é capaz de estimular a resposta do tecido conectivo e epitelial resultando em regeneração tecidual especializada, evitando assim a formação de tecidos cicatriciais não específicos 77.

Cerca de 90% do deste material é composto por colágeno do tipo I com abundantes fatores de crescimento. Quando utilizado como enxerto, induz uma reação inflamatória tecidual seguida por um processo de neovascularização a partir do tecido receptor que se completa em cerca de três ou quatro semanas ⁷⁸.

Este tipo de membrana pode ser encontrado comercialmente em camada única (Surgisis[®], Cook Biotech[®]) ou em quatro camadas (Stratasis[®], Cook Biotech[®]). Tal material tem sido reportado como seguro e tecnicamente fácil de manusear. Além disso, possui a vantagem de não necessitar incisão adicional para sua obtenção reduzindo assim, de forma considerável, o tempo e a morbidade cirúrgica ⁷⁸. Atualmente, seu uso tem sido largamente proposto em urologia na substituição parcial da bexiga, ureter e uretra ^{77,79,80,81}. Existem apenas dois trabalhos ^{72,82} na literatura comparando SIS com uma e quatro camadas, onde apenas um deles ⁷² trata do emprego de SIS na substituição uretral.

Em 1995 surgiram os primeiros relatos de ampliações vesicais utilizando SIS em estudos experimentais ⁷⁹. Estes autores demonstraram que o SIS fornece suporte ao processo de regeneração tecidual e funcional a partir das extremidades da parede normal da bexiga ⁸³.

Estes estudos constituíram a primeira linha de evidência de que as regiões regeneradas de bexiga, com manutenção de suas propriedades funcionais, poderiam ser obtidas *in vivo* a partir do emprego da tecnologia de engenharia tecidual. Eles também demonstraram que a matriz de colágeno acelular foi mais vantajosa que outros tecidos previamente estudados ^{27,84,85}.

O uso do SIS como enxerto em ilha tem demonstrado resultados promissores no tratamento de defeitos ureterais ^{86,87}, onde o segmento reparado

apresentou completa regeneração de suas camadas tornando-se praticamente indistinguível do ureter normal.

Da mesma forma, alguns estudos têm avaliado o uso do SIS como uma alternativa aos tecidos doadores tradicionais na reconstrução uretral 72,73,88,89,90. Kroop 73, em 1998, foi o primeiro a descrever o uso do SIS para corrigir defeitos causados na uretra de coelhos com excelentes resultados. Neste caso, os enxertos de SIS foram comparados com pele prepucial e sutura primária da uretra. No grupo tratado com SIS, nenhum animal apresentou divertículo, enquanto que todos os coelhos tratados com enxerto de pele prepucial apresentaram algum grau de dilatação uretral. Histologicamente, a uretra regenerada a partir do enxerto de SIS exibia um epitélio bem diferenciado, células musculares esparsas e abundante tecido conectivo rico em colágeno.

Em 2001, Grossklaus 90 avaliou as alterações histológicas induzidas pelo enxerto de SIS em ilha na reconstrução parcial da uretra de coelhos. A histologia revelou desenvolvimento de uma reação do tipo corpo estranho com infiltrado inflamatório linfocitário e células gigantes no local do implante, sem evidências do enxerto primitivo ao final de seis semanas. Nenhum dos animais apresentou fístulas uretro-cutâneas. Rotariu 89, utilizando enxertos semi-tubulares de SIS para reconstrução de defeitos de 2,5 centímetros na uretra de coelhos, observou estenose em apenas 14% dos casos. A análise histológica demonstrou completa regeneração da parede uretral e 15% dos animais apresentaram fístula urinária.

Nuininga, em 2003 72, realizou estudo em coelhos comparando SIS em camada única e com quatro camadas a um terceiro tipo de membrana colágena obtida a partir do tendão bovino. Neste estudo o autor observou que nenhum dos animais apresentou estenose e apenas um coelho do grupo com SIS em quatro

camadas (16,6%) desenvolveu fístula ao final de nove meses de seguimento. As avaliações histológica e imuno-histoquímica demonstraram que a regeneração das células musculares foi comparável entre os três tipos de materiais estudados. Nuinga não encontrou fibras musculares lisas no local do enxerto ao final de nove meses de segmento, contrapondo os resultados obtidos por outros autores 73,88. Este estudo demonstrou que os resultados obtidos com a membrana derivada do tendão bovino eram comparáveis ao SIS em camada única.

Recentemente, El-Assmy 91 apresentou seus resultados com uso do SIS comparando enxertos tubulares e em ilha. Após três meses de segmento, todos os animais com enxerto tubular apresentaram dificuldade miccional com 45% deles evoluindo para retenção urinária. A uretrografia de controle não evidenciou alterações nos animais tratados com enxertos em ilha, porém graus variados de estenose da uretra foram observados com implantes tubulares de SIS e obstrução completa em 44% dos casos.

Um estudo semelhante 92 comparou enxertos em ilha e implantes tubulares de SIS com anastomose término-terminal na reconstrução uretral em coelhos. Após seis semanas da cirurgia, em ambos os grupos tratados com SIS, observou-se regeneração urotelial com presença de células musculares lisas esparsas. Entretanto, um infiltrado inflamatório mais intenso foi observado em torno dos implantes tubulares quando comparado aos enxertos em forma de ilha. Após doze semanas de segmento o tecido neoformado era semelhante à uretra com mínima evidência da matriz colágena. Em contraste, a maioria dos animais submetidos à reconstrução primária da uretra apresentou estenose com abundante formação de tecido fibrótico cicatricial.

A síntese e o acúmulo de colágeno estão aumentados em diferentes patologias onde ocorre desenvolvimento de reação fibrótica cicatricial 93,94,95,96. Geralmente é aceito que a síntese de colágeno tipo III predomina em estágios mais precoces enquanto que, em estágios mais tardios, ocorre predomínio do colágeno tipo I. De acordo com alguns autores, na estenose da uretra, a principal alteração do metabolismo do colágeno seria a diminuição da relação colágeno tipo III : I ⁹⁷.

Resultados com emprego de SIS em seres humanos foram apresentados por Mantovani ⁸⁹, em 2002, avaliando pacientes submetidos à cirurgia para tratamento de estenoses extensas. A manutenção do lúmen uretral foi confirmada por via endoscópica aos dois e 6 meses após a cirurgia, avaliações radiológica e urodinâmica demonstraram resultados satisfatórios em todos os pacientes estudados.

Conforme demonstrado, diferentes autores observaram bons resultados com a utilização do SIS na reconstrução dos defeitos parciais da uretra. Entretanto, não observamos nenhum estudo comparando seus resultados à mucosa oral deixando clara a necessidade de estudos prospectivos e randomizados que possam evidenciar as potenciais vantagens e desvantagens da utilização destes materiais na cirurgia reconstrutora da uretra.

O presente estudo tem como objetivo avaliar as alterações histopatológicas e quantitativas do colágeno, assim como as complicações pós-operatórias em estudo comparativo entre a matriz de colágeno acelular em uma ou quatro camadas e mucosa oral na substituição parcial da uretra de coelhos.

1. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados 36 coelhos machos da raça *North Folk*, com peso variando entre 3,2 e 4,7kg (média de 3,7kg) fornecidos pelo Biotério Central ao Laboratório Experimental do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Previamente ao início do experimento, os animais foram mantidos por uma semana no Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Urologia para adaptação ao novo ambiente e detecção de possíveis problemas clínicos. Permaneceram em gaiolas individuais com 55 x 55 x 60 centímetros com temperatura ambiente controlada em torno de 24°C e iluminação natural.

Os animais foram alimentados com ração Nutricoeelhos^A e água “*ad libitum*”. No dia anterior à intervenção cirúrgica os animais foram mantidos em jejum de 12 horas. A dieta foi reintroduzida no primeiro dia de pós-operatório.

^A Produzida pela Purina® Nutrimentos Ltda.

2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos por sorteio em 3 grupos, sendo cada um composto por 12 coelhos.

2.1. GRUPO I: MATRIZ DE COLÁGENO ACELULAR (MCA) EM CAMADA ÚNICA

Este grupo foi constituído pelos animais que tiveram parte de sua uretra substituída por MCA em camada única.

2.2. GRUPO II: MATRIZ DE COLÁGENO ACELULAR (MCA) EM QUATRO CAMADAS

Este grupo foi constituído pelos animais que tiveram parte de sua uretra substituída por MCA com quatro camadas.

2.3. GRUPO III: MUCOSA ORAL

Este grupo foi constituído pelos animais que tiveram parte de sua uretra substituída por mucosa oral.

3. TÉCNICA CIRÚRGICA DE SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DA URETRA

3.1. ANESTESIA

Os animais receberam como medicação pré-anestésica Diazepam^A em solução salina a 0,1% por via intravenosa (Diazepam 10 mg + 8 ml de NaCl 0,9%), na dose de 1 mg/kg. A seguir, utilizou-se Rompum^B e Ketalar^C em partes iguais 0,25ml/kg/peso por via intramuscular. Caso houvesse necessidade de complementação anestésica durante o procedimento cirúrgico, a mesma medicação era repetida de acordo com a dose calculada inicialmente.

3.2. PREPARO DA MATRIZ DE COLÁGENO ACELULAR INTESTINAL SUÍNA

A matriz de colágeno acelular utilizada neste estudo foi fornecida pela Cook Urological[®] em uma ou quatro camadas. Apresenta-se sob a forma de uma delgada membrana medindo 20 centímetros de comprimento por 10 centímetros de largura com menos de 1 milímetro de espessura. Este material foi seccionado em forma elipsóide medindo 1 centímetro de comprimento por meio centímetro de largura (Figura 1-A). Previamente ao seu implante cirúrgico, a membrana foi hidratada em solução salina 0,9% estéril durante 5 minutos (Figura 1-B).

^A Diazepam 5mg/ml - ampola de 2 ml: Produzido pela União Química[®]

^B Cloridrato de Xilidina – diidro-tiazina, fabricado pela Bayer[®]

^C Cloridrato de Ketamina, fabricado pela Parke-Davis[®]



FIGURA 1-A: Ilustração do enxerto de matriz de colágeno acelular na forma elíptica.

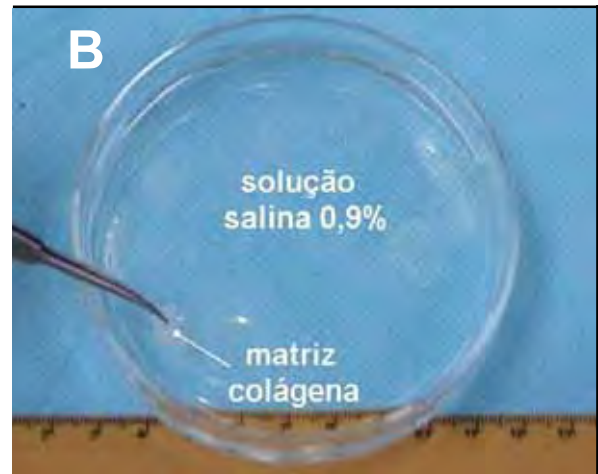


FIGURA 1-B: Hidratação da matriz de colágeno acelular em solução fisiológica 0,9%.

3.3. PREPARO DO ENXERTO DE MUCOSA ORAL

Após o animal ter sido anestesiado e posicionado em goteira de Claude-Bernard, realizou-se assepsia da cavidade oral com Iodopolvidine^A, utilizando-se campo oftalmológico estéril para delimitação da área cirúrgica. Para facilitar a apresentação e a retirada da mucosa oral, dois pontos de fio de mononáilon 4.0 vascular^B foram utilizados na transição entre a pele e a mucosa oral do lábio superior esquerdo (Figura 2-A). Com auxílio do bisturi lâmina 15, um segmento de mucosa oral de forma retangular, medindo cerca de 10 milímetros de comprimento por 5 milímetros largura, foi retirado da cavidade oral do coelho junto à maxila superior (Figura 2-B). Este fragmento foi então imerso em solução fisiológica 0,9% estéril removendo-se todo tecido gorduroso com auxílio de material microcirúrgico e lupa da marca Heine[®] com aumento de 3,5 vezes. Em

^A Povidine Iodine (PVPI), 10% iodo ativo, fabricado pela Made Care[®] – produtos hospitalares Ltda.

^B Mononylon 4.0 – monofilamentar: produzido pela Ethicon[®]

seguida, as bordas da incisão da cavidade oral foram aproximadas com pontos simples de catégute cromado 4.0^A.

O fragmento de mucosa oral permaneceu imerso em solução salina estéril até o momento de seu implante na uretra.



Figura 2-A: Pontos de apresentação com fio de mononáilon 4.0 vascular na transição entre a pele e a mucosa oral do lábio superior esquerdo.



FIGURA 2-B: Delimitação da mucosa oral de em forma retangular com de 10 mm de comprimento por 5 mm largura junto à maxila superior.

3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após anestesia, os animais foram posicionados em goteira de Claude-Bernard, em decúbito dorsal, com os quatro membros imobilizados com fios de algodão. Foi realizada tricotomia da região abdominal e genital e, em seguida, anti-sepsia com Iodopolvidine^B, utilizando-se campo oftálmico estéril para delimitação da área cirúrgica de interesse.

^A Fio Catcromo 4.0 – catgut cromado: produzido pela Ethicon®

^B Povidine Iodine (PVPI), 10% iodo ativo, fabricado pela Made Care® – produtos hospitalares Ltda.

Procedeu-se à apresentação do pênis do coelho com um ponto de reparo de mononáilon 4.0 vascular^A passado na sua extremidade distal. A seguir, uma sonda uretral tipo Foley^B 10 Fr foi introduzida na uretra após adequada lubrificação com xilocaína gel 2%^C.

A pele e o tecido subcutâneo foram incisados longitudinalmente com bisturi imediatamente na porção ventral do pênis e os planos dissecados até a adequada exposição da uretra (Figura 3-A). Neste momento utilizamos um afastador oftálmico palpebral para adequada apresentação dos corpos cavernosos a fim de evitar lesão inadvertida dos mesmos. (Figura 3-B).



FIGURA 3-A: Incisão longitudinal na porção ventral do pênis com bisturi frio cerca de 1,5 cm do meato uretral.

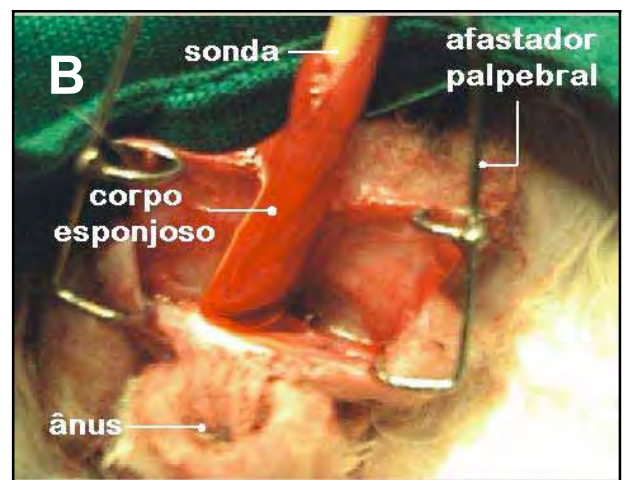


FIGURA 3-B: Afastador oftálmico palpebral auxiliando na adequada apresentação da uretra.

A uretra anterior foi identificada e incisada longitudinalmente na sua face ventral com auxílio de tesoura de microcirurgia distando cerca de quinze milímetros do meato uretral. Realizada remoção de um fragmento elipsóide da

^A Mononylon 4.0 – monofilamentar: produzido pela Ethicon®

^B Sonda de látex e silicone 10 F: fabricado pela Rusch® da Malásia

^C Cloridrato de Lidocaína 2% estéril: produzido pelo Laboratório Cristália

uretra de dimensões aproximadas de 10 milímetros de comprimento por 5 milímetros de largura (Figura 4-A)

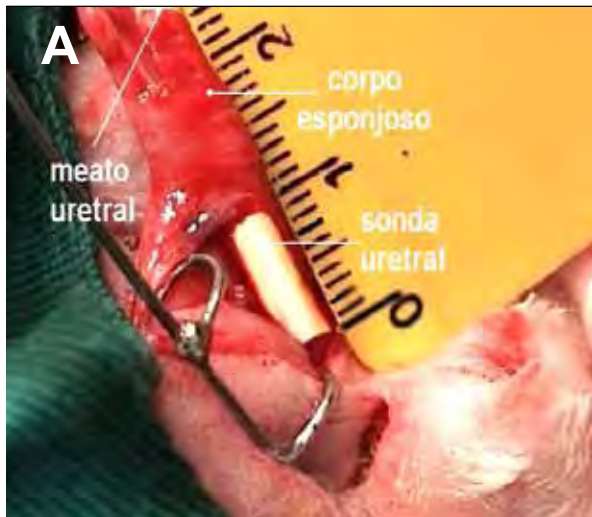


FIGURA 4-A: Remoção de fragmento da parede uretral de 10 mm de comprimento por 5mm de largura.

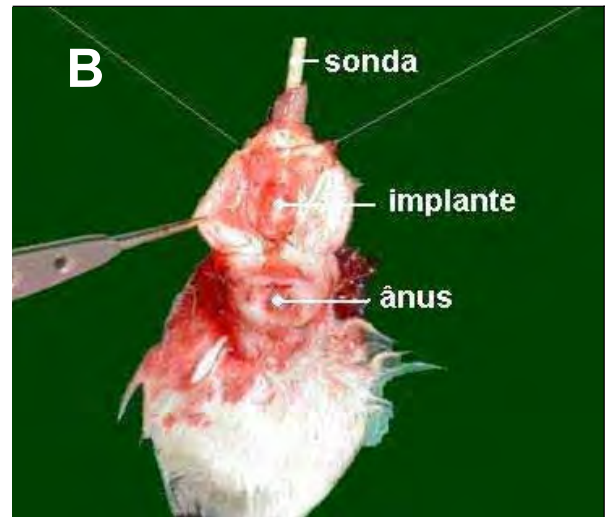


FIGURA 4-B: Aspecto final da uretra após sutura do enxerto.

Nos animais do Grupo I foi utilizado enxerto com MCA em camada única, no grupo II MCA com quatro camadas e, no grupo III, mucosa oral. Após a escolha do enxerto a ser utilizado, este foi fixado ao defeito uretral utilizando-se quatro pontos separados de poliglactina 7.0^A. Em seguida, foi realizada sutura contínua do enxerto à borda uretral com auxílio de lupa com aumento de 3,5 vezes (Figura 4-B).

Quatro pontos separados de polipropileno 5.0^B foram passados a fim de facilitar o reconhecimento dos limites entre o enxerto e uretra normal no momento do sacrifício (Figura 5-A e B).

^A Poliglactina violeta trançada: Vicryl 7-0, fabricado pela Ethicon®

^B Prolene 5.0 cardiovascular – polipropileno azul monofilamentar 5.0: produzido pela Ethicon®

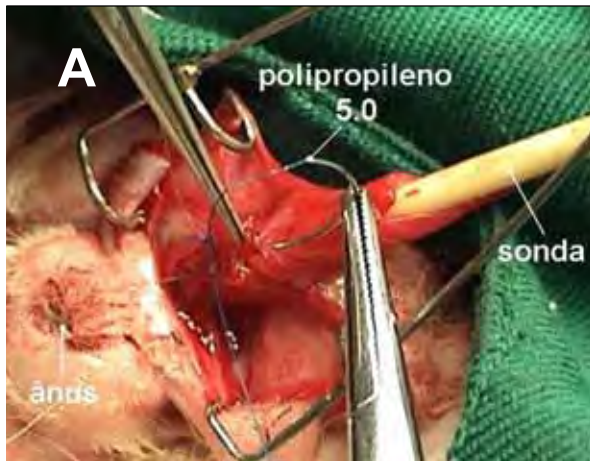


FIGURA 5-A: Passagem dos pontos para demarcação dos limites do enxerto com prolene 5.0.

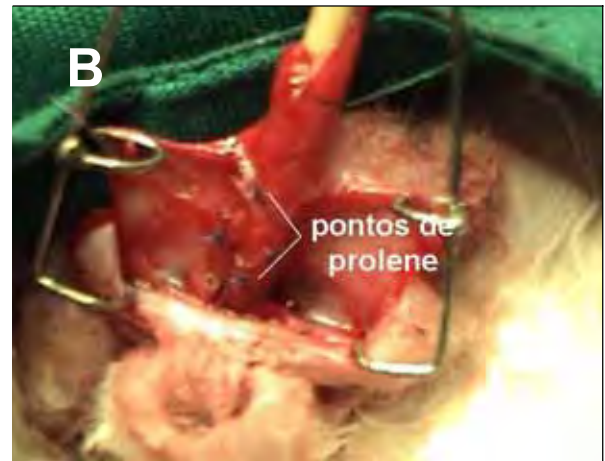


FIGURA 5-B: Aspecto final após demarcação com quatro pontos de prolene 5.0.

Ao término da cirurgia o animal foi colocado em ambiente aquecido até a recuperação anestésica. Nenhum dos animais foi mantido com derivação urinária no pós-operatório.

3.5. TERAPÊUTICA PROFILÁTICA ANTI-MICROBIANA NO PÓS-OPERATÓRIO

Após a realização da cirurgia, todos os animais receberam Enrofloxacina^A na dose de 5 mg/kg de peso /dia, por via intramuscular, até o quinto dia de pós-operatório como antibiótico profilático.

^A Flotril 10% produzido pelo Laboratório Shering-Plough®

4. SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Foram efetuados os seguintes exames em todos os animais após o período de ambientação: medida do peso corporal, cultura de urina e uretrografia retrógrada.

Estes procedimentos foram realizados em dois momentos distintos: momento inicial (M0), pré-operatório e momento final (M1), 12 semanas após o procedimento cirúrgico. Antes da cirurgia (M0) foi realizado o sorteio a fim de se determinar o procedimento cirúrgico adequado para cada animal.

Após 12 semanas do momento M0 foram obtidos os dados experimentais referentes ao momento M1 e, a seguir, os animais foram sacrificados com dose letal de Pentobarbital^A por via intravenosa. Imediatamente após, foi realizada a necropsia com remoção do pênis em bloco e abertura longitudinal da superfície dorsal da uretra para estudos anátomopatológico e histomorfométrico da área do enxerto. Foram efetuadas fotografias para registro de cada uma das peças cirúrgicas.

^A Solução de pentobarbital sódico a 3%: produzido pela Cristália®

5.0. PARÂMETROS ESTUDADOS

5.1. PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram pesados em jejum em dois momentos distintos: no início do experimento (Momento M0) e no dia do sacrifício (Momento M1). A pesagem foi realizada com balança digital da marca Filizola[®] e os valores expressos em gramas (g).

5.2. COLETA DE URINA

As amostras de urina obtidas de cada animal nos diferentes momentos M0 (antes do procedimento cirúrgico) e imediatamente antes do sacrifício (M1) foram encaminhadas ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Medicina da Unesp.

Após a anestesia o animal foi posicionado em goteira de Claude-Bernard sendo realizada assepsia com Iodopolvidine^A e colocação de campo oftálmico estéril. Em seguida, um cateter tipo Foley 10 Fr^B foi introduzido pela uretra até a bexiga sendo coletada amostra de urina em tubo de ensaio estéril (Figuras 6-A e B). Este, após ser identificado com o número e grupo do animal correspondente, foi encaminhado ao laboratório de microbiologia para exame de cultura.

Utilizando-se o método de diluição qualitativa, as amostras foram semeadas em placa de Petri nos meios Hagar Mackonkey e Hagar Sangue, realizando-se a identificação do germe por método bioquímico habitual^{98,99}.

^A Povidine Iodine (PVPI), 10% iodo ativo, fabricado pela Made Care[®] – produtos hospitalares Ltda.

^B Sonda de látex e silicone 10 F: fabricado pela Rusch[®] da Malásia



FIGURA 6-A: Sondagem uretral com cateter de Foley 10 F.



Figura 6-B: Coleta de urina para exame microbiológico.

5.3. TÉCNICA DE URETROGRAFIA

Os exames de uretrografia foram realizados em dois momentos distintos: no início do experimento (momento M0) e imediatamente antes do sacrifício (momento M1).

Após anestesia, conforme descrito anteriormente, os animais foram transportados até a sala de exame radiológico. Para registro das imagens foi utilizado aparelho portátil de raio X (RX ITL-50-E Tamossimo) sendo o chassi mantido a distância fixa de 60 centímetros da ampola do gerador. Os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre o chassi utilizando-se 65 kilovolts (kV) de intensidade durante o tempo de exposição de 0,3 segundos (Figura 7).

As imagens uretrais foram obtidas após injeção retrógrada na uretra de 20 mililitros de contraste^A dissolvido em partes iguais com solução salina 0.9%.

^A Pielograf Darrow – Diatrizoato de Meglumina 76% - produzido pelo laboratório Schering[®] do Brasil

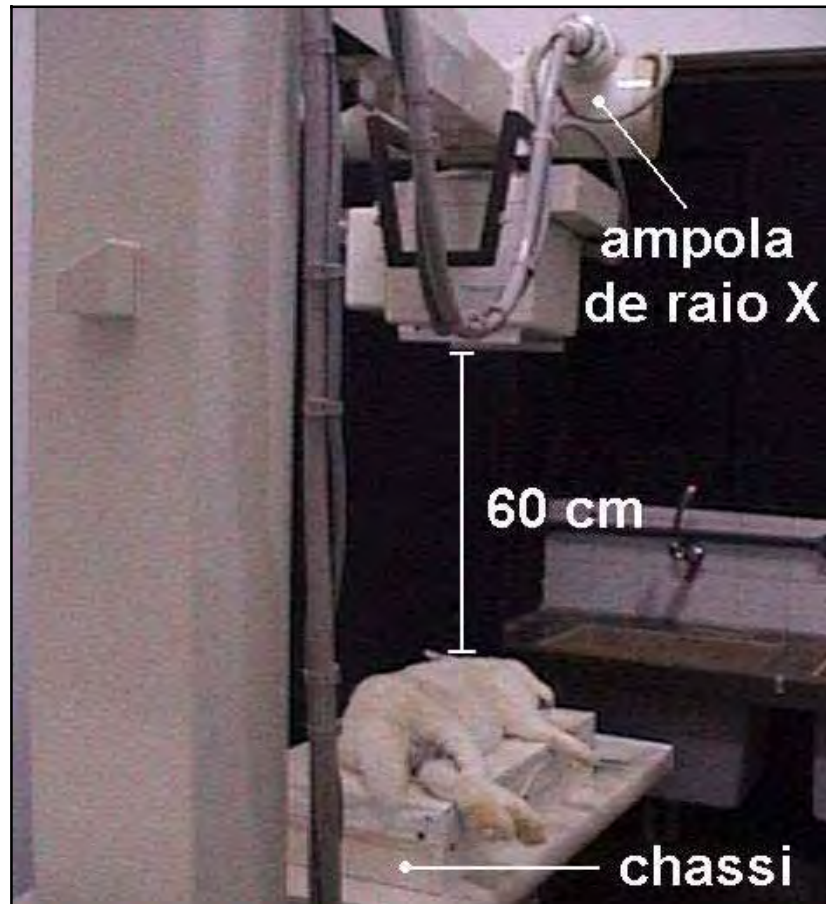


FIGURA 7: Técnica para realização de uretrografia com animal mantido a uma distância focal de 60 cm da ampola de RX.

Com objetivo de evitar distorções na imagem uretral devido à excessiva pressão, a injeção de contraste foi realizada utilizando-se uma sonda uretral plástica 10 Fr^A previamente fixada à extremidade distal da uretra com fio de náilon 4.0^B. A velocidade de infusão aproximada foi de cinco mililitros por segundo.

Para interpretação dos achados radiológicos foram avaliadas a presença de extravasamento de contraste bem como as alterações da área da uretra no local do implante em dois momento distintos M0 e M1. Os diâmetros uretrais

^A Sonda plástica descartável siliconizada número 10 – produzida pela Embramed[®] do Brasil.

^B Mononylon 4.0 – monofilamentar: produzido pela Ethicon[®]

foram obtidos utilizando-se uma régua com escala graduada em milímetros, sendo a primeira medida (b) realizada a um centímetro e meio do meato uretral e a segunda (B), a uma distância fixa de dez milímetros, que correspondia á extensão do enxerto (h) (Figuras 8-A e B). O cálculo da área da uretra foi realizado pela fórmula do trapézio, conforme demonstrado abaixo

$$A_{\text{trapézio}} = \frac{(B + b) \cdot h}{2}$$

Onde: B: maior diâmetro da uretra;

b: menor diâmetro da uretra;

h: tamanho do enxerto (10 milímetros)



FIGURA 8-A: Uretrografia realizada no animal 2 do grupo I demonstrando a medida do diâmetro uretral para cálculo da área inicial (Momento M0).

FIGURA 8-B: Uretrografia do mesmo animal antes do sacrifício (Momento M1): cálculo da área da uretra pela fórmula do trapézio.

5.4. SACRIFÍCIO E AVALIAÇÃO DO ENXERTO URETRAL

Após doze semanas a partir da data do implante do enxerto uretral (Momento M1), os animais foram sacrificados com dose letal de Pentobarbital sódico^A por via endovenosa. A seguir, procedeu-se a dissecação e remoção do pênis em bloco. (Figura 9-A). A seguir, procedeu-se à abertura do leito uretral em sua porção dorsal com tesoura de Metzembaum para adequada exposição do enxerto (Figura 9-B).

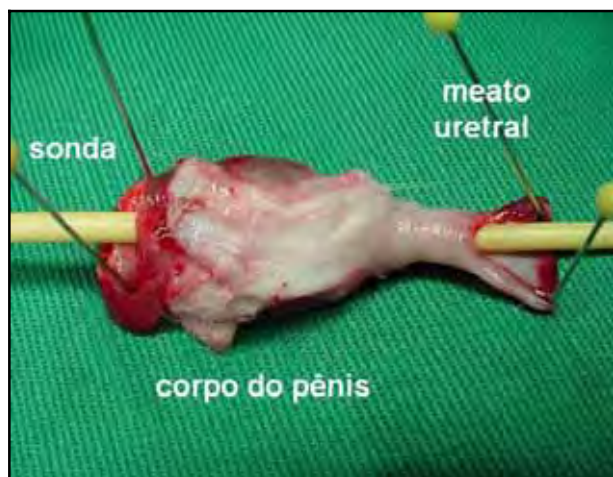


FIGURA 9-A: Remoção do pênis em bloco.



FIGURA 9-B: Abertura longitudinal da uretra e exposição da área do enxerto.

Após serem devidamente fotografadas (Figura 10-A), as peças foram fixadas em pranchetas de papelão com auxílio de alfinetes (Figura 10-B) e conservadas em solução de formaldeído a 10% por duas semanas sendo posteriormente transferidas para frasco com álcool 70% até o momento de avaliação. Findo este período, procedeu-se à secção transversal da uretra junto à área de interesse utilizando-se lâmina de aço inoxidável para retirada do tecido

^A Solução de pentobarbital sódico a 3%: produzido pela Cristália®

uretral adjacente. O fragmento obtido foi enviado para avaliação histológica e inclusão em blocos de parafina.



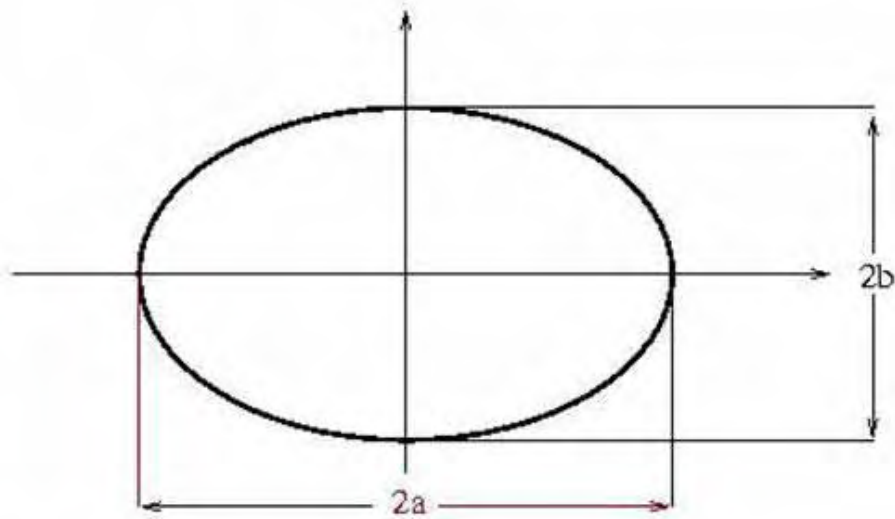
Figura 10-A: Imagem digitalizada da uretra do animal 8 do Grupo I.



FIGURA 10-B: Fixação das peças em prancheta de papel tipo cartão.

5.4.1. DETERMINAÇÃO MATEMÁTICA DA ÁREA DO ENXERTO

No momento M0, imediatamente antes do implante, os enxertos de matriz acelular e de mucosa oral foram hidratados em solução salina 0,9% estéril e fixados sobre uma placa de papel tipo cartão (Figura 10-B). Suas medidas foram então aferidas com auxílio de régua graduada em milímetros. O comprimento foi considerado o diâmetro longitudinal (2a) e a largura a medida transversal (2b). A área do enxerto (A) foi calculada pelo emprego da fórmula da área da elipse, ou seja:



Onde:

$$A = \pi ab$$

No momento M1, com a peça a fresco, procedeu-se à abertura longitudinal da uretra conforme a técnica descrita. Todas as medidas correspondentes à área do enxerto foram novamente aferidas seguindo-se rigorosamente a mesma metodologia descrita anteriormente.

5.4.2. DETERMINAÇÃO COMPUTADORIZADA DA ÁREA DO ENXERTO.

Após a abertura longitudinal da uretra, esta foi estendida sobre uma placa de vidro e identificada com o número do animal e seu respectivo grupo. Com auxílio de uma câmera fotográfica digital (Sony® DCR-TRV 240) todas as amostras foram fotografadas com uma distância focal fixa padronizada em 2,5 centímetros. A câmera foi acoplada a um suporte fim de permitir completa imobilidade (Figura 11).



Figura 11: Sistema de digitalização de imagem utilizado: câmera fotográfica digital Sony® com distância focal padronizada de 2,5 centímetros.

A seguir, as imagens foram inseridas no computador e analisadas por um *software* específico - Scion Image® - capaz de calcular automaticamente a área de uma figura irregular previamente demarcada. Após demarcação das bordas do enxerto com ferramenta específica, os dados foram automaticamente processados e calculados e a área final foi fornecida em milímetros quadrados (Figura 12-A).

A porcentagem de retração foi calculada subtraindo-se a área obtida após o sacrifício da área do enxerto original (Figura 12-B).



Figura 12-A: Demarcação e cálculo da área inicial do SIS com 4 camadas pelo *software* Scion Image® a partir da foto digitalizada.

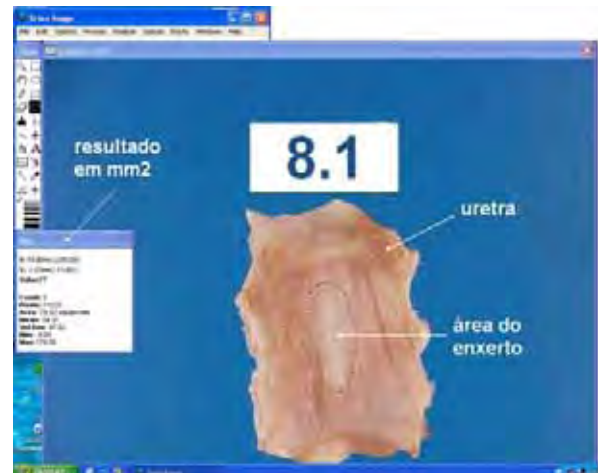


Figura 12-B: Demarcação e cálculo da área do enxerto pelo *software* Scion Image® a partir da foto digitalizada da uretra.

5.4.3 ANATOMIA PATOLÓGICA

Os fragmentos uretrais foram processados em bloco de parafina no Laboratório de Histologia da Cirurgia Experimental do Departamento de Urologia e corados com Hematoxilina / Eosina (HE) de acordo com a técnica habitual. Todas as lâminas foram avaliadas por um patologista experiente pertencente ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina - Unesp. O observador não possuía conhecimento prévio sobre que animal estava sendo avaliado nem o grupo ao qual o mesmo pertencia.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: intensidades do processo inflamatório e da fibrose tecidual e a qualidade da regeneração do epitélio uretral e da neovascularização. Esta metodologia objetiva o estudo histológico do comportamento do enxerto em relação à uretra normal, avaliando-se a formação de tecido fibrótico cicatricial no local do implante, a intensidade da resposta

inflamatória do hospedeiro ao enxerto e sua capacidade de induzir a regeneração vascular e do epitélio uretral.

Estas alterações foram classificadas como leves (1), moderadas (2) ou intensas (3) de acordo com suas características quando comparadas ao tecido circunvizinho normal. Assim, com relação ao epitélio uretral, a presença de uma camada celular recobrendo o enxerto foi considerada como regeneração leve, duas camadas celulares como moderada e o epitélio composto por três camadas celulares distintas foi considerado normal (Figuras 13-A,B e C).



**FIGURA13-A: Regeneração epitelial leve*: animal 4 do Grupo I.
*aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E.**



FIGURA 13-B: Regeneração epitelial moderada*: animal 9 do Grupo II.
*aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E.



FIGURA13-C: Regeneração epitelial intensa*: animal 11 do Grupo I.
*aumento de 40 vezes, coloração pelo H.E.

A neovascularização foi avaliada levando-se em consideração a presença de vasos neo-formados abaixo da superfície do enxerto. A ocorrência de até três vasos por campo microscópico ao aumento de 20 vezes foi considerada como leve, 4 ou 5 vasos moderada e, acima de 5 vasos neoformados por campo, neovascularização intensa (Figuras 14-A,B e C).



FIGURA 14-A: Regeneração vascular leve*: animal 9 do Grupo I.
*aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.



FIGURA 14-B: Regeneração vascular moderada*: animal 4 do Grupo III.
*aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.

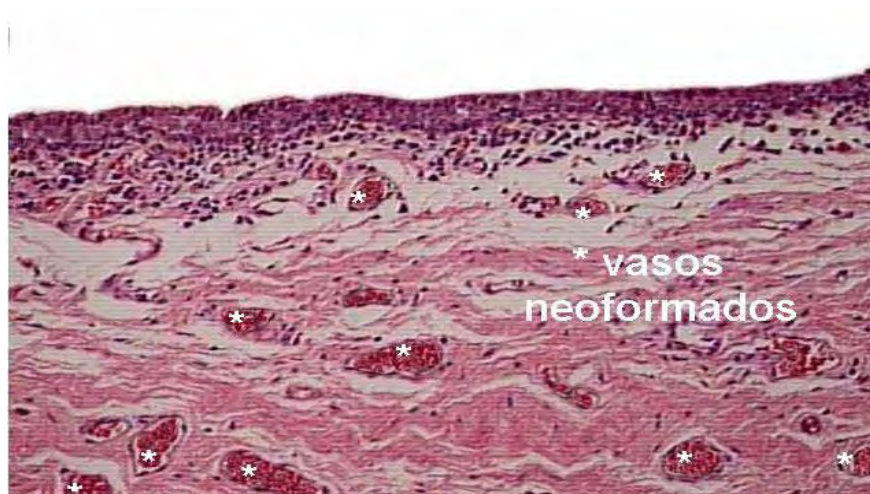


FIGURA 14-C: Regeneração vascular intensa*: animal 11 do Grupo I.
*aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.

A intensidade da fibrose bem como do infiltrado inflamatório foi avaliada de forma subjetiva pelo patologista, sendo esta estimada aproximadamente em função da área ocupada na lâmina ao aumento de 20 vezes (Figuras 15-A,B,C e D)



FIGURA 15-A: Infiltrado inflamatório leve*: animal 10 do Grupo I.
* aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.



FIGURA 15-B: Infiltrado inflamatório intenso*: animal 3 do Grupo I.
*aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.



FIGURA 15-C: Reação fibrótica intensa na área do enxerto*: animal 8 do grupo I. *aumento de 10 vezes, coloração pelo H.E.



FIGURA 15-D: Reação fibrótica leve na área do enxerto*: animal 4 do grupo III. *aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E.

Segmentos de mucosa oral isolada, bem como de SIS em uma ou quatro camadas foram processados com as mesmas técnicas histológicas para avaliação da interferência da manipulação cirúrgica sobre o produto industrializado ou nos tecidos primitivos (Figuras 16-A e B).

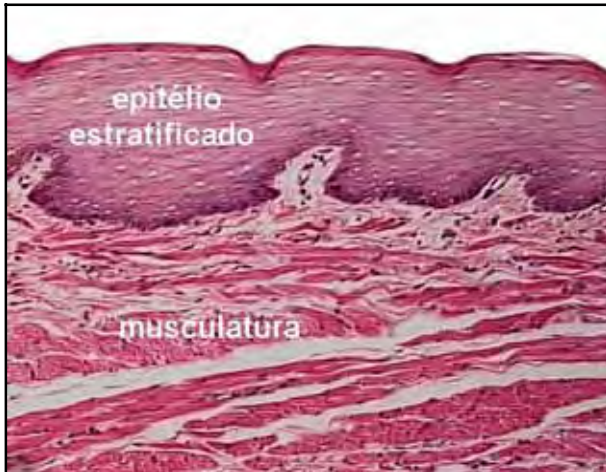


FIGURA 16-A: Enxerto de mucosa bucal (coloração pelo HE, aumento de 20 vezes).

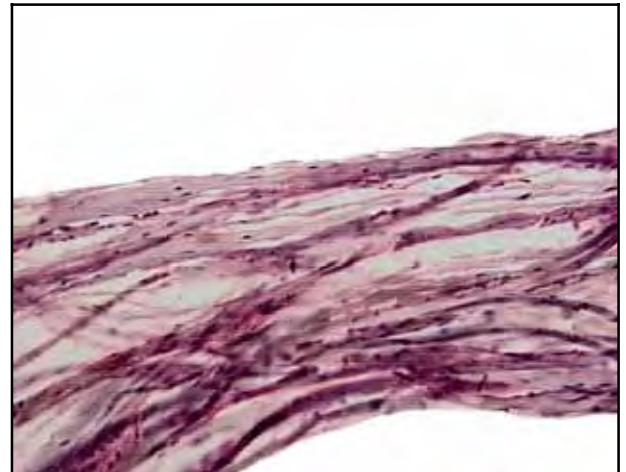


FIGURA 16-B: Enxerto de SIS em quatro camadas (coloração pelo HE, aumento 20 vezes).

5.4.4. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DOS ENXERTOS

Objetivando-se a diferenciação dos dois tipos específicos de colágeno predominantes no local do implante (Tipo I e Tipo III) foi realizada uma segunda técnica de coloração dos fragmentos pelo *Picrosirius red*. Segmentos longitudinais de uretra preparados em blocos de parafina foram cortados e corados permitindo a diferenciação do tipo de fibra colágena presente em cada fragmento histológico de modo quantitativo.

As lâminas coradas pela técnica em questão foram avaliadas empregando-se um microscópio óptico com luz polarizada Leica® modelo DMLB (Figura 17-A), onde a intensidade da luz bem como posição dos filtros não foi alterada durante a leitura ou a transição das lâminas.



FIGURA 17-A: Microscópio Leica® de luz polarizada com câmera de captura Sony®.

FIGURA 17-B: Sistema de captura utilizado no processamento de imagens.

Cada lâmina foi fotografada em aumento de 10 vezes sendo escolhidos quatro campos aleatórios na região do enxerto. As 144 imagens digitalizadas foram inseridas em um software de captura de imagens Leica® Image instalado em um microcomputador Pentium III® com processador Celeron® 300 MHz (Figura 17-B). Tais imagens foram analisadas individualmente utilizando o programa de morfometria Pro-Image Plus® (Figuras 18-A e B).

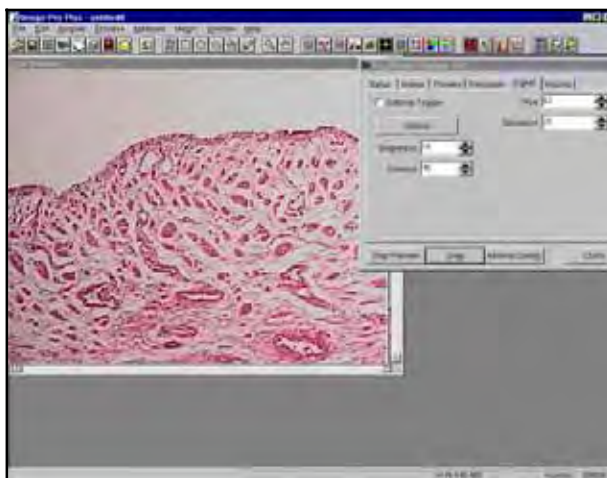


FIGURA 18-A: Software de captura de imagens Pro Image Plus®.

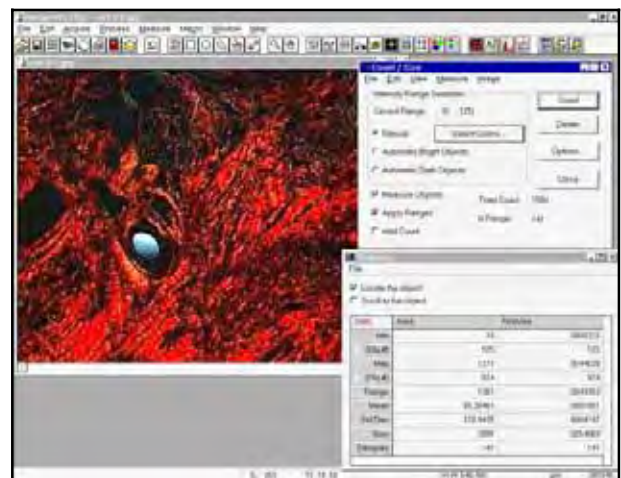


FIGURA 18-B: Determinação da área ocupada pelo colágeno tipo III.

Esta leitura tinha como base a quantificação do colágeno a partir da sua coloração na foto digitalizada obtida diretamente do microscópio de luz polarizada. Neste caso, o colágeno tipo I foi corado em verde e o colágeno tipo III foi distinguido por sua tonalidade avermelhada (Figura 19-A e B).

Uma vez delimitado o padrão de cor para cada tipo de colágeno, o programa é capaz de diferenciá-los automaticamente permitindo a leitura total da área de interesse e expressando o seu resultado individualmente em micrômetro quadrados. A área total ocupada por cada subtipo de colágeno foi então comparada entre os diferentes grupos experimentais e entre os animais de um mesmo grupo. Foi estabelecido um índice obtido a partir da divisão matemática da área do colágeno do tipo III em relação ao tipo I.

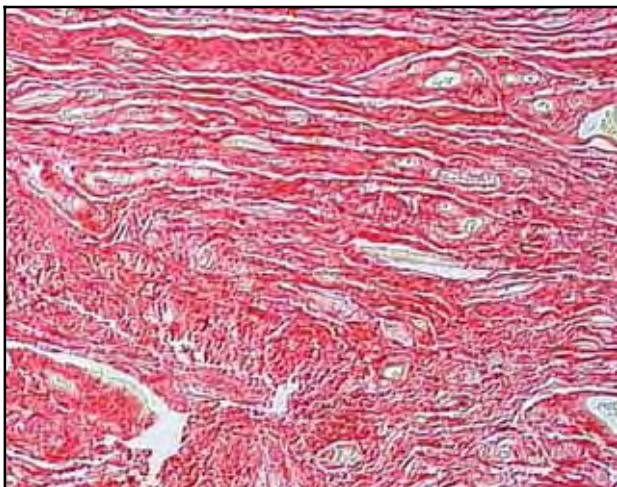


FIGURA 19-A: Corte uretral pela coloração Picrosirius red, aumento de 10 vezes: não é possível distinguir os diferentes tipos de colágeno.



FIGURA 19-B: Mesmo corte após o posicionamento adequado dos filtros de luz polarizada: colágeno tipo I corado em verde e Tipo III em vermelho.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística das variáveis quantitativas como peso, diâmetro e área do enxerto utilizou-se o teste T de Student ¹⁰⁰. Para as variáveis qualitativas nominais como cultura de urina, utilizou-se o teste de Fischer. A averiguação de associação entre os diferentes métodos de cálculo da área uretral foi obtida a partir do coeficiente de correlação de Pearson. Para comparação dos grupos segundo as medidas da área uretral foi utilizada a análise de perfil para grupos independentes (medidas repetidas). A determinação de significância dos parâmetros histológicos bem como a análise histomorfométrica do colágeno segundo os diferentes grupos de estudo foi realizada pela análise de variância não paramétrica de Kruskal-Walles ¹⁰¹.

As tabelas de dupla entrada das proporções de respostas foram configuradas contendo nas linhas a distribuição multinominal dos grupos e nas colunas as categorias de resposta variável. Para indicação de significância das comparações utilizaram-se letras minúsculas nos contrastes entre os grupos. Proporções de uma mesma letra minúscula numa categoria de resposta referenciada não diferem na comparação dos grupos ($p > 0,05$).

A análise estatística foi realizada com nível de significância de 0,05%.

7. ASPECTOS ÉTICOS

Antes do início das atividades experimentais, o presente estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, protocolado junto às normas desta instituição, recebendo parecer favorável à sua execução (Vide anexo).

RESULTADOS

Não foi observada nenhuma morte nos animais durante o período do experimento. Apenas um animal pertencente ao grupo I apresentou infecção no testículo esquerdo, que foi tratada clinicamente com antibióticoterapia à base de Enrofloxacina nas doses anteriormente descritas, por 10 dias.

1. PESO CORPÓREO

1.1. DADOS INDIVIDUAIS DO PESO CORPÓREO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vide Tabela 1 do apêndice.

1.2. ANÁLISE DO PESO CORPÓREO

A análise do ganho de peso não demonstrou diferença entre os grupos em relação aos momentos de avaliação: início do experimento (M0) e momento final (M1), demonstrando a homogeneidade entre os grupos. Todos os animais exibiram ganho de peso significativo durante o período de seguimento, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado da média e desvio padrão da variável peso (em gramas) nos três grupos de estudo segundo os diferentes momentos de observação.

GRUPO	MOMENTO DE AVALIAÇÃO	
	INICIAL (M0)	SACRIFÍCIO (M1)
G I	2795,00±667,77 aA	3508,33±292,74 aB
G II	2735,00±502,28 aA	3620,83±320,66 aB
G III	2289,17±510,32 aA	3463,33±249,27 aB

2. URINOCULTURA

No momento M0 observamos cultura de urina positiva em dois animais pertencentes ao grupo I caracterizado pelo isolamento de *Enterococcus fecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Outros dois animais do grupo III apresentaram infecção urinária por *Escherichia coli* e, em um dos coelhos do Grupo II, foi isolado bastonete gram negativo não fermentador.

Todos os animais que apresentaram cultura positiva no momento M0 foram tratados com Enrofloxacin^A durante 10 dias, administrada por via intramuscular na dose de 5 mg/ kg de peso /dia, conforme teste de sensibilidade realizado a partir do antibiograma.

A nova coleta de urina realizada imediatamente antes do sacrifício (momento M1) não identificou cultura positiva em nenhum dos animais.

^A Foltril 10% produzido pelo Laboratório Shering-Plough®

3. AVALIAÇÃO DA FÍSTULA URETRAL

A incidência de fístula uretral observada nos diferentes grupos estudados foi de 8,3% (um animal/grupo).

Em todos os casos a fístula urinária foi observada a partir do sétimo dia de pós-operatório e confirmada pela uretrografia (Figura 20-A). Nestes animais procedeu-se a confirmação do orifício fistuloso pela injeção retrógrada de solução de azul de metileno (Figura 20-B).

Nenhum dos animais que apresentou fístula urinária tinha cultura de urina positiva no momento do sacrifício.



FIGURA 20-A: Uretrografia demonstrando extravasamento de contraste.

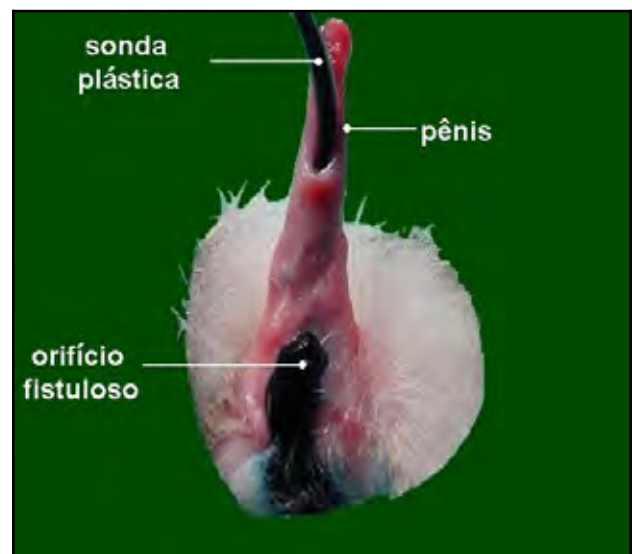


FIGURA 20-B: Injeção retrógrada de solução de azul de metileno demonstrando a ocorrência de fístula uretral.

4. DETERMINAÇÃO DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA

4.1. DADOS INDIVIDUAIS DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vide Tabela 2 do apêndice.

4.2. ANÁLISE DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA

A análise da área da uretra, conforme a técnica de uretrografia descrita anteriormente, não demonstrou estenoses ou dilatações significativas no calibre da uretra dos animais nos diferentes grupos estudados (Tabela 2).

Tabela 2: Média e desvio padrão da área uretral, em centímetros quadrados, determinada pela uretrografia segundo grupo e momento de avaliação.

GRUPO	MOMENTO DE AVALIAÇÃO	
	MOMENTO M0	MOMENTO M1
G I	1,698 ± 0,289 aA	1,871 ± 0,384 aA
G II	1,572 ± 0,321 aA	1,740 ± 0,268 aA
G III	1,703 ± 0,427 aA	1,702 ± 0,260 aA

5. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ENXERTO

5.1. DADOS INDIVIDUAIS DA ÁREA DO ENXERTO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vide Tabelas 3 e 4 do apêndice.

5.2. ANÁLISE DA ÁREA DO ENXERTO

A avaliação dos resultados obtidos a partir do cálculo matemático da área da elipse demonstrou que a área final do enxerto foi significativamente maior no grupo I quando comparada ao grupo III. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II (Tabela 3).

Tabela 3: Média e desvio padrão das variáveis área da elipse, medidas longitudinais e transversas do enxerto em milímetros quadrados nos diferentes grupos de estudo.

VARIÁVEL	GRUPOS			TESTE ESTATÍSTICO
	GI	GII	GIII	
LONGITUDINAL	7,50±1,44 b	6,92±1,31 ab	6,92±1,16 a	0,79 (p>0,05)
TRANSVERSO	3,58±1,31 b	2,92±0,52 ab	2,58±0,67 a	3,84 (p<0,05)
ÁREA DA ELIPSE	21,52±1,07 b	16,16±5,25 ab	13,74±2,83 a	4,16 (p<0,05)

Entretanto, o cálculo da área obtido a partir das imagens digitalizadas da uretra e analisadas pelo *software* Scion image[®] demonstrou uma retração tecidual significativamente maior no grupo III em relação ao grupo II. Não foi observada diferença significativa entre os grupos I e II (Tabela 4).

Tabela 4: Média e desvio padrão das variáveis retração do enxerto e área uretral calculada pelo *software* (em milímetros quadrados), segundo os diferentes grupos de estudo.

VARIÁVEL	GRUPOS			TESTE
	GI	GII	GIII	ESTATÍSTICO
ÁREA DIGITAL	46,42±10,09 ab	58,48±18,16 b	44,80±11,36 a	3,59 (p<0,05)
% RETRAÇÃO	55,27±9,68 ab	44,72±17,17 b	57,25±10,84 a	3,24 (p<0,05)

6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA URETRA

6.1. DADOS INDIVIDUAIS DA HISTOLOGIA URETRAL NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vide Tabela 5 do apêndice.

Tabela 5: Mediana e semi-amplitude total das variáveis histológicas e resultado da análise de variância não paramétrica de Kruskal-Waltes segundo os três diferentes grupos de estudo.

VARIÁVEL	GRUPO AVALIADO			TESTE ESTATÍSTICO
	G I	G II	G III	
INFILTRADO INFLAMATÓRIO	1,0±1,0	1,0±1,0	1,0±1,0	0,00 (p>0,005)
FIBROSE	3,0±0,5	3,0±0,5	2,0±0,5	2,60 (p>0,005)
REGENERAÇÃO EPITELIAL	2,0±1,0	2,0±1,0	2,0±1,0	3,28 (p>0,005)
NEOVASCULARIZAÇÃO	1,0±1,0	1,0±1,0	1,0±1,0	0,61 (P>0,005)

6.2. ANÁLISE DA HISTOLOGIA URETRAL

A avaliação histológica da uretra demonstra que em todos os grupos houve reação inflamatória aguda caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório na área do enxerto com presença de linfócitos e macrófagos (Figura 21).

Quando comparamos a intensidade da resposta inflamatória em função dos grupos, notamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos conforme demonstrado no gráfico 1 e Tabela 5.



FIGURA 21: Intensa reação inflamatória na área do enxerto caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório com presença de linfócitos e macrófagos (aumento de 20 vezes ao H.E).

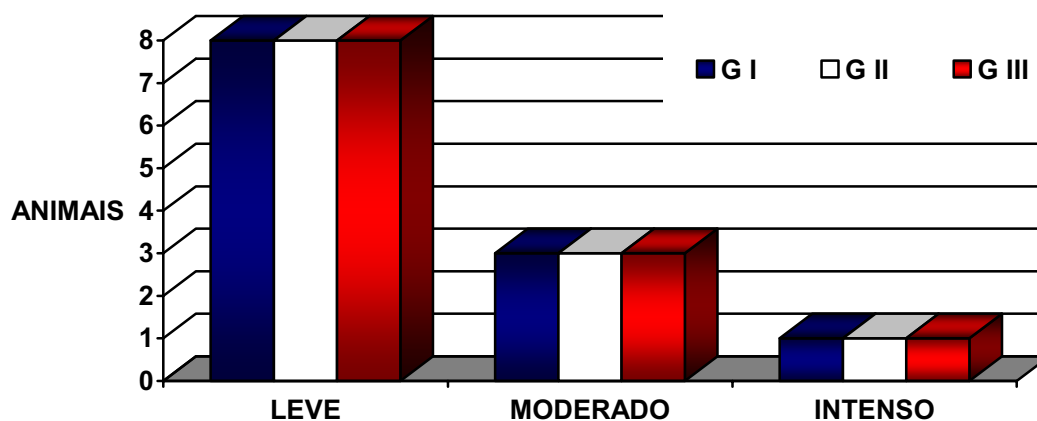


Gráfico 1: Distribuição dos animais segundo a intensidade do infiltrado inflamatório na área do enxerto, de acordo com os diferentes grupos de estudo ($p > 0,05$).

A fibrose no local do enxerto foi bastante expressiva nos diferentes grupos, principalmente nos animais onde foi utilizada a membrana de colágeno acelular com uma ou quatro camadas.

Histologicamente observa-se a presença de extensas áreas eosinofílicas que ocupam toda a base do enxerto e se estendem além das bordas do tecido uretral normal (Figura 22).

Embora tenhamos observado uma tendência a menor prevalência de fibrose nos animais do grupo III em relação aos demais grupos, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Gráfico 2 e Tabela 5).

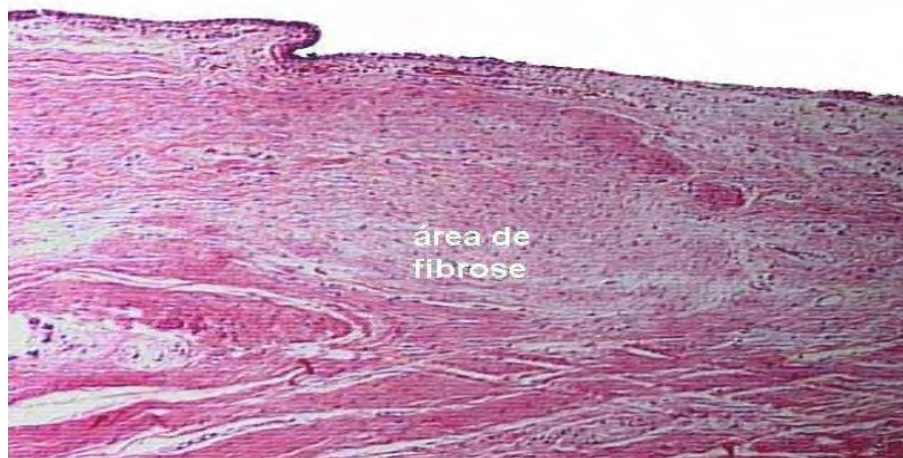


FIGURA 22: Reação fibrótica intensa na área do enxerto com presença de extensas áreas eosinofílicas que ocupam toda a base do implante (aumento de 10 vezes, coloração pelo H.E).

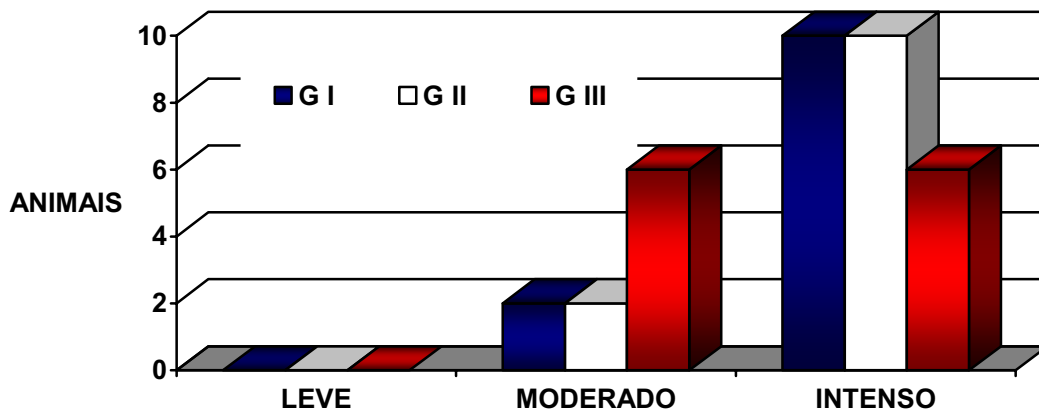


Gráfico 2: Distribuição dos animais segundo a intensidade da fibrose na área do enxerto, de acordo com os diferentes grupos de estudo.

A capacidade de regeneração epitelial foi classificada de acordo com o número de camadas celulares presentes no epitélio que recobria o enxerto (Figura 23). A análise dos dados obtidos não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos estudados (Tabela 5).



FIGURA 23: Regeneração epitelial intensa com presença de três camadas celulares distintas recobrando a área do enxerto (aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E).

A avaliação da neovascularização na área do enxerto demonstrou a presença de vasos neo-formados constituídos de uma única camada celular repletos de hemácias (Figura 24). Este processo teve início nas margens no tecido uretral normal com distribuição centripeta, ou seja, das bordas em direção à área central do enxerto. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (Tabela 5).

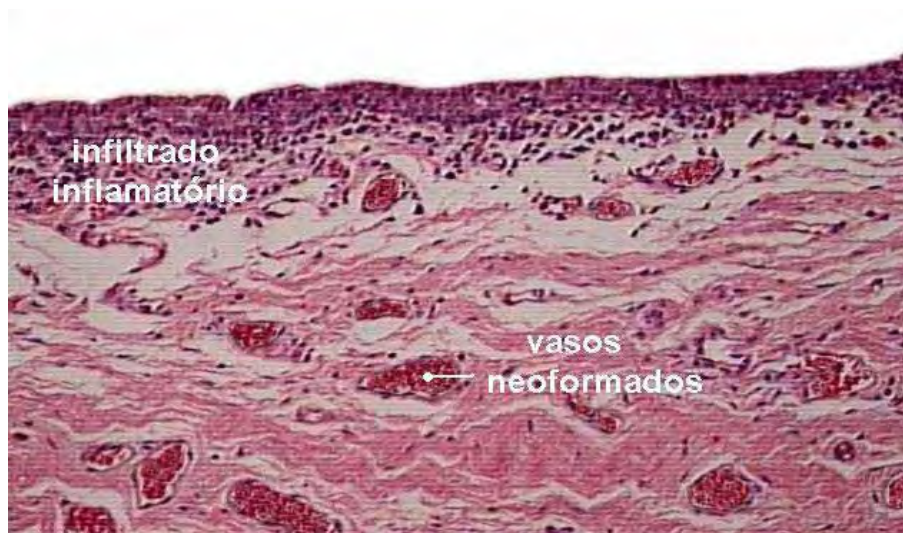


FIGURA 24: Neo-vascularização intensa com presença de inúmeros vasos repletos de hemácias distribuídos ao longo da área do enxerto (aumento de 20 vezes, coloração pelo H.E).

7. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DO COLÁGENO

7.1. DADOS INDIVIDUAIS DA ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO NOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

Vide Tabelas 6 e 7 do apêndice.

7.2. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO COLÁGENO

A análise do colágeno pela coloração de *Picrosirius red* demonstra nítido predomínio do colágeno tipo III em todos os grupos estudados. Esta predominância foi significativamente maior nos grupos II e III em relação ao grupo I. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos II e III (Tabela 6).

A análise do colágeno tipo I mostrou uma predominância significativamente maior no grupo I em relação ao grupo II. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III (Tabela 6).

Em relação ao índice do colágeno tipo III:I notamos um índice significativamente maior no grupo II em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e III. A associação entre o percentual de retração obtida pela análise computadorizada em relação ao índice de colágeno tipo III:I, mostrou uma correlação negativa no grupo II. Não houve associação destes parâmetros nos demais grupos.

Tabela 6: Mediana e semi-amplitude da área, em micrômetros quadrados, ocupada pelo colágeno total e seus diferentes subtipos e índice do colágeno Tipo III/I, segundo grupo de estudo.

COLÁGENO	GRUPO AVALIADO			TESTE ESTATÍSTICO
	G I	G II	G III	
TIPO I	30288,0±77494,0 b	1579,5±2503,8 a	18679,0±88662,0 b	p<0,001
TIPO III	104792,5±153676,0 a	309872,9±252107,0 b	676647±893960,7 b	p<0,001
TOTAL	978550,5±113933,0 b	820061,9±129278,5 a	789368,2±88661,5 a	p<0,001
ÍNDICE III : I	119,68±3 2,26 a	257,23±180,12 b	115,09±154,72 a	P<0,01

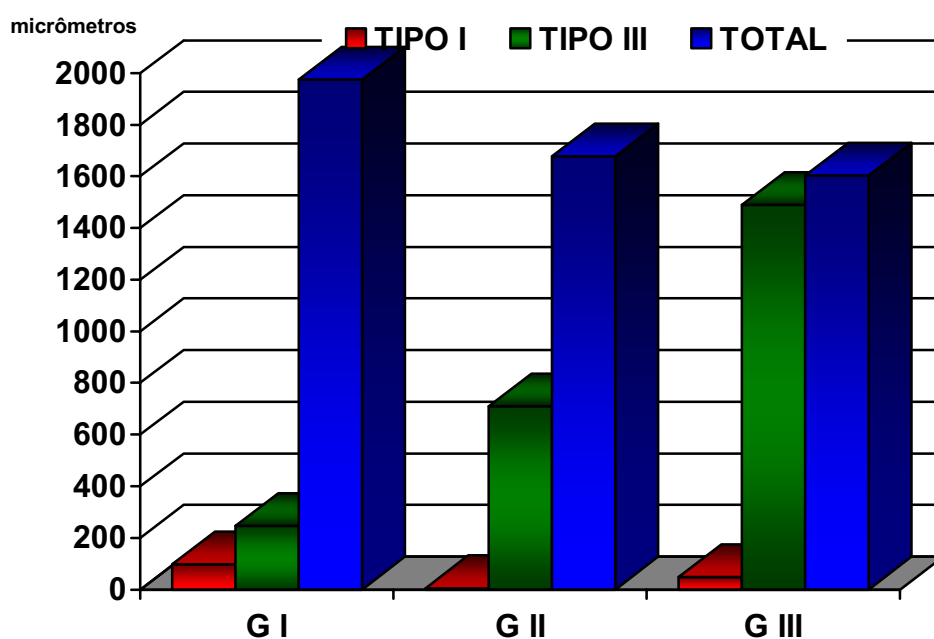


Gráfico 3: Área total do enxerto, em micrômetros quadrados, ocupada pelo colágeno total e seus diferentes subtipos, segundo grupo de estudo.

1. METODOLOGIA

1.1. MODELO EXPERIMENTAL

Atualmente, a maioria dos artigos sobre emprego de biomateriais no reparo das lesões uretrais utiliza como modelo experimental coelhos^{39,53,72,73,90,91,92,102,103,104,105,106,107,108}, cães^{19,27,30,40,41,59,62,109,110,111} e gatos⁴⁶.

A utilização de coelhos com peso corpóreo entre três e cinco kilogramas proporciona um pênis, quando estirado, com tamanho médio entre quatro a cinco centímetros de comprimento¹¹². Tais dimensões são semelhantes ao pênis de uma criança com idade entre seis e doze meses³. Este fato favorece a escolha do coelho como modelo experimental para estudo das patologias uretrais, uma vez que a Sociedade Americana de Pediatria preconiza que as cirurgias genitais como a correção de fimose ou hipospádia sejam realizadas nesta faixa etária²⁸.

Outro fator decisivo para escolha deste animal decorre da experiência adquirida pelo Departamento de Urologia em trabalhos anteriores com este modelo^{28,113}. Estes autores demonstraram que o coelho é de fácil manuseio, além de apresentar boa resistência orgânica. Além disso, a disponibilidade destes animais no Biotério da Faculdade de Medicina foi outro fator que influenciou nossa escolha.

Por outro lado, a urina desses animais tem um pH alcalino que favorece a precipitação de sais na presença de corpos estranhos, causando maior risco de formação de cálculos ou calcificação no implante. Conforme relatado por Trindade Filho²⁸ outro fator desfavorável na escolha deste modelo é que a uretra peniana é mais delgada em sua porção distal, não sendo envolvida por tecido esponjoso, o que poderia facilitar a ocorrência de fístulas urinárias.

1.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS E DELINEAMENTO DO TRABALHO

O estudo foi delineado com intuito de determinar se existe diferença na ocorrência de fistulas urinárias ou alterações do calibre uretral, na retração do enxerto ou na resposta histológica da uretra de coelhos, quando submetidos à reconstrução com enxertos de SIS com uma ou quatro camadas e com mucosa oral autóloga.

De acordo com Hafez ⁸² a escolha do SIS com uma ou quatro camadas em cirurgias reconstrutivas da uretra é uma questão ainda não respondida. O SIS com múltiplas camadas possui maior resistência tênsil o que poderia prevenir a ocorrência de dilatações uretrais e facilitar seu manuseio durante a anastomose quando comparado com o SIS em camada única. Entretanto, seu uso em humanos parece estar associado à maior resposta cicatricial com fibrose importante⁸². Por outro lado, o SIS com uma camada apresentaria como vantagem um processo de reabsorção mais rápido, acelerando a migração celular e dando lugar a uma adequada remodelação tecidual com mínima fibrose e melhor resultado funcional ⁸². Em seu estudo comparativo entre o SIS com uma ou quatro camadas e túnica albugínea para correção de curvatura peniana em coelhos, o autor conclui que o SIS com uma camada apresentou resultados similares à túnica albugínea, enquanto que o SIS com quatro camadas apresentou uma maior incidência de infecções e retrações quando comparado aos demais grupos ⁸². Soergel ⁷⁸ e colaboradores obtiveram resultados semelhantes em um estudo avaliando o emprego de SIS com quatro camadas no tratamento de hipospádias proximais. Este autor observou duas complicações maiores que resultaram em severa curvatura peniana com necessidade de nova

abordagem cirúrgica. Da mesma forma, Mantovani e colaboradores⁸⁹ relataram resultados satisfatórios com SIS em cirurgias corretivas de grandes estenoses uretrais com mais de dez centímetros de extensão.

Até o presente momento, apenas um trabalho foi publicado utilizando o SIS com uma e quatro camadas no tratamento de lesões uretrais⁷², porém os resultados são comparados a uma matriz colágena obtida a partir do tendão de bovinos. Embora estes resultados apresentados fossem satisfatórios, não foram realizadas análises da retração uretral ou testes histomorfométricos para diferenciação dos subtipos de colágeno. Desta forma, ainda não estão definidas as potenciais vantagens e desvantagens entre o SIS com uma ou quatro camadas, especialmente quando comparados aos materiais mais comumente utilizados em cirurgias reconstrutivas da uretra, como a mucosa oral. Este fato motivou a realização deste trabalho que comparou o SIS com uma e com quatro camadas à mucosa oral, na substituição parcial da uretra, em um modelo experimental com coelhos.

A escolha da mucosa oral como parâmetro de comparação dos resultados deve-se ao fato de que este material tem apresentado os melhores resultados em uretroplastias, sendo por este motivo um dos tecidos extragenitais mais utilizados no tratamento das lesões uretrais^{28,60,61,62, 63,114}.

O período de observação de doze semanas foi determinado levando-se em consideração as características do enxerto de matriz de colágeno acelular em relação ao tecido hospedeiro, tendo como base estudos prévios realizados em ureteres^{80,81,86,87,91,105}, bexiga^{79,84,108,116,117,118,119} e uretra^{73,89,90,91,92,103,120,121,122}. De acordo com Kroop⁷³, ao término de doze semanas, o enxerto de SIS encontra-se totalmente epitelizado, não sendo possível distinguí-lo do epitélio

uretral normal. Huang ⁹², após mesmo período de observação, relatou completo desaparecimento do enxerto de SIS quando utilizado sob a forma de ilha, porém resquícios do enxerto foram observados quando utilizado na forma tubular.

Desta forma, em nossa série, foi determinado tempo de segmento de doze semanas, pois este nos pareceu ser o período ideal para observação dos parâmetros histológicos propostos. A observação por um prazo superior ao realizado dificultaria o estudo da resposta inflamatória local conforme demonstrado em trabalhos anteriores ^{72,79,82,91,103}.

A padronização do enxerto com um centímetro em seu maior eixo e abrangendo metade do diâmetro uretral levou em consideração as dimensões do pênis do coelho, uma vez que lesões deste calibre são bastante significativas quando se deseja avaliar a resposta com enxertos uretrais tipo ilha ^{72,73,90,91,103}. Optamos por iniciar a excisão do segmento de uretra distando cerca de quinze milímetros do meato uretral, pois a este nível a uretra encontra-se completamente revestida por epitélio normal ²⁸. Outro fator que limitou o tamanho da uretra excisada foi a dificuldade em se obter fragmentos de mucosa oral autóloga maiores que um centímetro, uma vez que este fato poderia prejudicar a alimentação e interferir na adequada recuperação dos animais.

De acordo com alguns autores, a derivação urinária pode ser um ponto importante em cirurgias uretrais, uma vez que o extravasamento de urina poderia propiciar uma reação inflamatória mais intensa com conseqüente formação de fibrose ^{28,123}. Entretanto, vários estudos relatam uma grande dificuldade em se manter sondas uretrais em animais, mesmo com a utilização de dispositivos de proteção como os colares cervicais ou a fixação da sonda na uretra glandar ^{28,124}. Neste último caso, embora o coelho não consiga arrancar o cateter, a

manutenção de uma derivação incontínente pode ocasionar dermatites infecciosas graves com significativa perda de peso ou até mesmo morte do animal¹²⁴. De acordo com alguns autores, o uso de gaiolas de contenção permite a manutenção do cateter uretral por até dois dias^{3,124,125}. Theoderescu³ propôs a manutenção de uma derivação uretral por cinco dias, porém em muitos casos, houve perda da sonda já no primeiro dia. Trindade Filho²⁸, em seu estudo avaliando a substituição uretral com matriz de aorta tubulizada, utilizou cistostomia como via de derivação urinária, cujos cateteres eram exteriorizados na região cervical dorso-lateral e protegidas por um colar cervical. Desta forma, o autor conseguiu manter a sonda por um período de catorze dias, conforme preconizado por alguns autores^{89,91,127}.

Entretanto, estudos experimentais recentes têm sugerido a não utilização de cateteres de derivação no pós-operatório⁷². Este autor não observou em nenhum animal dificuldade de esvaziamento vesical ou formação de cálculos durante um período de segmento de até nove meses, ocorrendo fístula tardia em apenas um caso (4%).

Desta forma, optamos por não utilizar qualquer método de derivação urinária, não sendo observadas incrustações uretrais ou dificuldade miccional em nenhum dos animais. Todos os coelhos apresentaram micção espontânea após a retirada do cateter ao final da cirurgia e a uretrografia de controle não identificou sinais de estenoses significativas. A incidência de fístulas urinárias foi a mesma entre os diferentes tipos de materiais utilizados com apenas um caso de fístula por grupo (8%).

2. PESO CORPÓREO

A variação de peso corpóreo é um parâmetro confiável na avaliação do estado nutricional de um animal uma vez que, em caso de afecções ou complicações pós-operatórias, a perda de peso pode ser o primeiro fator observado¹²⁷.

Neste estudo, todos os animais apresentaram ganho de peso durante o período de observação, demonstrando assim adequado estado de saúde dos mesmos. A utilização de antiinflamatórios e antibióticos no período pós-operatório foi eficiente na prevenção e no controle das infecções, podendo este fator ter contribuído também para a manutenção da saúde do animal.

3. URINOCULTURA

No momento inicial (Momento M0) a prevalência de infecção urinária observada em nossa série foi de 13,8%, sendo bem menor que a apresentada por Amaro e colaboradores (35%)¹¹³. Por outro lado, um estudo semelhante realizado neste mesmo serviço demonstrou índices de infecção²⁸ em torno de 8%. Como nos três estudos houve manipulação uretral prévia para realização de uretrografia, esta diferença observada pode ser atribuída a uma variação biológica nos animais.

No momento M1 observamos que a prevalência de infecção urinária foi significativamente menor que no momento M0 (13,8% versus 0%), fato este que pode ser explicado pela não utilização de derivação urinária associada ao emprego da quimioprofilaxia pós-operatória. Porém, a maioria dos trabalhos utilizando SIS na reconstrução uretral sem derivação urinária não faz referência à prevalência de infecção^{73,78,89,90,91,92}, dificultando assim a comparação dos nossos resultados. Quando analisamos estudos que utilizam cistostomias como forma de derivação urinária, a prevalência de infecção pode atingir cerca de 40% em média²⁸, demonstrando que a permanência de um cateter de derivação urinária pode interferir nas taxas de infecção.

Outro fator importante a ser considerado é o tempo de sondagem. Burke e colaboradores¹²⁸ observaram um risco cumulativo para o desenvolvimento de infecção urinária de 70% após dez dias e de 80% em 14 dias.

Desta forma, quando avaliamos os resultados obtidos em nossa série, a utilização de derivação urinária, ou mesmo a sua manutenção por um curto período de tempo, pode ser um fator decisivo para ocorrência de infecções¹²⁹.

4. FÍSTULA URETRAL

A incidência de fístula urinária após as cirurgias corretivas da uretra vem diminuindo ao longo do tempo, podendo a sua ocorrência ser considerada um parâmetro de avaliação do sucesso de uma determinada técnica cirúrgica²⁸. Esta diminuição deve-se principalmente ao aprimoramento das técnicas de microcirurgia e ao desenvolvimento de novos materiais utilizados na substituição uretral. Atualmente consideram-se aceitáveis índices de fístulas urinárias em torno de 5%¹³⁰.

A ocorrência de infecção urinária é considerada importante fator na gênese da fístula, pois interfere no processo cicatricial²⁸. Trindade Filho²⁸ observou que 60% dos animais que desenvolveram fístula urinária apresentaram infecção concomitante. Em nosso estudo não observamos correlação entre fístula urinária e infecção uma vez que nenhum dos animais portadores de fístula apresentou cultura positiva durante o período de avaliação.

Outro fator que pode influenciar no desenvolvimento de fístulas é o tipo de material utilizado como substituto uretral, bem como a forma do enxerto. Trindade Filho²⁸, em estudo comparativo com enxertos de mucosa bucal e matriz acelular de aorta tubular em coelhos encontrou ocorrência de fístulas em 12,5% e 8% dos casos, respectivamente. Da mesma forma, outro autor⁷² comparando SIS com uma ou quatro camadas com matriz colágena heteróloga observou ocorrência de fístulas somente no grupo tratado com SIS em quatro camadas (12,5%). El-Assmy⁹¹ observou que, quando o SIS foi utilizado sob a forma de enxerto tubular, houve maior incidência de fístulas e obstrução quando comparado ao enxerto parcial tipo ilha.

Estudos avaliando o emprego de enxertos de SIS tipo ilha na reconstrução uretral apresentaram incidência de fístulas urinárias que variaram de zero ^{73,90} a 16% ⁷², demonstrando assim resultados semelhantes aos obtidos em nossa série (8%).

5. AVALIAÇÃO DO CALIBRE URETRAL PELA URETROGRAFIA

Apesar de a uretrografia ser um método discutível para detecção de pequenas alterações do calibre uretral, esta ainda permanece como principal instrumento na avaliação da uretra seja em estudos experimentais^{72,73,91} ou em humanos⁸⁹.

A realização do exame pré-operatório foi fundamental, pois permitiu a comparação de possíveis alterações uretrais nos diferentes momentos. Nuininga e colaboradores⁷² realizaram uretrocistografia pré e pós-operatória em coelhos submetidos à uretroplastia, comparando a utilização do SIS com matriz colágena derivada de tendão bovino. Os autores obtiveram 16% de estenose no grupo tratado com matriz colágena heteróloga.

Muitos autores relatam presença de estenoses e formações diverticulares após manipulação uretral levando em consideração apenas uma avaliação subjetiva da imagem à uretrografia. Nenhum dos trabalhos levantados apresentou dados acerca das medidas uretrais sendo tais avaliações apenas qualitativas^{72,73,89,91}. Kroop e colaboradores⁷³, em estudo comparativo entre SIS e pele prepucial em coelhos submetidos à uretroplastia, observaram formações diverticulares somente nos animais tratados com enxerto de pele.

Apesar das críticas possíveis quanto à localização exata do enxerto, na tentativa de melhorar a sensibilidade do método, padronizamos uma região distando um centímetro e meio do meato uretral avaliada no pré e pós-operatório, minimizando assim possíveis erros de avaliação. Não observamos diferenças entre os grupos, demonstrando assim um comportamento homogêneo entre os mesmos, seja na análise subjetiva ou objetiva, utilizando –se a área da uretra.

6. DETERMINAÇÃO DA ÁREA DO ENXERTO

A exemplo do que ocorre com a uretrografia, os principais trabalhos que utilizaram o SIS como substituto uretral não levaram em consideração a determinação da intensidade de retração do enxerto ^{72,73,91}.

De acordo com estudos realizados com outros tecidos, graus variáveis de retração do enxerto são esperadas ²⁴, apresentando reduções significativas e conseqüente formação de estenoses ^{56,66}. Quando analisamos a área da elipse calculada a partir das medidas na peça a fresco, notamos que é muito difícil avaliar de maneira adequada a intensidade desta retração, pois a área do enxerto é irregular dificultando assim a obtenção das medidas de forma precisa. Trindade Filho ²⁸, em estudo comparativo entre mucosa oral autóloga e matriz tubulizada de aorta em coelhos, não observou diferença estatística entre os grupos ao avaliar a intensidade de retração tecidual utilizando a fórmula da área do retângulo.

Em nosso estudo, a retração foi calculada utilizando-se tanto a fórmula da elipse como pelo cálculo da área por análise computadorizada. A área da elipse no momento final foi significativamente menor entre os animais pertencentes ao grupo III. Da mesma forma, o cálculo a partir das imagens digitalizadas também apresentou maior redução entre os animais com implante de mucosa oral. Porém, ao analisarmos o percentual de retração, notamos uma menor retração no grupo II. Ao relacionarmos este último dado com o índice de colágeno III: I notamos uma correlação negativa, ou seja, quanto maior a retração menor o índice, demonstrando assim que nos casos cuja retração é maior existe uma

predominância do colágeno do tipo I. Este fato é desfavorável, pois indica a ocorrência de um processo fibrótico crônico ¹³¹.

Quando analisamos exclusivamente o SIS, diferentemente de Hafez e colaboradores ⁸² que obtiveram maior retração no SIS com quatro camadas em relação à camada única, nosso estudo demonstrou um comportamento semelhante entre ambos, seja na intensidade da retração seja no índice de colágeno III:I. Entretanto, não é possível afirmarmos, baseados em tais parâmetros, qual o melhor material a ser utilizado.

7. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA URETRA

A avaliação histológica é ponto fundamental, pois permite o estudo dos diversos fatores que podem influenciar nos resultados da uretroplastia com implante tecidual. O tempo de degradação dos implantes pode ainda ser influenciado pela espécie animal, técnica cirúrgica empregada, além da forma, tamanho e composição química do material utilizado²⁸, fato este que influenciará na intensidade da reação inflamatória produzida. Quanto menor a densidade do material, maiores são seus poros e, conseqüentemente, maior será a infiltração por células a partir do tecido receptor. Tal fato acelera o processo de absorção do material e sua incorporação pelo hospedeiro evitando assim possíveis complicações⁷².

O presente estudo demonstrou, em todos os grupos, a presença de um infiltrado inflamatório envolvendo o enxerto caracterizado pela presença de linfócitos e macrófagos originários do tecido uretral normal. Esta reação foi mais intensa na área correspondente ao local do implante e diminuiu gradativamente à medida que se distanciava do enxerto. Observamos um predomínio de um infiltrado inflamatório leve nos diferentes grupos demonstrando assim a baixa antigenicidade dos materiais utilizados (Gráfico 1).

A presença de infiltrado inflamatório também foi observada por outros autores, porém sua intensidade variou de acordo com os diferentes modelos e com o tempo de observação. Desta forma, Grossklaus e colaboradores⁹⁰ avaliando a resposta uretral de coelhos ao implante de SIS, observaram ausência de infiltrado inflamatório agudo na uretra normal ao final de 6 semanas. Kroop e colaboradores⁷⁹, empregando o SIS como substituto em ampliações vesicais,

observaram que, após 12 semanas, a atividade inflamatória ao longo do enxerto era mínima, permanecendo apenas vasos pequenos e bem formados.

A escassez de trabalhos avaliando o processo fibrótico não nos permite uma análise comparativa dos resultados obtidos. Em nosso estudo observamos a presença de fibrose importante infiltrando a base do enxerto e estendendo-se ao longo das margens do tecido uretral normal, sendo este um achado freqüente nos diferentes grupos (Gráfico 2). Entretanto, não foi observada correlação entre a intensidade de fibrose e a ocorrência de estenose pós-operatória.

Com relação à regeneração epitelial, observamos completa epitelização do enxerto ao final do período de observação, caracterizada pela presença de um epitélio transicional bem diferenciado composto, em sua maioria, por duas a três camadas celulares distintas. Resultados semelhantes foram observados por El-Assmy⁹¹ avaliando a substituição de segmentos ureterais com SIS em camada única. Porém, esta regeneração estava associada a intenso processo inflamatório e importante reação fibrótica local¹³². Nuiniga e colaboradores⁷², ao comparar SIS com 1 e 4 camadas à matriz colágena originária do tendão bovino, observaram que o urotélio havia se regenerado após quatro semanas nos animais tratados com enxerto uretral de SIS em camada única e com a matriz colágena bovina. Entretanto, no grupo tratado com SIS em quatro camadas, o urotélio só se regenerou após o terceiro mês de segmento. Resultados semelhantes foram obtidos por Kroop⁷³ em estudo comparativo entre SIS e pele na substituição uretral em coelhos. O autor observou, ao término de doze semanas, a presença de um epitélio colunar estratificado composto por três ou quatro camadas celulares recobrando a área do enxerto de SIS. Da mesma forma, El-Assmy⁹¹ avaliando comparativamente o SIS em camada única e a regeneração

espontânea da uretra de coelhos, relatou que a luz uretral apresentava-se completamente recoberta por um epitélio colunar estratificado ao término de doze semanas.

Em nosso estudo o processo de neovascularização observado na área do enxerto foi semelhante entre os diferentes grupos avaliados. Vasos bem formados e de distribuição centrípeta também foram observados por Kroop e colaboradores⁷⁹ ao final de doze semanas ao avaliarem a utilização do SIS em ampliações vesicais. Estas mesmas características foram descritas por Nuininga e colaboradores⁷² ao avaliarem regeneração vascular em coelhos submetidos à uretroplastia utilizando SIS quando comparado à matriz colágena bovina.

Desta forma, em nosso estudo, observamos resultados histológicos semelhantes entre a mucosa oral e o SIS em uma ou quatro camadas, podendo este fato explicar a baixa prevalência de complicações pós-operatorias, tais como fístulas, estenoses ou infecções.

8. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO ENXERTO

De acordo com Yao ¹³³ os principais tipos de fibras colágenas que influenciam a função biológica do trato urinário são as fibras dos tipos I e III, devido as suas características bioquímicas e prevalência. A maioria dos tecidos classificados como fibróticos exhibe aumento do colágeno principalmente do subtipo I, considerado mais espesso e resistente quando comparado às fibras do tipo III ¹³⁴.

Conforme inferido anteriormente notamos um maior índice de colágeno III:I no grupo SIS com quatro camadas em relação ao implante de mucosa oral. Observou-se ainda menor retração no grupo II com uma correlação negativa entre estes dois parâmetros, demonstrando que quanto menor a retração tecidual maior a predominância do colágeno tipo III e, conseqüentemente, menor a fibrose.

A exemplo do que foi obtido em nossos resultados, Sievert e colaboradores ¹²⁰, utilizando matriz acelular heteróloga canina na reconstrução da uretra em coelhos, observaram um nítido predomínio do colágeno subtipo III durante o processo de reparação cicatricial. Entretanto, assim como em nosso estudo, não houve correlação deste achado com a maior prevalência de complicações ou falhas no processo terapêutico.

Apesar das alterações estruturais observadas em nosso estudo, a análise por imagem não demonstrou uma relevância clínica destes fatores. Porém, podemos inferir a partir destes dados que, possivelmente, nos casos de substituição uretral com enxertos tubulares, pode haver uma maior relevância destas alterações estruturais com maiores índices de complicações.

CONCLUSÕES

A análise da área final seja pela fórmula matemática ou pela análise computadorizada foi significativamente menor no grupo submetido a implante com mucosa oral (GRUPO III);

O percentual de retração foi significativamente maior no grupo com implante de mucosa oral (Grupo III);

A análise histomorfométrica do colágeno demonstrou que, apesar da maior predominância do colágeno tipo III no grupo III, quando analisamos o índice de colágeno III:I, observamos valores maiores no grupo II em relação aos demais grupos;

A análise dos padrões histológicos e radiológicos não evidenciou alterações significativas na resposta do tecido uretral receptor aos três materiais utilizados.

Com relação ao SIS, apesar de não haver diferenças nos achados radiológicos e hispatológicos, observamos uma maior retração e fibrose no SIS com uma camada em relação ao SIS com quatro camadas.

1. Italiano G, Abatangelo G, Calabro A, Zanoni R, Passerini-Glaze GL. Guiding spontaneous tissue regeneration for urethral reconstruction: long term studies in the rabbit. **Urol. Res.** 1997; 26:281-84.
2. Olsen L, Bowald S, Busch C, Carlsten J, Erikson I. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. **Scand. J. Urol.** 1992; 26:323-6.
3. Theodorescu D, Balcom A, Smith CR, M^oloire GA, Churchill BM, Khoury AE. Urethral replacement with vascularized tunica vaginalis: defining the optimal form of use. **J. Urol.** 1998; 159:1708-11.
4. Baskin LS, Duckett JW, Uloka K, Seibold J, Snyder HM. Changing concepts of hypospadias curvature lead to more onlay island flap procedures. **J. Urol.** 1994; 151:191.
5. Dessanti A, Rigamonti W, Merulla V, Falchetti D, Caccia G. Autologous buccal mucosa graft for hypospadias repair: an initial report. **J. Urol.** 1992; 147:1081-5.
6. Kinkead TM, Borzi P.A, Duffy PG, Ransley PG. Long-term follow up of bladder mucosa graft for male urethral reconstruction. **J. Urol.** 1994; 151:105-8.
7. Mcaninch JW. Reconstruction of extensive urethral strictures: circular fasciocutaneous penile flaps. **J. Urol.** 1993; 149:488.
8. Noll F, Schreiter F. Mesh graft urethroplasty using split-thickness skin graft. **Urol. Int.** 1990; 45:44-7.
9. Provet JA, Surya BV, Grunberger I, Johanson KE, Brown J. Scrotal island flap urethroplasty in the management of bulbar urethral strictures. **J. Urol.** 1989; 142:1455-8.
10. Turner-Warwick R. The repair of urethral strictures in the region of the membranous urethra. **J. Urol.** 1968; 100:303-14.
11. Devine PC, Horton CE, Devine CJ. Use of full thickness skin grafts in repair of urethral strictures. **J. Urol.** 1963; 90:67-71.
12. Johanson B. Reconstruction of the male urethra in strictures: application of the buried intact epithelium technique. **Acta Chir. Scand. Suppl.** 1953; 176:17-9.

13. Duckett JW. The island flap technique for hypospadias repair. **Urol. Clin. North Am.** 1981; 8: 503-11.
 14. Ransley PG, Duffy PG, Oesch IL. The use of bladder mucosa and combined bladder mucosa/preputial skin grafts for urethral reconstruction. **J. Urol.** 1987; 138:1096-98.
 15. Pannella A, Borromeo C, Bianchi M. Partial substitution of the male urethra by lyophilized dura mater. **Minerva Urol.** 1974; 26:111-8.
 16. Snow BW, Cartwright PC. Tunica vaginalis urethroplasty. **Urology** 1992; 40:442-5.
 17. Schwartz BM, Anastasi Gw, Krane Rj. The use of dermis for urethral reconstruction. **Am. J. Surg.** 1979; 136:606-8.
 18. Leuret T, Gobet F, Dallaserra M. Use of digestive mucosal graft in urthroplasty: an experimental study prospective utilization of appendix mucosa. **Eur. Urol.** 1995; 27:58-61.
 19. Leuret T, Gobet F, Dallaserra M. Urethroplasty of free colonic mucosa in rats: preliminary study of the use of appendicular mucosa. **Chirurgie** 1994 120:479-85.
 20. Kelami A, Korb G, Ludtke HA. Alloplastic replacement of the partially resected urethra on dogs. **Invest. Urol.** 1971; 9:55-8.
 21. Duckett JW, Coplen D, Ewalt D. Buccal mucosal urethral replacement. **J. Urol.** 1995; 153:1660-3.
 22. Dreikorn K, Lobelenz J, Horsch R. Alloplastic replacement on the partially resected canine urethra by expanded polytetrafluoroethylene grafts: preliminary results. **Urol. Res.** 1979; 7:19-21.
 23. Bock JW. Autologous buccal mucosa graft for urethral reconstruction. **Urology** 1994; 44:753-5.
 24. Buyukunal SN, Cerrah A, Dervisoglu S. Appendix interposition in the treatment of severe posterior urethral injuries. **J. Urol.** 1995; 154: 840-3.
 25. Ehrlich RM, Reda EF, Koyle MA, Kogan SJ, Levitt SB. Complications of bladder mucosal grafts. **J. Urol.** 1989; 142:626-7.
 26. Humby GA. A one stage operation for hypospadias. **Br. J. Surg.** 1941; 29:84-92.
-

27. Cheng EY, Kroop BP. Urologic tissue engineering with small intestinal submucosa: potential clinical applications. **Word J. Urol.** 2000; 18:26-30.
 28. Trindade Filho JCS. Avaliação funcional, morfométrica e histológica da matriz acelular de aorta e da mucosa bucal quando implantados na uretra: estudo experimental no coelho. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2002.
 29. Way LW. Current Surgical Diagnosis & Treatment. 9th ed. San Francisco, CA, 1985.
 30. Gleeson MJ, Griffith D. The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. **J. Urol.** 1989; 148:1377.
 31. Sievert KD, Tanagho EA. Organ specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. **World J. Urol.** 2000; 18:19-25.
 32. Bohne AW, Osborn RW, Hettle PJ. Regeneration of the urinary bladder in the dog, following total cystectomy. **Surg. Gynecol. Obstet.** 1955; 100:259-64.
 33. Bohne AW, Urwiller KL. Experience with urinary bladder regeneration. **J. Urol.** 1957; 77: 725-32.
 34. Kudish HG. The Use of polyvinyl sponge for experimental cystoplasty. **J. Urol.** 1957; 78: 232-35.
 35. Swinney J, Tomlinson BE, Walder DN. Urinary tract substitution. **Br. J. Urol.** 1961; 33: 414-29.
 36. Tsuji I, Kuroda K, Fujieda J, Shiraishi Y, Kunishima K. Clinical experiences of bladder reconstruction using preserved bladder and gelatin sponge bladder in the case of bladder cancer. **J. Urol.** 1967; 98: 91-2.
 37. Tsuji I, Shiraishi Y, Kassai T, Kunishima K, Orikasa S, Abe N. Further experimental investigations on bladder reconstruction without using the intestine. **J. Urol.** 1967; 97: 1021-28.
 38. Orikasa S, Tsuji I. Enlargement of contracted bladder by use of gelatin sponge bladder. **J. Urol.** 1970; 104: 107-10.
 39. Ashkar L, Heller E. The Silastic bladder patch. **J. Urol.** 1967; 98: 679-83.
-

40. Stanley TH, Feminella JR, Priestley JB, Lattimer JK. Subtotal cystectomy and prosthetic bladder replacement. **J. Urol.** 1972; 107:783-7.
 41. Taguchi H, Ishizuka E, Saito K. Cystoplasty by regeneration of the bladder. **J. Urol.** 1977; 118:752-6.
 42. Anwar H, Dave B, Seebode JJ. Replacement of partially resected canine urethra by polytetrafluoroethylene. **Urology** 1984; 24:583-6.
 43. Hakky SI. Urethral replacement by dacron mesh. **Lancet** 1976; 27:1192-6.
 44. Hakky SI. The use of fine double siliconised Dacron in urethral replacement. **Brit. J.** 1977; 49:1672-5.
 45. Gilbaugh JR, Utz DC, Wakim KG. Partial replacement of the canine urethra with silicone prosthesis. **Invest. Urol.** 1969; 7:41-51.
 46. Robinette JD. Silicone rubber prosthesis for replacement of the urethra in male cats. **J.A.M.A.** 1973; 163:285-9.
 47. Vincent MA, Anquetil R. Un cas de remplacement de l'urètre par une prothèse en élastomère de silicone. **J. Urol. Nephrol.** 1976; 82:478-84.
 48. Palleschi JR, Tanagho EA. Urethral tube grafts in dogs. Prothesis of Dacron lined silicone. **Invest. Urol.** 1978; 18:408-11.
 49. Dubernard JM, Gignoux N, Pin J, Fayol A, Botta JM, Blanc N. Remplacement de l'urètre périnal chez le chien par des tubes de sparks. **J. Urol. Nephrol.** 1976; 82:457-72.
 50. Choi HK, Chang SK. A Case of urethral replacement with polytetrafluoroethylene graft for multiple anterior urethral strictures. **Yomsei Med. J.** 1989; 30:198-200.
 51. Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Use of tabularized peritoneal free grafts as urethral substitutes in the rabbit. **J. Ped. Surg.** 1996; 31: 225-8.
 52. Khoury A, Olson M, M^o Loyre G, Churchill B. Urethral replacement with tunica vaginalis: A pilot study. **J. Urol.** 1989; 142:628-31.
 53. Koshima I, Inagawa K, Okuyama N, Morigushi T. Free vascularized appendix transfer for reconstruction of penile urethras with severe fibrosis. **Plast. Reconstr. Surg.** 1999; 103:964-0.
-

-
54. Mitchell ME, Adams MC, Rink RC. Urethral replacement with ureter. **J. Urol.** 1988; 139:1282-5.
 55. Mokhless I. Modified vascularized pedicled scrotal flap for complex hypospadias. **J. Urol.** 1992; 148:55-7.
 56. Burbige KA, Hensle TW, Edgerton P. Extragenital split thickness graft for urethral reconstruction. **J. Urol.** 1984; 131:1137-9.
 57. Memmelar J. Use of bladder mucosa in one stage repair of hipospadias. **J. Urol.** 1947; 58:68-73.
 58. Wessells H, Mcanineh JW. Use of free grafts in urethral stricture reconstruction. **J. Urol.** 1996; 155:1912-5.
 59. Burger RA, Muller SC, El-Damanhoury H, Tschakaloff A, Riedmiller H, Hohenfellner R. The buccal mucosal graft for urethral reconstruction: a preliminary report. **J. Urol.** 1992; 147:662-4.
 60. Fichtner J, Fisch M, Filipas D, Thuroff JW, Hohenfellner R. Refinements in buccal mucosal grafts urethroplasty for hypospadias repair. **World J. Urol.** 1998; 16:192-5.
 61. Caldamone AA, Edstrom LE, Koyle MA, Rabinowitz RA, Hulbert WC. Buccal mucosal grafts for urethral reconstruction. **Urology** 1998; 51:15-20.
 62. Baskin LS, Duckett JW. Buccal mucosa grafts in hypospadias surgery. **Br. J. Urol.** 1995; 76: 23-7.
 63. Naude JH. Buccal mucosal grafts in the treatment of ureteric lesions. **B.J.U. Int.** 1999; 83:751-5.
 64. Lauer G, Schiming R, Frankenschmidt A. Intraoral wound closure with tissue-engineered mucosa: new perspectives. **Plast. Reconstr. Surg.** 2001; 107:25-33.
 65. Elliott SP, Metro MJ, Mcaninch JW. Long term followup of the ventrally placed buccal mucosa only graft in bulbar urethral reconstruction. **J. Urol.** 2003; 169:1754-7.
 66. Barbagli G, Selli C, Di Cello V, Mottola A. A one stage dorsal free graft urethroplasty for bulbar urethral stricture. **Br. J. Urol.** 1996; 78:929-32.
-

-
67. Andrich DE, Mundy AR. Substitution urethroplasty with buccal mucosal free grafts. **J. Urol.** 2001; 165:1131-4.
 68. Yerkes EB, Adams MC, Miller DA, Brocklii JW. Coronal cuff: a problem site for buccal mucosal grafts. **J. Urol.** 1999; 162:1442-4.
 69. Neuhaus RW, Baylis HI, Shoor N. Complications at mucous membrane donor sites. **Am. J. Ophthalmol.** 1982; 93:643-7.
 70. Brasher WJ, Rees TD, Boyce WA. Complications of free grafts of mastigatory mucosa. **J. Periodontol.** 1975; 46:133-6.
 71. Tolstunov L, Pogrel MA, Macanich JW. Intraoral morbidity following free buccal mucosa graft harvesting for urethroplasty. **Oral Surg. Oral Med. Pathol.** 1997; 84:480-5.
 72. Nuininga JE, Moerkerk H, Hanssen A, Hulbergen CA, Wakka JO, Oosterwijk E, et al. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. **Urol.** 2003; 44:266-71.
 73. Kroop BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippy MK, Badylac SF, Mark MC, Keating MA, et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa onlay grafts. **Urology** 1998; 52:138-42.
 74. Agishi T, Nakazono M, Kiraly RJ, Picha G, Nose Y. Biodegradable material for bladder reconstruction. **J. Biomed. Mater. Res.** 1975; 9:119-31.
 75. Cilento BG, Retik AB, Atala A. Urethral reconstruction using a polymer mesh. **J. Urol.** 1995; 153-6.
 76. Italiano G, Abatangelo JG, Calabrò A, Abatangelo G, Zanoni R, O'regan M, Passerini G. Reconstructive surgery of the urethra: a pilot study in the rabbit on the use of hyaluronan benzyl ester (Hyaff-11) biodegradable grafts. **Urol.Res.** 1997; 25:137-40.
 77. Shalhav AL, Elbahnasy AM, Bercowsky E, Kovacs G, Brewer A, Maxwell KL. Laparoscopic replacement of urinary tract segments using biodegradable materials in a large animal model. **J. Endourol.** 1999; 13:241-5.
 78. Soergel TM, Cain MP, Kaefer M, Gitlin J, Casale AJ, Davis MM, Rink RC. Complications of small intestinal submucosa for corporal body grafting for proximal hypospadias. **J. Urol.** 2003; 170:1577-79.
-

-
79. Kroop BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippy MK, Harruff RC, Badylac SF, et al. Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. **Urology** 1995; 46:396-400.
 80. Smith TG, Lindberg G, Napper C, Pearle MS, Cadeddu JA. Ureteral replacement using porcine small intestinal submucosa in a porcine model. **Urology** 2002; 60:931-4.
 81. Sofer M, Rowe E, Forder DM. Ureteral segmental replacement using multilayer porcine small intestinal submucosa. **J. Endourol.** 2002; 16:27-31.
 82. Hafez AT, El-Assmy A, El-Hamid MA. 4 layer versus 1 layer small intestinal submucosa for correction of penile chordee: experimental study in a rabbit model. **J. Urol.** 2004; 171:2489-91.
 83. Vaught JD, Kroop BP, Sawyer BD, Rippy MK, Badylac SF, Shannon HE, et al. Detrusor regeneration in the rat using porcine small intestinal submucosal grafts: functional innervation and receptor expression. **J. Urol.** 1996; 155:374-8.
 84. Kroop BP, Rippy MK, Badylac SF, Adams MC, Keating MA, Rink RC, et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. **J. Urol.** 1996; 155:2098-104.
 85. Kroop BP, Sawyer BD, Shannon HE, Rippy MK, Badylac SF, Adams MC, et al. Characterization of small intestinal submucosa regenerated canine detrusor: assessment of reinnervation, in vitro compliance and contractility. **J. Urol.** 1996; 156:599-607.
 86. Liatsikos EN, Dinlenc CZ, Kapoor R, Bernardo NO, Pikhasov D, Anderson AE, et al. Ureteral reconstruction: small intestine submucosa for the management of strictures and defects of the upper third of the ureter. **J. Urol.** 2001; 165:1719-23.
 87. Liatsikos EN, Dinlene CZ, Kapoor R, Alexianu M, Yohannes P, Anderson AN, et al. Laparoscopic ureteral reconstruction with small intestinal submucosa. **J. Endourol.** 2001; 15:217-20.
 88. Rotariu P, Yohannes P, Alexianu M. Reconstruction of rabbit urethra with Surgisis small intestinal submucosa. **J. Endourol.** 2002; 16:617-20.
 89. Mantovani F, Trinchieri A, Mangiarotti B. Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix: preliminary results. **Arch. Ital. Urol. Androl.** 2002; 74:127-8.
-

-
90. Grossklaus DJ, Shappell SB, Adams MC, Brock JW, Pope JC. Small intestinal submucosa as a urethral coverage layer. **J. Urol.** 2001; 166:636-9.
 91. El-Assmy A, El-Hamid M, Hafez AT. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. **B.J.U.** 2004; 94:1132-35.
 92. Huang X, Luo J, Liao Y, Qui Y, Yang Z. Study on small intestinal submucosa as reapiir materials in urethral reconstruction. **Zhong Xiu Fu Chong** 2006; 20:206-9.
 93. Kuhn C, Boldt J, King T, Crouch E, Vartio T, M^cdonald J. An immunohistochemical study of architectural fibrosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1989; 14:1693.
 94. Chojkier M, Lyche K, Filip M. Increased production of collagen in vivo by hepatocytes and nonparenchymal cels in rats with carbon tetracholide-induced hepatic fibrosis. **Hepato** 1988; 8:808.
 95. Wegrowsk IJ, Lafuma C, Lefaix JL, Daburon F, Robert L. Modification of collagen an noncollagenous proteins in radiation-induced muscular fibrosis. **Exp. Mol. Path.** 1988; 48:273.
 96. Remy J, Wegrowsky J, Crechet F, Martin M, Daburon F. Long term overproduction of collagen in radiation induced fibrosis. **Rad. Res.** 1991; 125:14.
 97. Deveaud CM, Macarak EJ, Kucich U, Ewalt DH, Abrams WR, Howard PS. Molecular analysis of collagens in bladder fibrosis. **Urology** 1998; 140:1518-27.
 98. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 6th edition. Washington DC: A.S.M. press, 1995.
 99. Pollock HM. Laboratory techniques for detection of urinary tract infection and assessment of value. **Am. J. Med.** 1983; 75:79-84.
 100. Munro BH. Statistical methods for health care research. 4th edition Philadelphia, Lippincott, 4^a ed, 2001.
 101. Norman GR, Streiner DL. Bioestatistics: The bare essentials. Mosky Year Book, St. Louis, 1994.
-

102. Sievert KD, Wefer J, Bakircioglu ME, Nunes L, Dahiya RJ, Tanagho EA. Heterologous acellular matrix graft for reconstruction of the rabbit urethra: histological and functional evaluation. **J. Urol.** 2001; 165:2096-102.
 103. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible of the shelf biomaterial for urethral repair. **Urology** 1999; 54:407-10.
 104. Frank J, Pocock R, Stower M. Urethral strictures in childhood. *Br. J. Urol.* 1988; 62:590-92.
 105. Frang D, Furkal, Köves S. Urethral replacement with autologous venous graft: an experimental study in the dog. **Urol. Res.** 1982; 10:145-7.
 106. Court B, Auvert J, Sausse A. Remplacement d'un segment de l'urèthre par un tube d'élastomère de silicone chez le chien male. **J. Urol. Nephrol.** 1971; 77:562-4.
 107. Kjaer TB, Nilsson T, Madsen PO. Total replacement of part of the canine urethra with lyophilized vein homografts. **Urology** 1976; 14:159-61.
 108. Pope JC, Davis MM, Walsh MJ, Ellison PK, Rink RC, et al. The ontogeny of canine small intestinal submucosa regenerated bladder. **J. Urol.** 1997; 158:1105-10.
 109. Sorber M, Feitz WFJ, De Vries JDM. Short- and mid-term outcome of different types of one-stage hypospadias corrections. **Eur. Urol.** 1997; 32:475-9.
 110. Klijn AJ, Dik P, De Jong TP. Results of preputial reconstruction in 77 boys with distal hypospadias. **J. Urol.** 2001; 165:1255-7.
 111. Blum J, Skemp C. Silicone rubber ureteral prosthesis. **J. Urol.** 1963; 90:276-80.
 112. Merguerian PA, Seremits G, Becher MW. Hypospadias repair using laser welding of ventral skin flap in rabbits: comparison with sutured repair. **J. Urol.** 1992; 148:667-70.
 113. Amaro JL. Ampliação vesical com dura-máter e pericárdio bovino: estudo comparativo em coelhos. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 1995.
 114. Kropf D, Tukac A, Prilic D, Verweyen A. Using buccal mucosa for urethral reconstruction in primary and re-operative surgery. **Eur. Urol.** 1998; 34:216-20.
-

-
115. Jaffe JS, Ginsberg PC, Yanoshak SJ, Costa LE, Ogbolu FN, Moyer CP, et al. Ureteral segment replacement using a circumferential small intestinal submucosa xenogenic graft. **J. Invest. Surg.** 2001; 14:259-65.
 116. Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ, Atala A. De novo reconstruction of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. **Nat. Biotechnol.** 1998; 17:149-55.
 117. Merguerian PA, Reddy PP, Barrieras DJ, Wilson GJ, Woodhouse K, Bagli DJ, et al. Acellular bladder matrix allografts in the regeneration of functional bladders: evaluation of large-segment (>24cm²) substitution in a porcine model. **B.J.U. Int.** 2000; 85:894-8.
 118. Probst M, Dahiya R, Carrier S, Tanagho EA. Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. **B. J. U. Int.** 1997; 79:505-15.
 119. Kropp BP. Small intestinal submucosa for bladder augmentation: a review of preclinical studies. **World J. Urol.** 1998; 16:262-7.
 120. Sievert KD, Wefer J, Bakircioglu ME, Nunes L, Dahiya RJ, Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. **J. Urol.** 2000; 163:1958-654.
 121. Hill GA, Lewis AG, Sheldon CA. A rabbit model of free bladder mucosal grafting in a damaged urethral bed. **J. Urol.** 1994; 152:983-6.
 122. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction. **World J. Urol.** 2000; 18:67-70.
 123. Sherz HC, Kaplan GW, Boychuk DI, Hooward ML, Parriz H. Urtehral healing in rabbits. **J. Urol.** 1992; 148:708-10.
 124. Nanni L, Vallasciani S, Fadda G, Perrelli L. Free peritoneal grafts for patch urethroplasty in male rabbits. **J. Urol.** 2001; 165:578-80.
 125. Fairbanks JL, Sheldon CA, Houry AE, Gilbert A, Bove KE. Free bladder mucosal graft biology: unique engraftment characteristics in rabbits. **J. Urol.** 1992; 148:663-6.
 126. Weiss RE, Garden RJ, Stone NN. Isograft bladder mucosal transplantation for hypospadias repair in identical twins. **J. Urol.** 1993; 150:1884-5.
-

-
127. Quitzan JG. Efeitos tardios da secção unilateral ou bilateral do nervo pélvico na avaliação urodinâmica e histopatológica da bexiga de cães. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2004.
 128. Burke JP, Garibaldi RA, Britt MR, Jacobson JA, Conti M, Alling DW. Prevention of catheter associated urinary tract infections. Efficacy of daily meatal care regimens. **Am. J. Med.** 1981; 70:655-8.
 129. Olwasanmy J, Chapvil MA. Comparative study of four materials in local burn care in rabbits model. **J. Trauma** 1976; 16:348-53.
 130. Shapiro SR. Complications of hypospadias repair. **J. Urol.** 1984; 131:518-22.
 131. Taneli F, Ulman C, Gene A, Yilmaz O, Taneli C. Biochemical analysis of urethral collagen content after tubularized incised plate urethroplasty: an experimental study in rabbits. **Urol. Res.** 2004; 32: 219-22.
 132. El-Assmy A, Hafez AT, El-Sherbiny MT, El-Hamid M, Mohsen T, Nour EM, et al. Use of single layer of small intestinal submucosa for long segment ureteral replacement: A pilot study. **J. Urol.** 2004; 171:1939-42.
 133. Yao LY, Tekgu S, Kim KK, Li H, Mitchell ME, Carr MC. Developmental regulation of collagen differentiation expression in rabbit bladder. **J. Urol.** 1996; 156:565-70.
 134. Ewalt DH, Howard OS, Blyth B, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM, et al. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? **J. Urol.** 1992; 148:544-9.
-

APÊNDICE

Parecer favorável da comissão de ética em pesquisa experimental desta universidade.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

BOTUCATU, SP - RUIBÃO JÚNIOR - CEP 13618-970 - FONE E FAX (014) 6802-6143

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 301, sobre o projeto de pesquisa intitulado “**Enxerto de matriz acecular de colágeno na substituição parcial da uretra. Estudo experimental em coelhos**” sob a responsabilidade do **Prof. Dr. João Luis Amaro**, com a participação do **Dr. Paulo Roberto Kawano**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os **coelhos** são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir atestado de sanidade.

Projeto de pesquisa aprovado em reunião da CEEA aos 24 de fevereiro de 2003

Prof. Dr. Antero Frederico M. Miranda
Presidente

Alberto Santos Capelluppi
Secretário

Tabela 1: Relação do peso corpóreo dos animais* em dois momentos distintos M0 ** e M1***, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
	M0	M1	M0	M1	M0	M1
1	3200	3610	3470	3950	2380	3200
2	3300	3800	3000	3850	3750	3930
3	2360	3850	3150	3650	2140	3460
4	3480	3780	2300	3300	2140	3220
5	1860	3000	2700	3520	2160	3600
6	3680	3740	2250	2970	2010	3650
7	2350	3070	3000	3740	2070	3350
8	3420	3720	1850	3410	1830	3260
9	2220	3080	2560	4000	1800	3560
10	2440	3370	3500	3750	2300	3310
11	2360	3160	2570	3980	2310	3200
12	2370	3870	2470	3330	2580	3820

* Valores expressos em gramas. ** M0: Início do experimento. *** M1: Momento final (sacrifício).

Tabela 2: Relação da área uretral* pela uretrografia em dois momentos distintos M0** e M1***, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III	
	M0	M1	M0	M1	M0	M1
1	1,99	2,03	1,58	1,94	2,78	2,32
2	1,88	1,52	1,78	1,48	1,53	1,45
3	1,8	1,32	2,07	2,05	1,45	1,55
4	1,3	1,24	1,28	1,5	1,57	1,69
5	1,85	2,3	1,45	1,56	1,64	1,98
6	1,33	2,03	1,35	1,77	1,21	1,42
7	1,32	1,58	1,15	1,88	1,46	1,51
8	1,53	2,05	1,21	1,93	1,37	1,87
9	1,56	2,5	2,0	1,91	2,12	1,57
10	1,92	1,85	2,0	1,96	1,58	1,56
11	1,72	2,04	1,56	1,76	1,66	1,67
12	2,18	1,99	1,43	1,14	2,06	1,83

* Valores expressos em centímetros quadrados. ** M0: Início do experimento. *** M1: Momento final (sacrifício).

Tabela 3: Valores dos diâmetros longitudinal e transversos* utilizados no cálculo da área do enxerto** pela fórmula da elipse, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I			GRUPO II			GRUPO III		
	LONG	TRAN	ÁREA	LONG	TRAN	ÁREA	LONG	TRAN	ÁREA
1	7	3	16,49	7	3	16,49	10	2	12,56
2	7	4	21,99	8	3	18,84	7	2	10,99
3	6	3	14,13	8	3	18,84	7	3	16,49
4	8	4	25,13	8	3	16,49	7	2	10,99
5	6	3	16,49	7	3	16,49	6	4	14,13
6	5	2	16,49	9	4	21,99	7	2	10,99
7	8	5	25,13	7	3	16,49	7	3	16,49
8	9	2	28,27	7	2	18,84	6	2	14,13
9	10	5	21,99	6	3	18,84	6	3	14,13
10	9	2	18,84	6	3	14,13	6	3	16,49
11	7	4	21,59	4	2	21,99	6	3	16,49
12	8	6	25,13	6	3	14,13	8	2	12,56

* Valores expressos em milímetros.

LONG: Diâmetro longitudinal.

** Valores expressos em milímetros quadrados.

TRAN: Diâmetro Transverso.

Tabela 4: Valores do cálculo da área* pelo *software* Scion Image, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III
1	47,9	46,98	44,8
2	34,6	82,9	44,8
3	45,8	46,3	62,4
4	43,9	83,3	34,8
5	49,6	47,8	44,3
6	43,8	71,5	53,0
7	44,1	38,6	36,7
8	55,6	70,9	31,2
9	72,0	70,2	68,8
10	32,6	69,8	33,7
11	44,6	43,2	41,7
12	42,6	30,0	41,8

* Valores expressos em milímetros quadrados.

Tabela 5: Valores da análise dos parâmetros histológicos* da área do enxerto, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I				GRUPO II				GRUPO III			
	INF	FIB	EPT	NEO	INF	FIB	EPT	NEO	INF	FIB	EPT	NEO
1	3	3	3	3	1	3	2	1	1	2	2	1
2	2	3	2	2	1	2	1	1	1	3	2	1
3	1	3	2	1	1	2	1	1	3	3	2	2
4	1	2	2	1	1	3	1	1	1	3	2	1
5	1	3	3	1	2	3	1	1	1	2	2	3
6	1	2	1	1	1	3	2	2	2	3	3	1
7	1	3	2	1	2	3	2	2	1	2	3	3
8	1	3	1	1	1	3	2	1	1	3	1	1
9	2	3	2	2	1	3	1	2	2	2	3	1
10	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1
11	1	3	2	1	1	3	2	2	1	2	3	1
12	1	3	3	1	2	3	2	2	1	3	2	1

* Intensidade: Leve=1, Moderado=2 e Intenso=3.

INF: Infiltrado inflamatório. **FIB:** Fibrose. **EPT:** Regeneração epitelial. **NEO:** Neovascularização

Tabela 6: Dados individuais da área ocupada por cada subtipo de colágeno, em micrômetros quadrados, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAIS	GRUPO I			GRUPO II			GRUPO III		
	TIPO I	TIPO III	TOTAL	TIPO I	TIPO II	TOTAL	TIPO I	TIPO II	TOTAL
1	952688	14960	259580	702524	1016	220464	853040	12052	253140
	1032484	12210	575404	779952	1904	454764	850260	11616	138240
	814764	15316	263168	777228	1544	510568	879252	12868	195492
	771244	15712	271632	819336	1880	544967	907392	32060	181944
2	1157968	6696	232620	798180	520	380572	760792	15220	53784
	1118036	8892	182184	899984	540	293304	887552	24180	19012
	1077672	29884	34228	904056	1360	290100	866548	41084	81590
	1041940	35472	62104	894532	1280	336348	854564	13492	51804
3	848008	11144	78192	787616	1720	489156	704460	52932	370200
	800600	7516	67192	870424	2040	554580	735392	65156	2183470
	951112	7608	86328	789140	2202	278764	903848	274888	197396
	908552	73258	75235	812600	1572	111100	803044	35996	363232
4	904292	58500	189048	929852	1320	466728	637784	51544	364272
	882272	35840	154536	974628	1360	493484	828912	28364	556772
	897156	29032	150444	858672	1161	503440	776552	193,24	561952
	889098	40345	160467	838948	1300	529636	905200	430,92	5874880
5	985160	96044	157824	1012132	12668	140548	756240	1200	853996
	988604	61268	172700	867604	2488	130864	739748	1308	1021468
	946188	33432	30140	757144	3024	196296	785268	2520	1007352
	973456	34264	25040	878650	3554	161080	736384	3032	944612
6	1046172	33412	62180	771956	576	304764	575208	12676	732964
	1059952	87064	61760	742800	276	111896	936828	15956	964432
	1100760	48288	63100	737857	498	199768	902961	27304	1011760
	932004	40928	123160	776899	354	216892	751500	19644	938536
7	931304	126496	42052	841176	6736	172528	674152	26748	517884
	1061496	182844	32048	949332	1760	194664	729712	27820	567700
	975320	124840	151940	685644	1972	158896	685168	16264	640732
	997940	143148	44892	824561	2214	175300	691620	17800	510372
8	928884	163916	57172	942496	1248	623280	913888	1760	949156
	797792	143272	186784	904328	1400	572084	689620	2632	940276
	892956	161812	116468	938984	1884	679456	923452	1852	545092
	864520	156912	48156	881748	1204	771224	822436	2316	780552
9	1017176	16360	397612	999664	1203	497952	783108	55764	483824
	1043880	42744	136424	912704	1360	823400	689132	30548	471632
	1041348	30524	132196	907589	1324	640965	685128	23888	460968
	1041260	71732	139060	1004779	1238	680391	719323	36700	470143
10	949600	1520	36216	731004	1840	172340	867180	6020	639852
	1005612	1668	183844	750696	1664	240236	862336	3092	544504
	970032	1444	271744	755076	1440	303140	808404	3312	542204
	1095296	1328	125568	642320	1348	345056	779732	2348	572324
11	983272	1480	73732	574748	1300	94308	695072	2268	566752
	1037688	2428	146148	749280	5124	218016	712340	66636	975320
	1037216	1012	115236	743060	4928	158832	749788	2952	756160
	876820	1516	94644	723420	3416	226408	703064	1996	826096
12	970968	2152	13120	675696	2488	212716	726260	3408	209832
	931124	2292	58840	776368	2736	483180	840548	3836	533400
	894732	3780	14044	675164	2152	192162	791248	3396	513748
	875544	1920	54372	700976	2566	290601	919620	3288	615372

TIPO I: Colágeno tipo I.

TIPO III: Colágeno tipo II.

TOTAL: Colágeno total.

Tabela 7: Dados individuais da média da área ocupada por cada subtipo de colágeno em micrômetro quadrados e seus respectivos índices de proporcionalidade, segundo diferentes grupos de estudo.

ANIMAL	GRUPO I			GRUPO II			GRUPO III		
	TIPO I	TIPO III	TIII:TI	TIPO I	TIPO III	TIII:TI	TIPO I	TIPO III	TIII:TI
1	14549,5	342446	23,53	1586	432690,75	272,81	17149	192204	11,20
2	20236	127784	6,31	925	325081	351,43	23494	51547,5	2,19
3	8756	77237,33	8,82	1883,5	358400	190,28	107243	778574,5	7,25
4	40929,25	163623,75	3,99	1285,25	498322	387,72	20133,04	1839469	91,36
5	56252	96426	1,71	5433,5	157197	28,93	2015	956857	474,86
6	52423	77550	1,47	426	208330	489,03	18895	911923	48,26
7	144332	67733	0,46	3170,5	175347	55,30	22158	559172	25,23
8	156478	102145	0,65	1434	661511	461,30	2140	803769	375,59
9	40340	201323	4,99	1281,25	660677	515,65	36725	471641,75	12,84
10	1490	154343	103,58	1573	265193	168,59	3693	574721	155,62
11	1609	107440	66,77	3692	174391	47,23	18463	781082	42,30
12	2536	35094	13,83	2485,5	294664,75	118,55	3482	468088	134,43

TIPO I: Colágeno do tipo I.

TIPO III: Colágeno do tipo III.

TIII:TI: Relação colágeno tipo III:I.