

Juliany Gomes Quitzan

**Avaliação funcional e histológica do
enxerto tubular de matriz acelular
arterial heteróloga como substituto da
uretra em coelhos**

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

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho

Botucatu - SP
2009

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

Quitzan, Juliany Gomes.

Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular
arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos / Juliany Gomes
Quitzan. – Botucatu : [s.n.], 2009

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho
Assunto CAPES: 40102009

1. Uretra – Cirurgia. 2. Coelho como animal de laboratório. 3. Enxerto
arterial.

CDD 617.462

Palavras-chave: Coelho; Matriz acelular de aorta; Uretra.

Dedicatória

“**S**um dia já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que as tuas terras te desmoronam, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a maturidade, passa pela mocidade, volta à tua infância e balbucia entre lágrimas e esperanças as últimas palavras que te restarão na alma: minha Mãe, meu Pai”.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Luiz Carlos e Elma, pelo carinho e respeito com que me educaram. Agradeço pelas oportunidades a mim proporcionadas, independente do sacrifício necessário, por suas preocupações, pelas noites mal dormidas e pelos fios de cabelos brancos... Tenho certeza de que vocês jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Amo vocês!

Agradecimentos especiais

Ao Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, orientador desta pesquisa, agradeço pela simplicidade na transmissão de seus conhecimentos, paciência e compreensão durante minhas ausências. Agradeço ainda pela confiança depositada, proporcionando a oportunidade do meu ingresso ao Departamento de Urologia.

Às minhas queridas irmãs, **Alexandra**, **Patrícia** e **Karla**, que testemunharam meus esforços, sempre me incentivando a alcançar meus sonhos e realizar meus projetos de vida.

Aos meus filhos tão amados, **Willy** e **Scott**, meus companheiros, cuja sensibilidade indescritível me fazem ter certeza de que o verdadeiro e sincero amor, aquele que perdoa, compreende e fortalece, realmente existe.

Aos animais que participaram deste experimento, sem o qual não poderíamos realizar buscas em benefício da humanidade. A estes seres inocentes e dóceis, todo o meu respeito e eterno agradecimento.

Agradecimentos

Certa noite eu tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:

- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.

O Senhor me respondeu:

- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.

A Deus, por ser fonte de inspiração nas minhas dúvidas e incertezas, conduzindo-me pela estrada certa.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – *UNESP* e ao Curso de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, pela oportunidade oferecida para a concretização deste trabalho.

À *CAPES*, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

Aos docentes do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – *UNESP*, especialmente ao Prof. Titular José Carlos S. Trindade, Prof. Dr. Carlos Márcio N. de Jesus e Prof. Dr. Aparecido Donizette Agostinho, pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. João Luiz Amaro, pelos longos anos de amizade e atenção, pelas palavras de apoio e incentivo e por ser um exemplo de dedicação a esta Universidade.

À Profa. Dra. Renée L. Amorim, patologista e docente do Departamento de Clínica Veterinária – *UNESP*, pelo auxílio durante a análise histopatológica.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Padovani, docente do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – *UNESP*, pela análise estatística dos resultados.

À querida amiga Daniela Campagnol, por sempre ter me recebido com tanto carinho, pelo seu apoio fundamental em fases tão desafiadoras da minha vida.

Aos amigos Paulo Kawano, Ana Cláudia Kochi, Hamilto e Érica Yamamoto, e aos mascotinhos Rafaela e Gustavo, por todos os bons momentos proporcionados, por serem *SEMPRE* amigos de todas as horas.

Ao CESUMAR, Centro de Ensino Superior de Maringá, pelo apoio e incentivo para a conclusão desta etapa.

Aos amigos e alunos do CESUMAR, Centro de Ensino Superior de Maringá, especialmente ao Prof. Dr. Raimundo Tostes, Coordenador do Curso de Medicina Veterinária, pela compreensão durante meus períodos de ausência.

Aos funcionários do Laboratório Experimental de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, José Lucas de Carvalho e Mara Seabra, pelos auxílios imprescindíveis durante a fase experimental.

Ao Laboratório Experimental de Cirurgia da Faculdade de Medicina – UNESP, especialmente ao funcionário Carlos Edwalter Bardela, pela grande ajuda durante a realização dos exames radiográficos.

Ao funcionário da Seção de Fotografias da UNESP, Silvio, pela atenção e enorme paciência durante as longas manhãs que passamos juntos. E, acima de tudo, pelo profissionalismo e dedicação com os registros fotográficos.

Às funcionárias da Biblioteca Central de Botucatu – UNESP, Selma, pelo serviço catalográfico e Rosemary Cristina da Silva, pela amizade sincera e apoio na correção das referências.

À coordenadora da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, Janete Aparecida H. Nunes Silva e aos funcionários Regina Célia Spadin, Nathanael P. Salles e LÍlian C. N. Bianchi Nunes, por serem sempre tão atenciosos.

À Adnice e Abílio, não só pela brilhante capacidade, competência e responsabilidade na formatação e impressão da Tese, mas pela amizade e carinho, cuja distância jamais será suficiente para abalar.

À Andréa e Gláucia Chiamente, pelos anos de amizade e principalmente por estarem sempre prontas a me ouvir, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos Fabíola, Fábio Bim, Família Ramos e Família Bettini, minhas famílias em Maringá, por serem companheiros e me proporcionarem tantos bons momentos.

A todos os amigos que tanto amo, aos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto. Àqueles cuja barreira geográfica não foi suficiente para nos afastar....Enfim, algumas páginas seriam necessárias para citá-los mas infinitas seriam incapazes de expressar meus sentimentos.

Nota explicativa

A forma de apresentação desta Tese de Doutorado segue uma nova orientação da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com o objetivo de facilitar sua publicação em revista científica. Está dividida em dois capítulos.

O capítulo 1º corresponde à revisão da literatura a respeito da reconstrução uretral, citando os modelos experimentais e aplicações clínicas de diferentes materiais utilizados em uretroplastias.

O capítulo 2º refere-se ao trabalho intitulado: “Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos”, a ser posteriormente submetido à publicação.

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

CAPÍTULO 1 _____	17
1. REVISÃO DE LITERATURA	36
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	
 CAPÍTULO 2 _____	 51
RESUMO	52
SUMMARY	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. OBJETIVOS	58
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1- Preparo da matriz acelular heteróloga	59
3.2- Grupos experimentais e delineamento experimental	60
3.3- Parâmetros estudados	65
3.4- Análise estatística dos resultados	67
4. RESULTADOS	68
4.1- Peso corpóreo dos animais	68
4.2- Avaliação clínica	69
4.3- Avaliação radiográfica	70
4.3.1 – Avaliação de estenose	70
4.3.2 – Avaliação de fístula	73
4.4. Avaliação anatomopatológica da uretra	75
4.4.1 – Avaliação macroscópica	75
4.4.2 – Avaliação microscópica	76
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
APÊNDICE	108
ANEXO	110

Capítulo I – Revisão de Literatura

O tratamento cirúrgico das más formações congênitas, como epispádia e hipospádia e da estenose de uretra representa um desafio devido à frequente ocorrência de complicações como fístulas, estenoses, deiscências, entre outras. O sucesso das uretroplastias é influenciado pela experiência e habilidade do cirurgião, uso de material cirúrgico adequado e seleção da técnica apropriada¹. O urologista deve ter o conhecimento de diferentes técnicas, uma vez que uma única uretroplastia não é aplicável a todas as afecções uretrais^{1,2}.

Dentre as anomalias congênitas que ocorrem no trato urinário destaca-se a hipospádia, uma deformidade causada pela ausência de fusão das placas uretrais durante o desenvolvimento embrionário³. Tendências familiares e fatores genéticos estão relacionados à etiologia desta má formação, bem como o uso de hormônios durante a gestação. Mulheres submetidas ao uso de dietiestilbestrol apresentaram proles com maior incidência de hipospádia e outras anormalidades uretrais¹. Fatores ambientais também foram apontados como influentes na ocorrência de hipospádia, uma vez que produtos bioacumulativos causadores de contaminação do meio ambiente acumulam-se no tecido adiposo de peixes, pássaros e mamíferos marinhos e são considerados disruptores endócrinos para humanos⁴.

Normalmente a união das placas ocorre na superfície ventral da glândula, completando o desenvolvimento da uretra em torno do quinto mês³. O desenvolvimento uretral e genital normal é dependente dos níveis hormonais intra-uterinos durante a maturação embriológica⁵. Os níveis maternos de progesterona podem afetar a concentração de diidrotestosterona⁵ e, se há interrupção do estímulo androgênico o meato se forma em um ponto distal ao ponto de fusão³.

O meato ectópico caracteriza a hipospádia em distal ou anterior quando este se abre no terço distal do pênis ou acima dele, perfazendo aproximadamente 65% dos casos. A posição subcoronal é a mais comum. Nas hipospádias posteriores, o meato está localizado proximalmente, na região escrotal ou perineal¹.

Além do desenvolvimento incompleto da uretra, os pacientes acometidos pela hipospádia apresentam com frequência uma curvatura peniana ventral (“corda”), em decorrência de tecido fibroso e inelástico que se prolonga a partir do meato ectópico para o sulco coronal³. A curvatura é mais significativa quanto mais proximal estiver localizado o meato uretral ectópico. A presença da placa uretral, deformidade na configuração da glândula e ausência de prepúcio ventral (capuchão) são outras características que podem ser observadas em pacientes com hipospádia⁴.

Das afecções traumáticas que causam estenose uretral, 60 a 80% são de origem iatrogênica, secundárias às infecções uretrais, cateterismo prolongado e cirurgias transuretrais^{1,7}. A uretra pode ser ainda lesionada por espículas ósseas associadas a fraturas pélvicas⁸, por armas brancas e projéteis balísticos⁹.

Nas lesões estenóticas menos complexas, uretrotomia e dilatação uretral são os tratamentos utilizados com maior frequência^{8,9}, apesar dos altos índices de recorrência e provável necessidade de reparo cirúrgico futuro⁹. Estenoses não complicadas, com 1 cm ou menos de comprimento, podem ser tratadas com sucesso por meio de ressecção e anastomose término-terminal¹⁰. Um levantamento recente, avaliando 153 pacientes com estenose bulbar, mostrou que 90,8% evoluíram com bom prognóstico. Neste estudo, os piores resultados foram observados nos pacientes com histórico de tratamentos anteriores¹¹.

Em casos extremos, envolvendo pacientes com histórico de cirurgias prévias e alto grau de deformidade ou ainda para correções das anomalias congênitas como hipospádia, a uretroplastia com outro tecido ou material torna-se necessária. Inúmeras pesquisas destinam-se a encontrar um substituto uretral ideal, com o objetivo principal de evitar múltiplas cirurgias^{12,13}, reação tecidual exacerbada, estenose e fístula, fatores potencias que podem comprometer a patência do lúmen uretral². O material

utilizado deve ser biocompatível, apresentar estabilidade química com a urina, impedindo sua passagem para o tecido adjacente, possuir resistência mecânica à tração, permitir epitelização de sua luz e neovascularização¹⁴. Além disso, não deve conter pêlos ou porosidades que permitam incrustações calcáreas ou bacterianas¹⁵, sendo resistente à infecções¹⁶.

A reconstrução uretral pode ser feita com diferentes tecidos autólogos tais como pele, mucosa bucal ou vesical, veia, segmentos gastrointestinais e ureter ou por materiais sintéticos como silicone, teflon, dacron. Nos últimos anos, destacam-se as pesquisas utilizando biomateriais acelulares como submucosa intestinal, mucosa vesical, colágeno bovino, colágeno vesical e artéria^{15,17}.

O tecido autólogo ideal deve ser facilmente obtido e, principalmente, promover neovascularização¹⁴. Também contribui para o sucesso no uso de enxertos a boa vascularização do leito receptor e imobilidade para permitir adequadas trocas nutricionais entre o enxerto e o leito^{8,18}, pois inicialmente o enxerto sobrevive pela difusão de nutrientes entre doador e receptor. Esta fase é chamada embebição e dura aproximadamente 48 h. Após este período, novos vasos são formados para nutrirem o enxerto entre o 2º e 4º dias pós-operatório e a circulação é restabelecida¹⁸.

Diversos tecidos doadores autólogos, utilizados em ensaios experimentais ou clínicos, mostraram suas vantagens e desvantagens. A reconstrução primária utilizando retalhos vascularizados de prepúcio ou pele do pênis é indicada como primeira opção na maioria das uretroplastias^{19,20}. A técnica de Snodgrass é atualmente uma das mais utilizadas em hipospádias distais, com tubulização da placa uretral incisada, observando-se aproximadamente 10% de complicações²¹. Quando a localização do meato é proximal, a técnica do prepúcio transverso pediculado (*onlay island flap*) passa a ser uma alternativa viável¹⁹. Os resultados obtidos dependem também da anomalia a ser corrigida e do local da implantação do enxerto ou retalho. Casos severos de hipospádia, pacientes submetidos à múltiplas cirurgias ou submetidos à postectomia do capuchão não são beneficiados por esta técnica^{9,22}.

Quando não há disponibilidade para o uso de retalho vascularizado, pode-se optar pelos enxertos de pele^{14,18,22,23}. A necessidade de local doador com ausência de pêlos é uma das dificuldades desta técnica e, dentre os enxertos de pele extragenital, pode-se utilizar pele da região inguinal, supraclavicular, crista ilíaca, coxa e nádegas²⁴, de espessura total ou parcial. Além da cicatriz e deformidade cosmética, o uso da pele tem sido associado à morbidade devido ocorrência de contratura do enxerto²², formação de estenoses, divertículos, cálculos e fístulas²⁵⁻²⁹. Atualmente,

este tipo de enxerto não apresenta aplicação prática na reconstrução uretral, ficando seu uso restrito em substituição à túnica albugínea na Doença de Peyronie³⁰.

A túnica vaginal é um tecido estudado em uretroplastias devido à facilidade de obtenção, com baixa morbidade, ausência de pêlos e resistência à tensão. Avaliações experimentais demonstraram complicações com enxerto tubulizado, em comparação aos bons resultados observados com a utilização *onlay*¹². Segundo os autores, a contração das fibras cremastéricas foi responsável pela morte de todos os animais que receberam o enxerto na forma de tubo. O sucesso no reparo da uretra dorsal com enxerto de túnica vaginal em coelhos também foi relatado por Calado et al²⁰. A aplicação clínica desta técnica em pacientes com estenose anterior foi satisfatória, promovendo patência funcional e anatômica da uretra³¹.

As mucosas vesical e bucal foram outros materiais alternativos pesquisados para a correção do defeito uretral, desde a metade do século passado^{32,33}. Após os resultados obtidos ao longo do tempo, prevaleceu como primeira escolha o enxerto de mucosa bucal.

A mucosa vesical apresenta como principais vantagens a adaptação deste tecido à urina^{18,23}, a fina espessura permitindo nutrição por ação capilar e o alto potencial de regeneração, associado a um baixo metabolismo basal⁸. Na década de 80, estudos com este material apresentaram até 95% de sucesso³⁴. Hendren e Redá³⁵ descreveram o uso

desta mucosa na uretroplastia de 35 pacientes, sendo 34 tubulizadas, e não observaram fístulas e estenoses. Entretanto, outros autores não alcançaram resultados tão expressivos com a implantação da mucosa vesical na uretra e relataram complicações em até 69% das cirurgias realizadas^{26,36-38}.

Apesar dos diversos relatos de ocorrência de fístulas e estenoses, o prolapso de mucosa vesical pelo meato uretral é citado como complicação frequente^{18,23,35,39}. Alguns autores referem que não há necessidade de retalho maior do que o necessário, pois a retração não é tão importante como nos casos da pele e o excesso de comprimento do enxerto predisporia à eversão e prolapso^{18,39}. Os diâmetros maiores ainda podem dobrar sobre si dentro da glândula, dificultando vascularização e aumentando a possibilidade de contração e fibrose⁴⁰. A associação de segmentos de pele na porção distal para proteger a mucosa vesical do contato direto com o ar é citada como opção cirúrgica viável para evitar tais complicações³⁶.

Contra-indicações para a utilização de mucosa vesical são bexiga não complacente, secundária a quadros neurogênicos, infecções de repetição, vesicostomia prévia e extrofia vesical. Adicionalmente; a necessidade de incisão cirúrgica abdominal para coleta deste tecido é invasiva e aumenta a morbidade do procedimento^{9,37,41}. Este relevante aspecto também deve ser considerado em cirurgias onde segmentos intestinais do íleo⁴², apêndice⁴³, ureter⁴⁴ e peritônio^{45,46} foram utilizados

como alternativa para reconstrução uretral, apesar dos resultados satisfatórios referidos pelos autores.

A mucosa bucal apresentou grande aceitação como substituto uretral^{47,48} e, a partir da década de 90 há relatos de excelentes resultados observados nas primeiras citações clínicas⁴⁹, mesmo quando utilizada em pacientes submetidos à múltiplas cirurgias para correção de hipospádia⁵⁰. No reparo de estenoses de uretra bulbar, a média de sucesso da técnica foi de até 90%^{51,52}. Barbagli et al.^{10,53} demonstraram índices semelhantes de bons resultados com a utilização do enxerto em diferentes localizações na uretra bulbar (lateral, dorsal ou ventral).

As características favoráveis ao bom resultado deste material em uretroplastias incluem ausência de pêlos, facilidade de obtenção, presença de um fino epitélio, rico em elastina e lâmina própria bem vascularizada, facilitando a embebição e inosculação do enxerto⁵⁴ e maior resistência à infecção⁵⁵. Alguns autores consideram que as vantagens da mucosa bucal e os resultados satisfatórios, comparáveis aos índices de sucesso das reconstruções uretrais primárias, a tornam o material de escolha nas uretroplastias complexas^{55, 56}.

A superioridade da mucosa bucal é evidente em vários relatos da literatura. Estudos experimentais de uretroplastias comparando mucosa vesical, mucosa bucal e pele peniana observaram menor incidência

de estenose, reação inflamatória e fibrose nos animais tratados com mucosa bucal³⁷. O uso de pele peniana na reconstrução uretral apresentou 27% de falhas⁵⁷, comparado à 16% de complicações com enxerto de mucosa bucal⁵⁸. A pele peniana, apesar de ser o material sugerido em considerável número de uretroplastias, apresenta elasticidade inferior à mucosa bucal⁵⁹.

As complicações no local de coleta da mucosa bucal ocorrem em menos de 30% dos casos⁶⁰ e incluem hemorragia intra-operatória, hematoma facial, lesões inadvertidas de ducto parotídeo⁶⁰⁻⁶² e retração da cicatriz, com distorção facial ou labial⁶¹. Alterações de sensibilidade devido à lesão neurológica ou dor são os principais inconvenientes observados a longo prazo⁶⁰⁻⁶².

Enxertos tubulizados, incluindo tubos de mucosa bucal, estão associados a maior número de complicações, principalmente estenoses e fístulas, quando comparados com enxertos “onlay”^{37,55,62-66}. Na literatura nacional, Paulo et al.⁶⁷ observaram 30% de estenose 60 dias após uretroplastias tubulares em cães.

A eliminação da linha de sutura longitudinal para a confecção do tubo pode diminuir a formação de fístulas, além de diminuir o tempo cirúrgico e morbidade do procedimento^{68,69}. Considerando-se estas particularidades, a busca de opções por enxertos tubulares incentivou novas pesquisas.

O enxerto de veia é um biomaterial autólogo tubular citado na literatura em reconstrução uretral experimental^{41,68,70}. Segundo Foroutan et al.⁴¹, veias como safena e jugular externa são facilmente acessíveis e a excisão não provoca efeitos adversos significativos no paciente. Baixos índices de estenose e fístula foram relatados. O uso do enxerto de veia invertida, quando comparado ao enxerto sem eversão, parece estar relacionado a menores índices de complicação, provavelmente devido à melhor nutrição através do endotélio.

Shaeer e El-Sadat⁶⁹ relataram sucesso clínico com o uso da veia safena para correção de hipospádia. O calibre adequado ao da uretra, elasticidade e eliminação de sutura longitudinal são citados pelos autores como vantagens da técnica. O procedimento de coleta da veia apresenta menor morbidade se comparado ao acesso abdominal, mas o acréscimo no tempo cirúrgico deve ser analisado.

Materiais sintéticos apresentam como vantagens a pronta disponibilidade em diversos tamanhos e formatos, com conseqüente diminuição do tempo cirúrgico e facilidade de obtenção¹⁵. Dentre eles, foram utilizados em uretroplastias experimentais próteses de silicone^{71,72}, teflon⁷³, dacron siliconizado⁷⁴⁻⁷⁶ e politetrafluoretileno (Gore-tex®)⁷⁷. Apesar da melhor proliferação celular observada nos tubos de dacron siliconizado, infecções, calcificações, fístulas, reações imunológicas do tipo

corpo estranho e extrusão do enxerto ocorreram com frequência, demonstrando a baixa biocompatibilidade destes materiais em longo prazo, sem integrar-se ao tecido do hospedeiro^{16,78}. As próteses sintéticas inabsorvíveis cederam então cada vez mais espaço ao uso de materiais biodegradáveis que viabilizassem a regeneração tecidual, com formação de neouretra.

Atualmente, a engenharia de tecidos tem oferecido novas oportunidades terapêuticas em situações onde os tratamentos urológicos convencionais podem ser ineficazes⁷⁹. Transplante celular e bioengenharia são os princípios básicos desta ciência e coordenam o desenvolvimento de substitutos biológicos, por meio de tecnologia *in vitro* ou *in vivo*^{17,28}.

A tecnologia *in vitro* envolve o desenvolvimento laboratorial de cultivos celulares, utilizados para estimular regeneração de determinado tecido. Já a tecnologia *in vivo* viabiliza materiais biodegradáveis, conhecidos como **matrizes**, com função de determinar a orientação e direção do crescimento celular, considerando-se a reparação natural dos tecidos^{17,28}. A combinação de ambas estas técnicas é frequente, associando-se, por exemplo, a implantação de matrizes previamente semeadas com células cultivadas^{17,63,80}.

As matrizes extracelulares absorvíveis são gradativamente substituídas pelo tecido local em crescimento, fornecendo um suporte

estrutural e proteínas necessárias para replicação celular, como peptídeos de adesão e fatores de crescimento²⁸. Outro ponto importante é a baixa antigenicidade, por ser avascular e acelular⁸¹. Três classes de biomateriais destacam-se no desenvolvimento de matrizes utilizadas em tecidos geniturinários – polímeros sintéticos, materiais naturais (colágeno) e tecidos acelulares (submucosa vesical, submucosa intestinal suína, artérias)²⁸.

Dentre as matrizes sintéticas utilizadas para reconstrução uretral, há relatos de estudos experimentais com malha composta por hialuronan⁸² e ácido poliglicólico, associado⁸³ ou não ao ácido polihidroxibutírico⁸⁴. A avaliação histológica destes trabalhos mostrou completa regeneração do urotélio e degradação dos polímeros⁸²⁻⁸⁴.

Embora a possibilidade de reprodução em larga escala com propriedades controladas (desidratação, microestrutura) seja uma característica favorável ao uso de matrizes sintéticas, materiais naturais e tecidos têm vantagens biológicas, causando mínima reação no hospedeiro²⁸. Porém, quando os tecidos são utilizados como matéria-prima para confecção da matriz, é necessário instituir rigoroso preparo que garanta a descelularização.

Métodos físicos, químicos e enzimáticos têm sido propostos para otimizar o nível de remoção celular. O protocolo de descelularização deve garantir a máxima preservação da matriz acelular,

sem alterar sua estabilidade biomecânica^{85,86}. As substâncias utilizadas neste processo precisam ainda ter mínimo efeito residual, para não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo⁸⁵.

A descelularização física pode ser obtida por agitação, congelamento, dissecação dos tecidos ou aplicação de força mecânica. Em intestino delgado e bexiga urinária, órgãos com planos de dissecação caracterizados, os dois últimos métodos são efetivos e causam mínima ruptura na arquitetura tridimensional da matriz⁸⁷. A submucosa intestinal suína (SIS) é um importante exemplo de matriz obtida por este método.

Os detergentes iônicos são efetivos na solubilização de membranas celulares citoplasmáticas e nucleares. O desoxicolato de sódio (DCA) e o dodecil sulfato de sódio (SDS) pertencem a esta classe e são utilizados para a descelularização de tecidos. O DCA é um detergente extraído da bile, mas seu uso isolado não promove eficiente remoção de células. Pode ser associado a métodos enzimáticos ou a outros detergentes (não iônicos/ mistos)⁸⁷. É empregado na confecção de diferentes matrizes, incluindo enxertos valvares^{88,89}. Em uretroplastias, segmentos de bexiga⁹⁰, uretra^{13,91,92} e aorta⁹³ descelularizados por este método foram utilizados em ensaios experimentais.

O dodecil sulfato de sódio (SDS) faz parte da composição química de muitos cosméticos, produtos para higiene e limpeza. A

investigação das suas propriedades aplicadas à bioengenharia é observada principalmente nas pesquisas cardiovasculares, envolvendo descelularização de próteses valvares^{61,94,95}. Schaner et al.⁸⁶ referem que o detergente é capaz de lisar células uniformemente, em todas as camadas do tecido.

Um exemplo de detergente não iônico bastante citado em processos de descelularização é o Triton-X. Diversos estudos citam seu uso em associação com o hidróxido de amônio, no preparo de matriz de submucosa vesical^{63,66,96,97}. Esta substância age rompendo interações entre lipídeos e proteínas.

No Brasil, Goissis et al.⁹⁸ descreveram técnica utilizando DMSO e ácido bórico para descelularização de vasos sanguíneos, originando uma matriz tubular de colágeno e elastina. Segundo os autores, a melhor preservação estrutural ocorreu nas matrizes arteriais. Além do conhecimento e análise das diferentes técnicas existentes, a escolha do adequado método de descelularização deve ser baseada nas características individuais de cada tecido⁸⁷.

O SIS é a matriz acelular mais estudada em reconstruções urológicas. Trata-se da submucosa dissecada do jejuno de porcos, comercializada na forma estéril, em diferentes apresentações^{17,28,91}. Sua estrutura é formada basicamente por fibronectina, glicosaminoglicanas,

colágeno Tipo I e Tipo IV e, apesar de sua fina espessura (0,1mm), apresenta propriedades mecânicas satisfatórias. Os primeiros relatos do SIS no trato urinário focaram sua utilização em ampliações vesicais^{99,100}, provando que o material forneceu uma base estrutural, permitindo regeneração e remodelação da bexiga. Os bons resultados encorajaram pesquisadores a testarem o material em uretroplastias.

Esta membrana foi inicialmente implantada na uretra de coelhos²⁷. Os autores demonstraram crescimento de células epiteliais, com regeneração da parede uretral previamente lesionada, resultado semelhante ao observado em pesquisas subsequentes^{101,102}. Nos enxertos *onlay*, não ocorreram casos de estenose^{27,102} e fístulas com o uso do SIS em 4 camadas não ultrapassaram 6%¹⁰². Por outro lado, o número de camadas do SIS não pareceu influenciar a ocorrência de fístula, conforme descrito por Kawano²⁹, em 2007. Neste experimento, a porcentagem de fístula entre os grupos que envolviam o uso de SIS com 1 ou 4 camadas foi a mesma (8,3%). Grossklaus et al.² sugeriram a utilização do SIS em ilha para prevenção de fístula em uretrotomias experimentais, obtendo bons resultados.

As pesquisas experimentais forneceram uma base sólida para o uso do SIS em casos clínicos. Em Milão, onde 20 pacientes foram submetidos à uretroplastia peniana ou bulbar utilizando SIS, não houve

relato de infecção ou rejeição e 85% apresentaram boa evolução, incluindo calibre uretral adequado, observado na cistoscopia¹⁰³.

Contudo, nem todos os cirurgiões obtiveram resultados satisfatórios em seus pacientes. Soergel et al.¹⁰⁴ relataram 33% de complicações com o SIS em correções de hipospádias complexas, taxa esta superior à obtida com utilização de outros enxertos, como pele ou túnica vaginal. No reparo uretral endoscópico com tubo de SIS, o insucesso da técnica deveu-se à contratura do enxerto e formação de estenose¹⁰⁵. Diante dos dados apresentados nos diferentes trabalhos, é possível concluir que os melhores resultados foram obtidos com o uso de enxerto *onlay* de SIS, quando comparado com o enxerto semi-tubular¹⁰⁶ ou tubular do mesmo material^{101,105}, apesar da regeneração urotelial observada.

Outros tipos de matrizes acelulares feitas a partir de diferentes tecidos, como bexiga, uretra⁸¹ ou vasos sanguíneos⁹⁸ ainda não estão comercialmente disponíveis⁸¹. Possuem características semelhantes ao SIS⁸¹, permitindo crescimento endotelial, muscular e de vasos sanguíneos⁹³.

A matriz acelular obtida a partir da submucosa vesical suína é um exemplo deste material^{78,107}, que foi utilizado para correção de defeitos experimentais em uretra ventral. No estudo, não foram relatadas ocorrência de estenose ou disfunções miccionais e feixes organizados de fibras musculares estavam evidentes aos 6 meses de pós-operatório¹⁰⁷.

Enxertos de submucosa vesical obtidas de doador falecido foram confeccionados e avaliados por Atala et al.¹⁰⁸. Os autores relataram sua experiência com o uso da matriz acelular homóloga em pacientes com hipospádia e, apesar do grupo restrito (4 pacientes), os resultados foram promissores, com ocorrência de uma fístula. Em pacientes com estenose uretral, o uso *onlay* desta matriz foi acompanhado por bons resultados, onde 24 de 28 pacientes não apresentaram complicações durante acompanhamento médio de 37 meses⁹⁷.

Semelhante ao SIS e aos materiais autólogos descritos anteriormente, a utilização de matriz acelular vesical tubulizada^{63,80} não demonstrou os mesmos índices de sucesso referidos com seu uso *onlay*, sendo que os animais envolvidos nos estudos apresentaram estenoses importantes e fístulas. O cultivo *in vitro* com posterior implantação de células autólogas epidermais⁶³ ou da musculatura lisa⁸⁰ na matriz acelular tubulizada otimizou significativamente estes resultados, com total integração da matriz ao tecido do hospedeiro. Os autores consideraram a necessidade de semeadura celular em casos onde a tubulização da matriz vesical seja necessária^{63,80}.

A confecção de matrizes acelulares a partir de materiais tubulares reúne a vantagem da eliminação da confecção do tubo, considerando-se as já citadas complicações inerentes a este procedimento. A uretra oriunda de diferentes espécies animais (hamster¹⁰⁹, coelho^{13,91,109} ou cão^{91,92,99}) serviu como base para a criação de matrizes em diversas

pesquisas. A utilização das matrizes como enxertos homólogos^{13,92,99,109} ou heterólogos^{91,109}, na uretroplastia mostrou bons resultados nos defeitos com até 1 cm de comprimento^{13,91,109}. A ocorrência de fístula foi citada apenas nos enxertos uretrais homólogos^{91,92}. Nos implantes heterólogos, observou-se presença de feixes de fibras musculares na matriz, integração à uretra, neovascularização e mínima reação, sem sinais de rejeição⁹¹. Altas taxas de insucesso foram relatadas nos enxertos homólogos com 3 cm de comprimento, utilizados para restabelecer viabilidade uretral em cães⁹².

Em 2000, Parnigotto et al.⁹³, descreveram o uso de aorta torácica acelular homóloga na substituição uretral em coelhos. Reações cicatriciais, fibrose e resposta inflamatória foram mínimas em todos os animais, havendo integração completa da matriz ao hospedeiro aos 3 meses de pós-operatório.

A aorta acelular também foi avaliada por Trindade Filho¹⁵ em uretra de coelho, na forma *onlay*. Os resultados foram satisfatórios, não havendo diferenças consideradas significantes entre o uso de aorta acelular e mucosa bucal autóloga.

Considerando-se os importantes benefícios inerentes ao uso de matrizes acelulares, dentre elas a pronta disponibilidade do material, sem necessidade de procedimento adicional para coleta do enxerto, e a redução do tempo cirúrgico, bem como da morbidade pós-operatória, os resultados promissores apresentados em uretroplastia justificam o contínuo investimento em pesquisas nesta área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

1. Keating MA, Kaefer M. Manegement of hypospadias and circumcision. In: Siroky MB, Fitzpatrick JM, editors. Clinical Urology. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1994. p. 1298-1324.
2. Grossklaus DJ, Shappell SC, Adams MC, Brock JW. Small intestinal submucosa as a urethral coverage layer. J Urol. 2001; 166: 636-9.
3. Baran CN, Tiftikcioglu YO, Ozdemir R, Baran NK. What is new in the treatment of hypospadias? Plast Reconstr Surg. 2004; 114: 743-52.
4. Macedo Jr AM, Souza PO, Leslie B. Hipospádias e outras anomalias genitais masculinas correlatas. In: Neto Jr NR, editors. Urologia Prática. São Paulo: Ed. Roca; 2008. p. 342-54.
5. Aarskog, D. Maternal progestins as a impossible cause of hypospadias. Apud Weiss RE, Garden RJ, Stone NN. Isograft bladder mucosal transplantation for hypospadias repair in identical twins. J Urol. 1993; 150: 1884-5.
6. Macedo Jr A, Srougi M. Hipospádias. Rev Ass Med Bras. 1998; 2: 141-5.

¹ Normas para referências bibliográficas – Vancouver - International Committee of Medical Journal Editors Uniform - Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

7. Andrich DE, Mundy AR. What's the best technique for urethroplasty? *Eur Urol.* 2008; 54: 1031-41.
8. Monfort G, Bretheau D, Di Benedetto V, Bankole R. Urethral stricture in children: treatment by urethroplasty with bladder mucosa graft. *J Urol.* 1992; 148:1504-6.
9. Barbagli G, Lazzeri M. Urethral reconstruction. *Current Opinion in Urology.* 2006; 16: 391-5.
10. Barbagli G, Lazzeri M. Surgical treatment of anterior urethral stricture diseases: brief overview. *Int Braz J Urol.* 2007; 33: 461-9.
11. Barbagli G, De Angelis M, Romano G, Lazzeri M. Long-term followup of bulbar end-to-end anastomosis: a retrospective analysis of 153 patients in a single center experience. *J Urol.* 2007; 178: 2470-3.
12. Theodorescu D, Balcom A, Smith CR, McLorie GA, Churchill BM, Khoury AE. Urethral replacement with vascularized tunica vaginalis: defining the optimal form of use. *J Urol.* 1998; 159: 1708-11.
13. Sievert KD, Bakircioglu ME, Nunes L, Tu R, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *J Urol.* 2000; 163: 1958-65.

14. Gardikis S, Giatromanolaki A, Ypsilantis P, Botaitis S, Perente S, Kambouri A et al. Comparison of angiogenic activities after urethral reconstruction using free grafts in rabbits. *Eur. Urol.* 2005; 47: 417-21.

15. Trindade Filho, J.C.S. Avaliação funcional, morfométrica e histológica da matriz acelular de aorta e da mucosa bucal quando implantados na uretra: estudo experimental no coelho [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2002.

16. Beiko DT, Knudsen BD, Waterson JD. Urinary tract biomaterials. *J Urol.* 2004; 171: 2438-44.

17. Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatric Research.* 2008; 63: 569-75.

18. Baskin LS, Duckett JW. Mucosal grafts in hypospadias and stricture management. *AUA Update Series.* 1994; 13: 270-5.

19. Gearhart JP, Borland RN. *Onlay* island flap urethroplasty: variation on a theme. *J Urol.* 1992; 148: 1507-9.

20. Calado AA, Macedo A Jr, Delcelo R, de Figueiredo LF, Ortiz V, Srougi M. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: experimental study in rabbits. *J Urol.* 2005; 174: 765-70.

21. Snodgrass W. Tubularized, incised plate urethroplasty for distal hypospadias. *J Urol.* 1994; 151: 464-5.

22. Hendren WH, Crooks KK Tubed free skin graft for construction of male urethra. J Urol. 1980; 123: 858-61.
23. El-Sherbiny MT, Abol-Enein H, Dawaba MS, Ghoneim MA. Treatment of urethral defects: skin, buccal or bladder mucosa, tube or patch? An experimental study in dogs. J Urol. 2002; 167: 2225-8.
24. Vyas RP, Roth DR, Perlmutter AD. Experience with free grafts in urethral reconstruction. J Urol. 1987; 137: 471-4.
25. Burbige KA, Hensle TW, Edgerton P. Extragenital split thickness graft for urethral reconstruction. J Urol. 1984; 131: 1137-9.
26. Ehrlich RM, Alter G. Split-thickness skin graft urethroplasty and tunica vaginalis flaps for failed hypospadias repairs. J Urol. 1996; 155: 131-4.
27. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippy MK, Badylak SF, Adams MC et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa *onlay* grafts. Urology. 1998; 52:138-42.
28. Cheng EY, Kropp BP. Urologic tissue engineering with small-intestinal submucosa: potential clinical applications. World J Urol. 2000; 18: 26-30.
29. Kawano PR. Colágeno acelular e mucosa oral na substituição parcial da uretra: estudo comparativo em coelhos. [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2007.

30. Bruskewitz R, Raz S. Surgical considerations in treatment of Peyronie disease. *Urology*. 1980; 15: 134-6.
31. Foinquinos RC, Calado AA, Janio R, Griz A, Macedo A Jr, Ortiz V. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: initial experience. *Int Braz J Urol*. 2007; 33: 523-9.
32. Memmelar J. Use of bladder mucosa in a one-stage repair of hypospadias. *J Urol*. 1947; 58: 68-73.
33. Decter RM, Roth DR, Gonzales JR, Hypospadias repair by bladder mucosal graft: an initial report. *J Urol*. 1988; 140: 1256-8.
34. Fairbanks JL, Sheldon CA, Khoury AE, Gilbert A, Bove KE. Free bladder mucosal graft biology: unique engraftment characteristics in rabbits. *J Urol*. 1992; 148: 663-6.
35. Hendren WH, Reda EF Bladder mucosa graft for construction of male urethra. *J Ped Surg*. 1986; 21: 189-92.
36. Duffy PG, Ransley PG, Malone PS, Van Oyen P. Combined free autologous bladder mucosa/skin tube for urethral reconstruction: an update. *Br J Urol*. 1988; 61: 505-6.
37. Kimkead TM, Borzi PA, Duffy PG, Ransley PG. Long-term follow-up of bladder mucosa graft for male urethral reconstruction. *J Urol*. 1994; 151: 1056-8.

38. Lopez JA, Valle J, Timon A, Blasco B, Ambroj C, Murillo C, Valdivia JG Use of autologous buccal mucosal graft for urethral surgery in males. *Eur Urol.* 1996; 29: 227-30.
39. Ehrlich RM, Reda EF, Koyle MA, Kogan SJ, Levitt SB. Complications of bladder mucosal graft. *J Urol.* 1989; 142: 626-7.
40. Quiang F, Chen-Liang D. Ten-years experience with composite bladder mucosa-skin grafts in hypospadias repair. *Ped Urol.* 2006; 67: 1274-7.
41. Foroutan HR, Khalili A, Geramizadeh B, Rasekhi AR, Tanideh N. Urethral reconstruction using autologous and everted vein graft: an experimental study. *Pediatr Surg Int.* 2006; 22: 259-62.
42. Hennebert, P.N. Ileal urethroplasty – total replacement in dogs. *S Afr Med J.* 1967; 41: 974-7.
43. Koshima I, Inagawa K, Okuyama N, Moriguchi T. Free vascularized appendix transfer for reconstruction of penile urethras with severe fibrosis. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103: 964-9.
44. Mitchell ME, Adams MC, Rink RC. Urethral replacement with ureter. *J Urol.* 1988; 139: 1282-5.
45. Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Use of tubularized peritoneal free grafts as urethral substitutes in the rabbit. *J Ped Surg.* 1996; 31: 225-8.

46. Nanni L, Vallasciani S, Fadda G, Perrelli L. Free peritoneal grafts for patch urethroplasty in male rabbits. *J Urol.* 2001; 165: 578-80.
47. Martinez-Piñeiro JA, Martinez-Piñeiro L, Tabernero A. Uretroplastias de sustitución con injerto libre de mucosa bucal. *Arch Esp Urol.* 1998; 51: 645-59.
48. Humby G. A one-stage operation for hypospadias. Apud Andrich DE, Mundy A R. Substitution urethroplasty with buccal mucosal-free grafts. *J Urol.* 2001; 165: 1131-4.
49. Van der Meulen, JC. Hypospadias and cryptospadias. *Br J Plast.* 1971; 24: 101-8.
50. Bürger RA, Müller 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.
51. Elliott SP, Metro MJ, Mcaninch JW. Long-Term Followup of the Ventrally Placed Buccal Mucosa *Onlay* Graft in Bulbar Urethral Reconstruction. *J Urol.* 2003; 169: 1754-7.
52. Andrich DE, Leach CJ, Mundy AR. The Barbagli procedure gives the best results for patch urethroplasty of the bulbar urethra. *BJU Int.* 2001; 88: 385-9.

53. Barbagli G, Palminteri E, Guazzoni G, Montorsi F, Turini D, Lazzeri M. Bulbar urethroplasty using buccal mucosa grafts placed on the ventral, dorsal or lateral surface of the urethra: are results affected by the surgical technique? *J Urol*. 2005; 174:955-7.
54. Baskin LS, Duckett JW. Buccal mucosa grafts in hypospadias surgery. *Br J Urol*. 1995; 23-30.
55. Andrich DE, Mundy, AR. Substitution urethroplasty with buccal mucosal-free grafts. *J Urol*. 2001; 165: 1131-4.
56. Alsikafi NF, Eisenberg M, McAninch JW. Long-term outcomes of penile skin graft versus buccal mucosal graft for substitution urethroplasty of the anterior urethra. *J Urol*. 2005; 173: 87.
57. Barbagli G, Palminteri E, Lazzeri M, Turini D. Interim outcomes of dorsal skin graft bulbar urethroplasty. *J Urol*. 2004; 172: 1365-7.
58. Barbagli G, Palminteri E, Guazzoni G, Montorsi F, Turini D, Lazzeri M. Bulbar urethroplasty using buccal mucosa grafts placed on the ventral, dorsal or lateral surface of the urethra: are results affected by the surgical technique? *J Urol*. 2005; 174: 955-8.
59. Barbagli G, Palminteri E, De Stefani S, Lazzeri M. Penile urethroplasty. Techniques and outcomes using buccal mucosa grafts. *Contemp Urol*. 2006; 18: 25-33.

60. Wood DN, Allen SE, Andrich DE, Greenwell TJ, Mundy AR. The morbidity of buccal mucosal graft harvest for urethroplasty and the effect of nonclosure of the graft harvest site on postoperative pain. *J Urol.* 2004; 172: 580-3.
61. Barbagli G. When and how to use buccal mucosa grafts in penile and bulbar urethroplasty. *Minerva Urol Nefrol.* 2004; 56: 189-203.
62. Bhargava S, Chapple CR. Buccal mucosal urethroplasty: is it the new gold standard? *BJU Int.* 2004; 93:1191-3.
63. Fu Q, Deng CL, Liu W, Cao YL. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int.* 2007; 99: 1162-5.
64. Kropp BP, Sawyer BD, Shannon HE, Rippey MK, Badylak 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.
65. Wessells H, McAninch JW Use of free grafts in urethral stricture reconstruction. *J Urol.* 1996; 155: 1912-5.
66. Secrest CL, Jordan GH, Winslow BH, Horton CE, McCran JB, Gilbert DA. Repair of complication of hypospadias surgery. *J Urol.* 1993; 150: 1415-8.

67. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005; 27: 566-71.
68. Kahveci R, Kahveci Z, Sirmali S, Özcn M. Urethral reconstruction with autologous vein graft: an experimental study. *Br J Plast Surg.* 1995; 48: 500-3.
69. Shaeer OK, El-Sadat A. Urethral substitution using vein graft for hypospadias repair. *J Pediatr Urol.* 2006; 2: 518-21.
70. Frang D, Furka I, Köves S. Urethral replacement with autologous venous graft: an experimental study in the dog. *Urol. Res.* 1082; 10:145-7.
71. Gilbaugh Jr JH, Utz DC, Wakim KG. Partial replacement of the canine urethra with silicone prosthesis. *Invest. Urol.* 1969; 7: 41-51.
72. Robinette JD. Silicone rubber prosthesis for replacement of the urethra in male cats. *JAVMA.* 1973; 163:285-9.
73. Kelâmi A, Korb G, Ludtke-Handjery A, Rolle J, Schnell J, Lehnhardt FH. Alloplastic replacement of the partially resected urethra on dogs. *Investigative Urology.* 1971; 9: 55-8.
74. Hakky SI. The use of fine double siliconised Dacron in urethral replacement. *Br J Urol.* 1977; 49: 167-72.

75. Hakky SI. Urethral replacement by “dacron” mesh. *Lancet*. 1976; 27: 1192
76. Palleschi JR, Tanagho EA. Urethral tube grafts in dogs. Prothesis of dacron lined silicone. *Invest. Urol*. 1978; 15: 408-11.
77. Anwar H, Dave B, Seebode J. Replacement of partially resected canine urethra by polytetrafluoroethylene. *Urology*. 1984; 24: 583-6.
78. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Experimental and clinical experience using tissue regeneration for urethral reconstruction. *World J Urol*. 2000; 18: 67-70.
79. Atala A, Yoo JJ. Tissue engineering in urology. *World J Urol*. 2008; 26: 293-4.
80. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol*. 2002; 168: 1789-92.
81. Santucci RA, Barber TD. Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol*. 2005; 31: 192-203.
82. Italiano G, Abatangelo G Jr, Calabrò A, Zanoni R, Abatangelo G Sr, Passerini-Glazel G. Guiding spontaneous tissue regeneration for urethral reconstruction: long-term studies in the rabbit. *Urol Res*. 1998; 26: 281-4.

83. Olsen L, Bowald S, Busch C, Carlsten J, Eriksson I. Urethral reconstruction with a new synthetic absorbable device. *Scand J Urol Nephrol*. 1992; 26: 323-6.
84. Cilento BG, Retik AB, Atala A. Urethral reconstruction using a polymer mesh. *J Urol*. 1995; 153:
85. Gratzner PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng*. 2006; 12: 2975-83.
86. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg*. 2004; 40: 146-53.
87. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
88. Da Costa FDA, Dohmen P, Lopes SV, Pohl F, Vilani R, Vieira E et al. Experimental study with decellularized porcine heterografts: the prosthesis of the future. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2004; 19: 74-82.
89. Rieder E, Kasimir M, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004; 127: 399-405.

90. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int.* 2000; 85: 362-71.
91. Sievert KD, Wefer J, Bakircioglu ME, Nunes L, Dahiya R, Tanagho EA. Heterologous acellular matrix graft for reconstruction of the rabbit urethra: histological and functional evaluation. *J Urol.* 2001; 165: 2096-102.
92. Shokeir A, Osman Y, Gabr M, Mohsen T, Dawaba M, el-Baz M. Acellular matrix tube for canine urethral replacement: is it fact or fiction? *J Urol.* 2004; 171: 453-6.
93. Parnigotto PP, Gamba PG, Conconi MT, Midrio P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res.* 2000; 28: 46-51.
94. Grauss RW, Hazekamp MG, van Vliet S, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126: 2003-10.
95. Cimador M, Castagnetti M, Milazzo M, Sergio M, De Grazia E. Suture materials: do they affect fistula and stricture rates in flap urethroplasties? *Urol Int.* 2004; 73:320-4.
96. el-Kassaby A, AbouShwareb T, Atala A. Randomized comparative study between buccal mucosal and acellular bladder matrix grafts in complex anterior urethral strictures. *J Urol.* 2008; 179:1432-6.

97. El-Kassaby AW, Retik AB, Yoo JJ, Atala A. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix. *J Urol*. 2003;169:170-3.
98. Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs*. 2000; 24: 217-23.
99. Shokeir A, Osman Y, El-Sherbiny M, Gabr M, Mohsen T, El-Baz M. Comparison of partial urethral replacement with acellular matrix versus spontaneous urethral regeneration in a canine model. *Eur Urol*. 2003; 44: 603-9.
100. Vaught JD, Kropp BP, Sawyer BD, Rippey MK, Badylak 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.
101. El-Assmy A, El-Hamid MA, Hafez AT. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int*. 2004; 94: 1132-5.
102. Nuininga JE, van Moerkerk H, Hanssen A, Hulsbergen CA, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E et al. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *Eur Urol*. 2003; 44: 266-71.

103. Palminteri E, Berdondini E, Colombo F, Austoni E. Small intestinal submucosa (SIS) graft urethroplasty: short-term results. *Eur Urol.* 2007; 51: 1695-701.
104. Soergel TM, Cain MP, Kaefer M, Gitlin J, Casale AJ, Davis MM et al. Complications of small intestinal submucosa for corporal body grafting for proximal hypospadias. *J Urol.* 2003; 170: 1577-9.
105. le Roux PJ. Endoscopic urethroplasty with unseeded small intestinal submucosa collagen matrix grafts: a pilot study. *J Urol.* 2005; 173: 140-3.
106. Rotariu P, Yohannes P, Alexianu M, Gershbaum D, Pinkashov D, Morgenstern N, Smith AD. Reconstruction of rabbit urethra with surgisis small intestinal submucosa. *J Endourol.* 2002;16: 617-20.
107. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology.* 1999; 54: 407-10.
108. Atala A, Guzman L, Retik AB. A novel inert collagen matrix for hypospadias repair. *J Urol.* 1999; 162: 1148-50
109. Sievert KD, Tanagho EA. Organ-specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. *World J Urol.* 2000; 18: 19-25.

**Capítulo 2 – Avaliação funcional e histológica do enxerto
tubular de matriz acelular arterial heteróloga como
substituto da uretra em coelhos**

RESUMO

Introdução – Deformidades uretrais e estenoses severas geralmente requerem técnicas de uretroplastia com tecido adicional. Dentre as diversas possibilidades, destaca-se recentemente a utilização de matrizes acelulares desenvolvidas por bioengenharia. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento funcional e histológico da matriz acelular arterial heteróloga, quando implantada na uretra de coelhos

Materiais e Métodos – Para o preparo da matriz, a artéria aorta abdominal de suíno foi coletada e submetida a tratamento com SDS, sendo posteriormente armazenada em álcool 70°. Foram utilizados doze coelhos, machos, com peso médio de 3 kg, distribuídos por sorteio em dois grupos: (AO) – secção completa da uretra e implante de segmento tubular de matriz acelular de aorta, com 1 cm de extensão e (TT) - secção completa da uretra e sutura término-terminal. Uretrografia retrógrada foi realizada após 15 (M2) e 90 dias (M3), quando os animais foram eutanasiados. As radiografias foram analisadas quanto à presença de fístula e/ou estenose. A avaliação histopatológica por Hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson e Calleja caracterizou a presença de inflamação, hiperplasia epitelial, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo, muscular e elástico nos diferentes grupos.

Resultados – Foram registrados 2 óbitos em cada grupo, sendo estes animais excluídos do estudo. Em M2, 36,3% de estenose foi observada nos animais do Grupo AO ($p < 0,05$). Em M3, animais dos Grupos AO e TT apresentaram estenose, sendo que a diferença entre os grupos não foi significativa ($p > 0,05$). Maior porcentagem de fístula ocorreu no Grupo AO, em M3 ($p < 0,05$). A avaliação macro e microscópica não nos permitiu identificar a região da matriz acelular nos animais deste grupo. Ausência de

células gigantes tipo corpo estranho bem como maior presença de hiperplasia epitelial ($p<0,001$) e vasos sanguíneos ($p<0,005$) foram observadas nas lâminas destes animais. As fibras musculares estavam em intensa quantidade na lâmina própria dos animais do Grupo TT ($p<0,01$). Não houve diferença estatística entre a quantidade de fibras elásticas dos diferentes grupos.

Conclusões – Houve boa incorporação da matriz acelular à uretra no Grupo AO, não sendo observados sinais de rejeição. Porém, complicações (fístulas e estenoses) ocorreram com maior frequência nos animais deste grupo. No período proposto, não houve regeneração muscular satisfatória no Grupo AO, mas intensa vascularização e epitelização que ocorreram na matriz.

SUMMARY

Introduction – Severe urethral deformities and stenosis usually require urethroplasty with additional tissue. Among various possibilities, use of acellular matrix is a recent advance developed by bioengineering. The aim of this study was to evaluate the histological and functional behavior of heterologous acellular aortic matrix, when implanted in the urethra of rabbits.

Material and Method – Abdominal aorta was taken from swine, processed with SDS and stored in alcohol, in order to obtain tubular acellular matrix. Twenty-four male rabbits, weighing 3 kg, were randomly divided in two groups: (AO)- complete urethral section and replacement with a 1 cm acellular aortic matrix tubular graft and (TT)- complete urethral section and end-to-end anastomosis. A retrograde urethrogram was performed at 15 (M2) and 90 (M3) days after surgery, when the animals were euthanized. The exams were analysed for presence of fistula and/or strictures. Standard histological analysis with Hematoxylin-eosin, Masson's Trichrome and Calleja characterized the inflammation, epithelial hyperplasia, blood vessels, muscle fibers, collagen and elastic fibers content, in different groups.

Results – Two animals of each group died during the study and were excluded. In M2, 36.3% of strictures was observed in the animals of Group AO ($p < 0,05$). In M3, strictures occurred in both groups, but this difference was not significant ($p > 0,05$). A greater percentage of fistula occurred in Group AO, in M3 ($p < 0,05$). The gross and microscopic evaluations did not allow us to identify the acellular matrix region in this group. Absence of

foreign body giant cells, increased presence of epithelial hyperplasia ($p < 0,001$) and blood vessels ($p < 0,005$) were observed. Muscle fibers were abundant in lamina propria of the animals in the Group TT ($p < 0,01$). There was no statistical difference between the amount of elastic fibers in the two groups.

Conclusions - In Group AO, acellular matrix was well incorporated in the urethra, without rejection signs. However, fistulas and strictures occurred more frequently in animals of this group. After 90 days, muscle regeneration was not satisfactory in Group AO, but intense vascularization and epithelialization developed in the matrix.

1. INTRODUÇÃO

A uretroplastia é realizada com frequência na rotina urológica, para corrigir enfermidades congênitas, estenoses e afecções traumáticas da uretra¹. A reparação de longos segmentos uretrais ou deformidades graves geralmente requer a utilização de tecidos adicionais. Tecidos autólogos de diversas fontes têm sido empregados, incluindo pele genital² ou extragenital^{3,4}, mucosa vesical^{5,6}, túnica vaginal^{7,8}, mucosa bucal^{9,10} e veia^{11,12}. Entretanto, diversas complicações podem ocorrer, como retração do enxerto, estenose e fístula¹³. Melhores resultados são observados com a utilização de mucosa bucal¹⁴ mas, de modo similar aos demais tecidos, a necessidade de realização de uma segunda incisão para obtenção do enxerto aumenta a morbidade do procedimento¹⁵.

Atualmente, as inovações tecnológicas têm proporcionado o desenvolvimento laboratorial de substitutos teciduais, por meio da bioengenharia de tecidos¹⁶. Estes materiais são capazes de auxiliar a regeneração e reparação de lesões no trato urinário, objetivando restaurar a função normal de determinada estrutura ou órgão^{16,17}.

Neste contexto, as matrizes extracelulares absorvíveis destacam-se por possuírem características favoráveis ao crescimento tecidual. Polímeros absorvíveis ou materiais biológicos podem servir como matéria-prima para confecção destas matrizes¹⁸. Quando tecidos biológicos

são utilizados, há necessidade de cuidadoso preparo, envolvendo principalmente a adequada descelularização¹⁹. Este procedimento é responsável pela baixa antigenicidade do material^{19,20}. Inúmeras pesquisas desenvolvidas demonstram bons resultados envolvendo matrizes acelulares em cirurgias reconstrutivas uretrais, como o SIS (submucosa intestinal suína)^{21,22} e matriz acelular de mucosa vesical²³.

Tecidos tubulares acelulares (uretra e aorta)^{24,25} são opções possíveis em reconstruções uretrais onde o enxerto *onlay* não é suficiente para reparar a lesão. Entretanto, a utilização de tubos em uretroplastia encontra-se em constante aperfeiçoamento, uma vez que apresentam taxas de complicações superiores à técnica *onlay*^{12,26}. Até o momento não há relatos na literatura utilizando matriz acelular arterial heteróloga em substituições uretrais. Considerando a necessidade de aperfeiçoamento da técnica tubular e diante das diferentes possibilidades oferecidas pela bioengenharia, decidimos pela criação de uma matriz acelular tubular de aorta, avaliando seu comportamento quando implantada na uretra.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo concentraram-se em:

- 1) desenvolver técnica de descelularização para a produção de matriz acelular de aorta suína;
- 2) avaliar o comportamento deste enxerto tubular, quando implantado na uretra de coelhos, por meio de acompanhamento clínico, avaliação radiográfica e histopatológica;
- 3) comparar o conjunto de respostas do organismo à matriz acelular heteróloga com um grupo de animais submetidos à uretroplastia sem utilização de enxerto.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado após análise pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina de Botucatu, com aprovação em 28 de junho de 2007 (Anexo 1).

3.1- PREPARO DA MATRIZ ACELULAR HETERÓLOGA

A artéria aorta abdominal foi coletada de porcos eutanasiados na Rotina Experimental de Laparoscopia dos Laboratórios Experimentais da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os fragmentos de artéria, calibrados com sonda 10 Fr, foram lavados com solução salina estéril a 0,9% e submetidos à dissecação microscópica, para retirada da maior quantidade possível de tecido conjuntivo. Estes fragmentos foram então submersos em solução contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1%, a 37° C, por um período de 15 horas, sendo posteriormente lavados, sob agitação, com PBS (solução salina tamponada) acrescido de 10% de sulfato de gentamicina. Foram feitas cinco lavagens, com duração de 10 minutos cada. A ausência de elementos celulares foi confirmada pela análise histológica (Figura 1) e as matrizes acelulares foram individualmente armazenadas em álcool 70°, até o uso. Para avaliar a ausência de contaminação do material, desde a coleta da artéria até o momento da sua utilização, foram realizadas culturas em 3 amostras aleatórias.

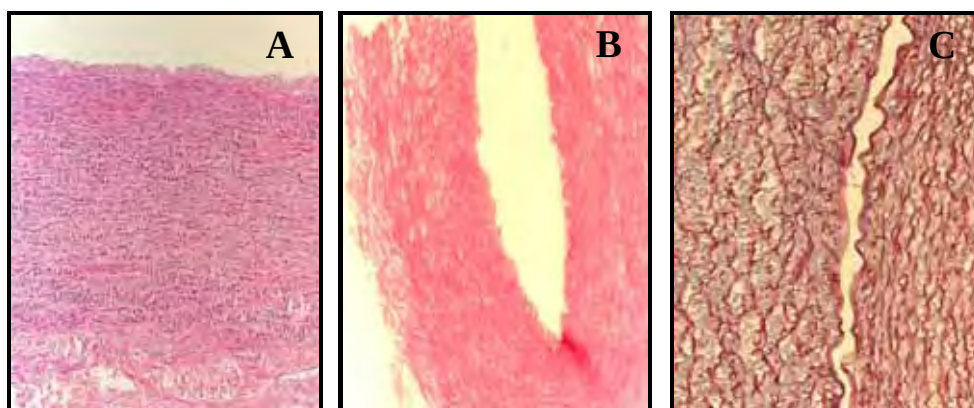


Figura 1 – A- Aorta suína, antes do processo de descelularização (HE, 10x); B- Aorta suína, após descelularização (HE, 10x); C- Disposição das fibras elásticas na aorta acelular (Calleja, 20x).

3.2- GRUPOS EXPERIMENTAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 24 coelhos machos, da raça North Folk, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista-UNESP, distribuídos, por sorteio, em dois grupos experimentais: (AO) – secção completa da uretra e implante de segmento tubular de matriz acelular de aorta, com 1 cm de extensão e (TT) - secção completa da uretra e sutura término-terminal.

O dia da cirurgia foi considerado o momento inicial do estudo (M1). Após serem devidamente pesados, os animais receberam como medicação pré-anestésica a acepromazina (1 mg/kg) e cloridrato de fentanila (3 µg/kg), via subcutânea. A indução anestésica foi feita com cloridrato de xilazina (5 mg/kg) e cloridrato de quetamina (30 mg/kg), via

intra-muscular. Em seguida, realizou-se a anestesia epidural com lidocaína associada à bupivacaína (0,2 ml/kg total, na proporção de 1:1). Os animais receberam fluidoterapia de manutenção, mediante cateterização da veia marginal da orelha. Em caso de necessidade, a complementação anestésica durante a cirurgia foi feita com diazepam (1 mg/kg) e cloridrato de quetamina (2 mg/kg), via intravenosa.

Para o procedimento cirúrgico, realizado em condições estéreis, a pele do prepúcio foi reparada (nylon 4-0), expondo a região perineal. A uretra foi cateterizada com sonda uretral 10 Fr e a porção distal do pênis do coelho foi fixada com ponto de reparo (nylon 4-0). Procedeu-se à incisão da pele e subcutâneo, exatamente entre o pênis e o ânus. A uretra foi dissecada, reparada e submetida apenas à incisão transversal. No Grupo AO, a matriz acelular foi fixada à uretra com auxílio de quatro pontos de reparo (vycril 7-0) e suturada com pontos contínuos, com o mesmo fio. Ao final, fez-se síntese do subcutâneo e pele em planos separados, com pontos simples isolados. A sequência cirúrgica pode ser observada na Figura 2.

No Grupo TT não foi realizado colocação da matriz, sendo feita a secção e posterior sutura término-terminal dos segmentos uretrais, utilizando-se sutura contínua (Vicryl 7-0), entre 2 pontos de reparo. A sonda uretral foi mantida por 24 horas em todos os animais.

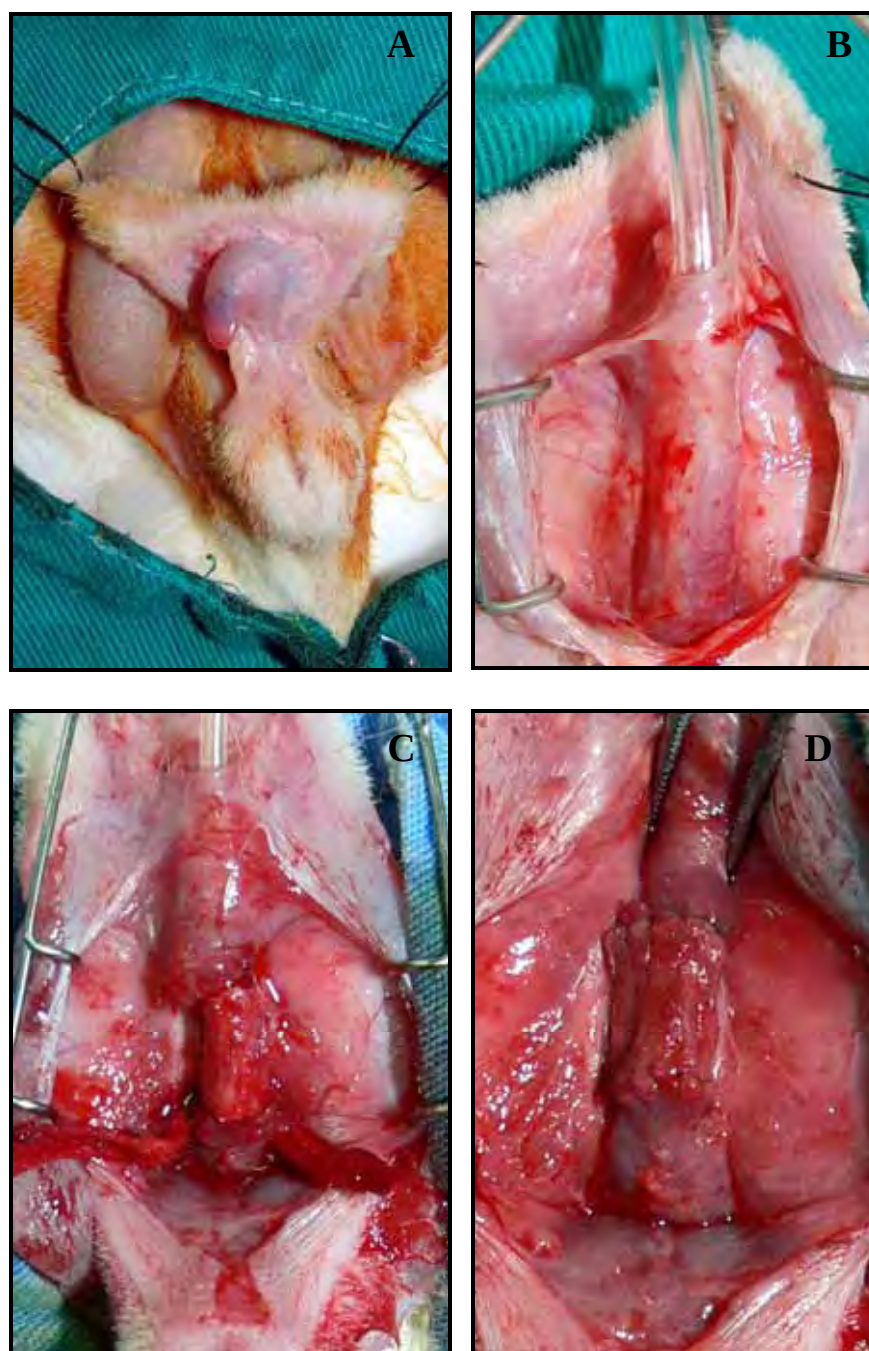


Figura 2– A- Exposição da região perineal, por meio de pontos de reparo no prepúcio; B- Sondagem e dissecação da uretra; C- Posicionamento da matriz acelular, com 1 cm de comprimento; D- Aspecto final da anastomose.

A uretrografia foi realizada com 15 (M2) e 90 dias (M3) de pós-operatório (PO), utilizando-se arco cirúrgico de radioescopia, Marca Phillips, Modelo BV-300. Os animais foram tranquilizados com acepromazina (1 mg/kg) e cloridrato de fentanila (3 µg/kg), via intramuscular e efetuou-se injeção de contraste radiológico iodado pela sonda uretral, previamente introduzida e fixada na extremidade distal da uretra. Os exames foram gravados e posteriormente salvos em arquivos digitais, para documentação e análise.

Os animais receberam 5 mg/kg/dia de Enrofloxacina e 3 mg/kg/dia de Cetoprofeno, iniciados no momento da indução anestésica e mantidos até o quinto dia PO, via subcutânea.

As alterações clínicas em decorrência de estenoses obstrutivas e/ou fístulas foram acompanhadas durante todo o estudo.

No momento M3, após uretrocistografia, a eutanásia foi realizada com tiopental sódico (50 mg/kg) e aplicação complementar de cloreto de potássio, ambos por via intravenosa. A seguir, procedeu-se a retirada do pênis em bloco, com incisão próxima ao púbis. A peça foi fixada em formaldeído a 10%, por 10 dias. Após este período, a uretra foi dissecada e avaliada macroscopicamente (Figura 3).



Figura 3 – A- Uretra dissecada, separada do corpo cavernoso, após fixação em formalina; B- Uretra cateterizada, antes da secção longitudinal

O implante foi então seccionado longitudinalmente. Os segmentos de uretra foram preparados em blocos de parafina e as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), tricrômio de Masson (TM) e Calleja sem permanganato (CLJ).

3.3- PARÂMETROS ESTUDADOS

As variações do peso entre M1 e M3 foram comparadas entre os diferentes grupos. Durante todo o estudo, os animais foram diariamente observados para que possíveis alterações clínicas decorrentes de estenose/obstrução uretral ou fístulas fossem detectadas. A estrangúria foi identificada quando os animais realizavam esforço abdominal e pouca urina era eliminada pelo meato uretral. Foi considerada estenose a redução superior a 10% da luz uretral, observada pela urografia, em M2 e M3.

A análise das lâminas foi realizada sem que o examinador tivesse prévio conhecimento dos grupos estudados. Os segmentos de tecido foram avaliados quanto à presença de processo inflamatório, epitelização do enxerto, presença de fibras musculares, fibras elásticas, colágeno e vasos sanguíneos na lâmina própria. A classificação destas alterações baseou-se em escore estabelecido de 0 a 3 (0-ausente, 1- leve, 2-moderado e 3-intenso). A média do escore foi obtida pela análise de 4 campos por lâmina.

A intensidade de fibras colágenas, quantidade de fibras musculares, elásticas e de células inflamatórias foi avaliada de forma subjetiva, sendo estimada em função da área ocupada na lâmina, no aumento de 20 vezes.

Com relação ao epitélio, a presença de uma a duas camadas celulares na área cirúrgica foi considerada como hiperplasia leve, três camadas como moderada e quatro ou mais camadas como hiperplasia intensa. As avaliações foram feitas com aumento de 40 vezes (Figura 4).

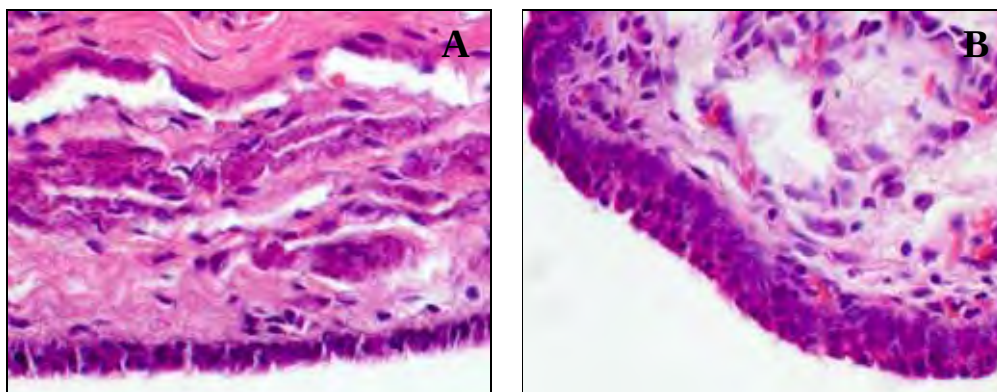


Figura 4 – A- Hiperplasia epitelial leve; B- Hiperplasia epitelial intensa (HE, 40x).

A ocorrência de até 3 vasos por campo foi considerada vascularização leve, 4 a 5 vasos moderada e, acima de 5 vasos por campo, vascularização intensa, observados com aumento de 20 vezes (Figura 5).

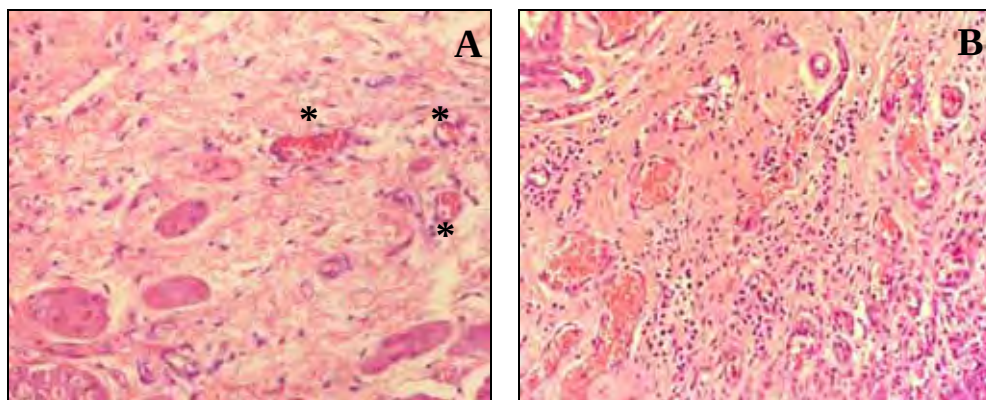


Figura 5 – A- Vascularização leve(*); B- Vascularização intensa (HE, 40x).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

O estudo do peso corpóreo, envolvendo diferentes momentos de avaliação, foi feito pela análise de variância para o modelo de medidas repetidas, em grupos independentes.

Em relação às variáveis inflamação, hiperplasia, fibras elásticas, musculares, colágenas e vasos sanguíneos, utilizou-se teste não paramétrico de Mann-Whitney para grupos independentes.

O estudo da associação entre grupos e ocorrência de complicações (fístula, estenose) nos diferentes momentos foi realizado o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações multinomiais.

Para indicação das significâncias, foram consideradas letras minúsculas na comparação dos grupos, fixado o momento de avaliação e letras maiúsculas para comparação de momentos de avaliação, dentro do grupo. Duas proporções seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem entre si quanto às respostas dos grupos. Duas proporções seguidas de uma mesma letra maiúscula, não diferem quanto às respostas dos momentos de avaliação, dentro do grupo em consideração.

Todas as discussões do presente trabalho foram realizadas no nível de 5% de significância.

4. RESULTADOS

4.1- PESO CORPÓREO DOS ANIMAIS

Os 24 coelhos estudados apresentavam peso médio de $3,1 \pm 0,3$ kg no momento M1. A tabela abaixo contém a média e desvio padrão do peso dos animais, nos momentos M1 e M3.

TABELA 1 – Média e desvio-padrão do Peso dos animais (kg), segundo grupos e momentos de avaliação.

Grupo	Pré-operatório M1	90 dias PO M3	Resultado por momento
AO	$2,98 \pm 0,26$	$3,64 \pm 0,62$	$p < 0,005$
TT	$3,18 \pm 0,37$	$4,00 \pm 0,35$	$P < 0,001$
Resultado por grupo	$p > 0,05$	$p > 0,05$	

Na Tabela 1, observamos que os animais de ambos os grupos apresentaram ganho de peso em M3, com relação ao momento M1. Esta diferença de peso foi estatisticamente significativa dentro do Grupo AO ($p < 0,005$) e TT ($p < 0,001$). Não há diferença significativa do ponto de vista estatístico entre os dois grupos, nos momentos avaliados.

4.2- AVALIAÇÃO CLÍNICA

No Grupo TT, 4 dos 12 animais (33,3 %) apresentaram estrangúria no PO imediato. Destes, 2 evoluíram com severa estenose e vieram a óbito nos primeiros dias de PO. Um animal apresentou pequena fístula, com fechamento espontâneo, observada no 26º dia PO. Este animal evoluiu bem até o final do estudo e houve cicatrização espontânea da fístula.

No Grupo AO, observou-se no decorrer do estudo que 5 animais (41,6%) apresentaram estrangúria, sendo registrados 2 óbitos (33,3%), - 1 na primeira semana e outro aos 30 dias de PO.

Dos 12 animais operados em cada grupo, seguiram até o final do experimento, fazendo parte da análise anatomopatológica, 10 animais do Grupo AO e 10 animais do Grupo TT. Os animais com óbito registrado antes de 90 dias de pós-operatório foram excluídos.

4.3- AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA

4.3.1 – AVALIAÇÃO DE ESTENOSE

A tabela abaixo mostra a frequência de estenose e sua respectiva significância estatística, nos diferentes grupos e momentos.

TABELA 2 – Frequência de resposta da variável estenose, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos	Grupos	Estenose	Nº Animais
M2	AO	4 (0,36) bA	11
	TT	0 (0,00) aA	10
M3	AO	4 (0,40) aA	11
	TT	3 (0,30) aA	10

No Grupo TT, 10 animais foram submetidos ao exame radiográfico realizado nos momentos M2 e M3 enquanto que no Grupo AO 11 animais foram radiografados em M2 e 10 em M3.

Aos 15 dias de pós-operatório (M2), 36% dos animais (4/11) do Grupo AO apresentaram estenose. Houve diferença significativa em relação ao Grupo TT ($p < 0,05$), onde não foi observado alteração em nenhum animal. Em 2 animais (18,2%) do Grupo AO, notou-se irregularidade na parede da uretra, com falhas de preenchimento pelo contraste, sem estenose (Figura 6).

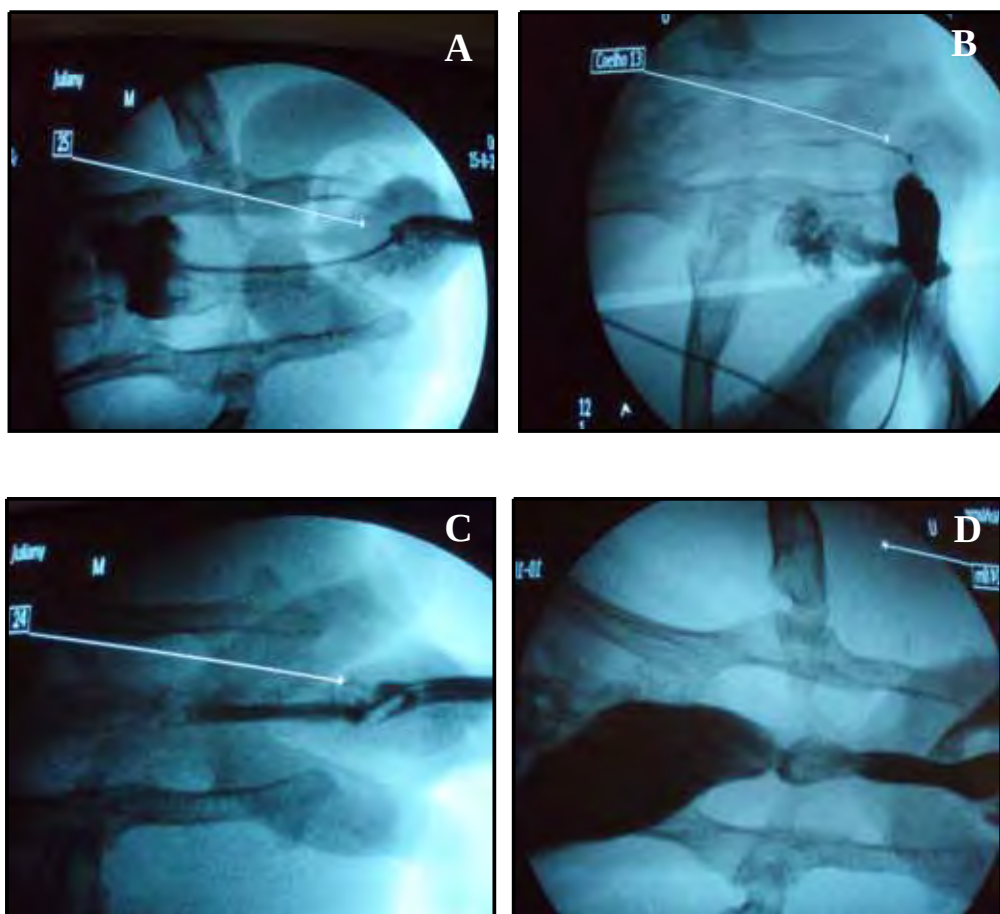


Figura 6 – Grupo AO- A- Estenose em M2 (animal 25); B- Estenose e fístula, com extravasamento de contraste (seta) em M2 (animal 13); C e D- Urografia do animal 24, mostrando irregularidade na parede da uretra em M2 e ausência de estenose em M3, respectivamente.

Em M3, aos 90 dias de pós-operatório, a incidência de estenose foi de 30% (3/10) para o Grupo TT (Figura 7) e 40% para o Grupo AO, sem diferenças estatísticas.

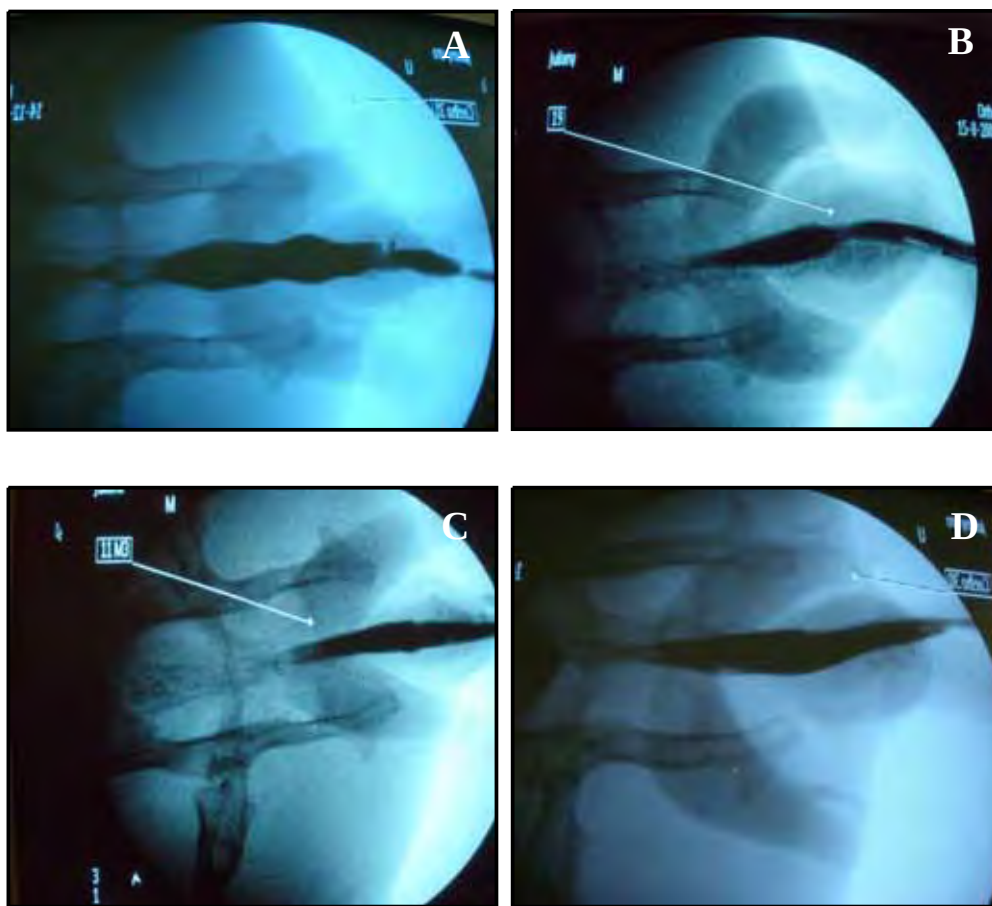


Figura 7 – Grupo TT- A e B- Estenose (animal 31 e 19, respectivamente), C e D - Uretrografias normais (animal 11 e 30). Todas as radiografias foram realizadas em M3.

4.3.2 – AVALIAÇÃO DE FÍSTULA

A Tabela 3 mostra a frequência de fístula e sua respectiva significância estatística, nos diferentes grupos e momentos.

TABELA 3 – Frequência de resposta da variável fístula, segundo grupos e momentos de avaliação.

Momentos	Grupos	Estenose	Nº Animais
M2	AO	1 (0,09) aA	10
	TT	0 (0,00) aA	10
M3	AO	3 (0,30) bA	10
	TT	0 (0,00) aA	10

Nenhuma fístula foi observada pela uretrografia nos animais do Grupo TT. Apesar de um animal ter apresentado clinicamente fístula puntiforme, nas radiografias realizadas em M2 e M3 não foi identificado extravasamento de contraste.

Nos animais do Grupo AO, a taxa de ocorrência de fístulas foi de 9% em M2 e 30% em M3, apresentando diferença significativa neste último momento, comparada ao Grupo TT ($p < 0,05$).

Os achados radiográficos, expressos em porcentagem, podem ser observados no Gráfico 1.

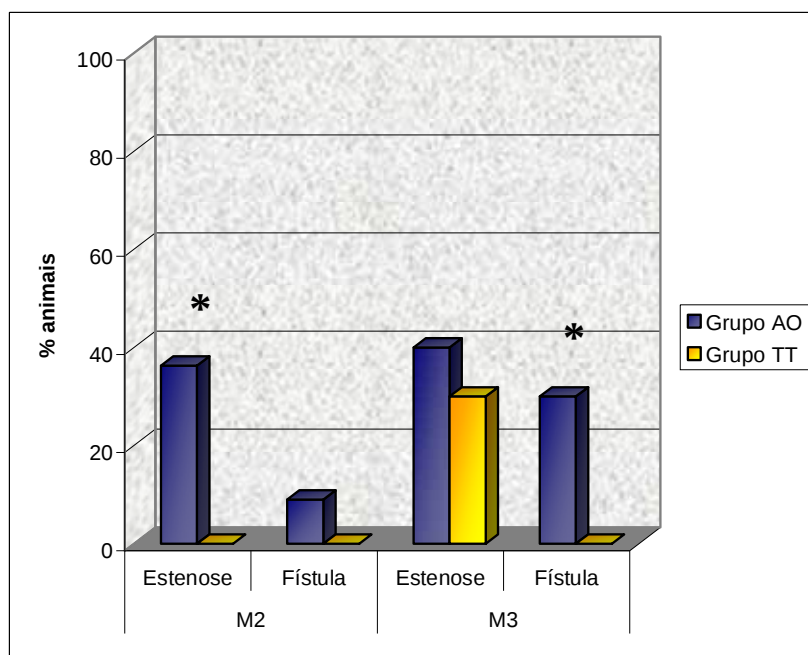


Gráfico 1 – Distribuição da porcentagem de ocorrência de fístula e estenose nos diferentes grupos, em M2 e M3.

4.4- AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA DA URETRA

4.4.1 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica realizada após a eutanásia possibilitou observar maior aderência dos tecidos adjacentes à uretra nos animais do Grupo AO que possuíam fístula urinária. Após fixação em formalina 10%, a secção longitudinal do pênis nos permitiu confirmar a presença das fístulas evidenciadas pelo exame radiográfico (Figura 8A). Não foi possível distinguir a aorta implantada do tecido uretral em nenhum destes animais (Figura 8B.).



Figura 8- A- Fístula (seta) e aspecto uniforme da mucosa uretral, após fixação em formol (Grupo AO); B- Uretra de um dos animais do Grupo AO, sem limites entre matriz e tecido normal, após eutanásia.

4.4.2 – AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

As medianas individuais dos parâmetros avaliados, encontradas em cada grupo, estão apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 – Mediana e valores mínimo e máximo das variáveis, segundo grupos.

Variável	Grupos		Estatística
	AO	TT	Valor p
Inflamação	2,0 (1,0-3,0)	1,5 (1,0-3,0)	p>0,05
Epitélio	3,0 (2,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	p<0,001*
Vasos	2,5 (1,0-3,0)	1,0 (1,0-2,0)	p<0,005*
Tec. Conj.	3,0 (2,0-3,0)	2,0 (1,0-3,0)	p>0,05
F. musculares	1,0 (1,0-2,0)	3,0 (3,0-3,0)	p<0,001*
F. Elásticas	2,0 (1,0-3,0)	2,5 (1,0-3,0)	p>0,05

A intensidade da reação inflamatória foi comparada em função dos grupos estudados, por meio da coloração HE, e está representada no Gráfico 2. 100% dos animais de ambos os grupos apresentaram graus variados de inflamação, sendo que a maior porcentagem de inflamação leve foi registrada no Grupo TT (50%). Em 20% dos animais de ambos os grupos ocorreu reação inflamatória intensa (Figura 9), caracterizada predominantemente por células mononucleares. As diferenças entre os grupos não foram significativas (p>0,05).

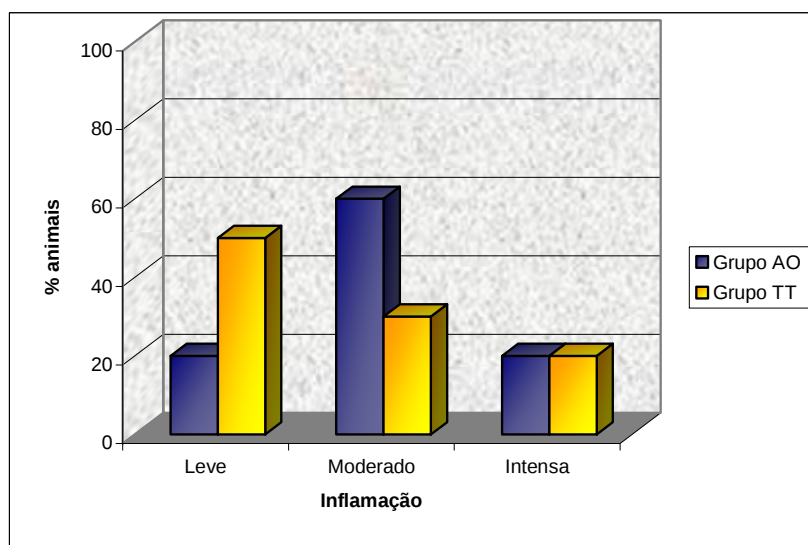


Gráfico 2 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, segundo a intensidade do infiltrado inflamatório.

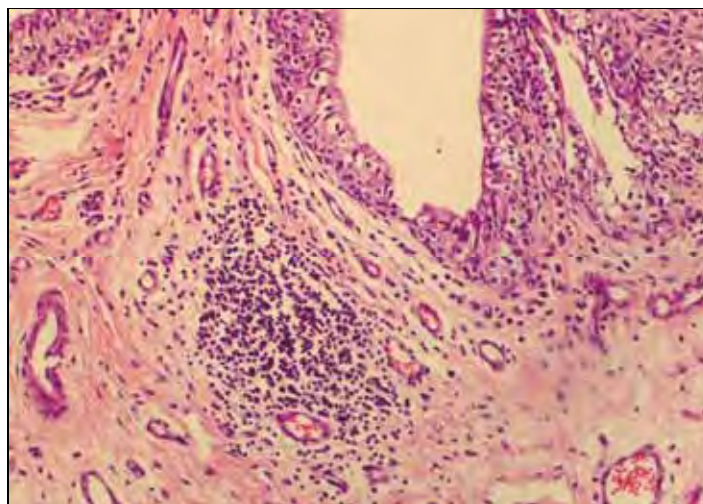


Figura 9 – Infiltrado inflamatório intenso na lâmina própria de animal do Grupo AO (HE, 20x).

A hiperplasia epitelial, avaliada pelas lâminas coradas com HE, foi considerada severa em 70% dos animais do grupo AO, com presença de 4 ou mais camadas de células localizadas sobre a membrana basal . Por outro lado, no Grupo TT observou-se maior número de animais com hiperplasia leve, totalizando 60%. Considerou-se presença de hiperplasia moderada em 30% dos animais do Grupo AO e 40% do Grupo TT (Gráfico 3). A diferença entre a hiperplasia observada nos dois grupos foi significativa, do ponto de vista estatístico ($p < 0,001$).

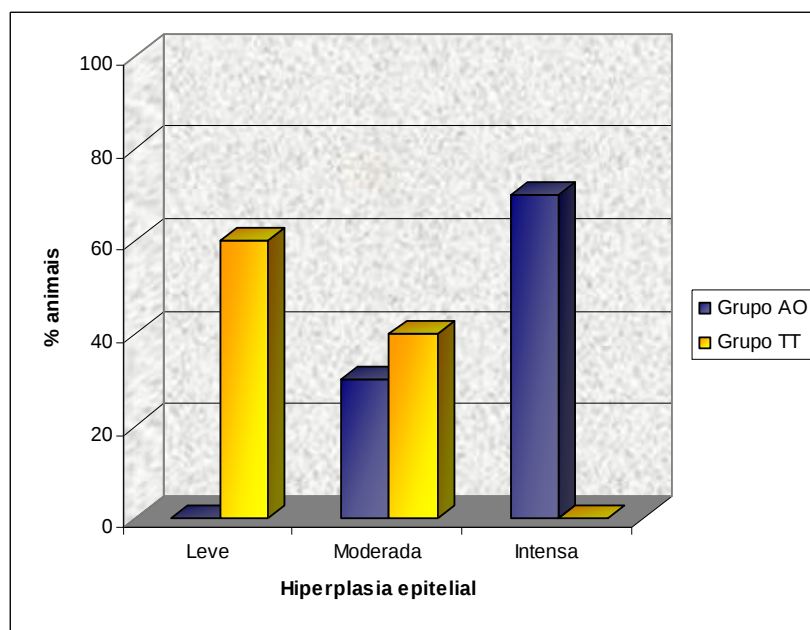


Gráfico 3 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, segundo a intensidade da hiperplasia epitelial.

O número de vasos sanguíneos na lâmina própria também foi avaliado pelo HE e está representado no Gráfico 4. No grupo AO, 90% dos animais apresentaram quantidade moderada e intensa de vasos nesta camada, enquanto que no Grupo TT a maioria apresentou leve quantidade (80%) ($p < 0,005$).

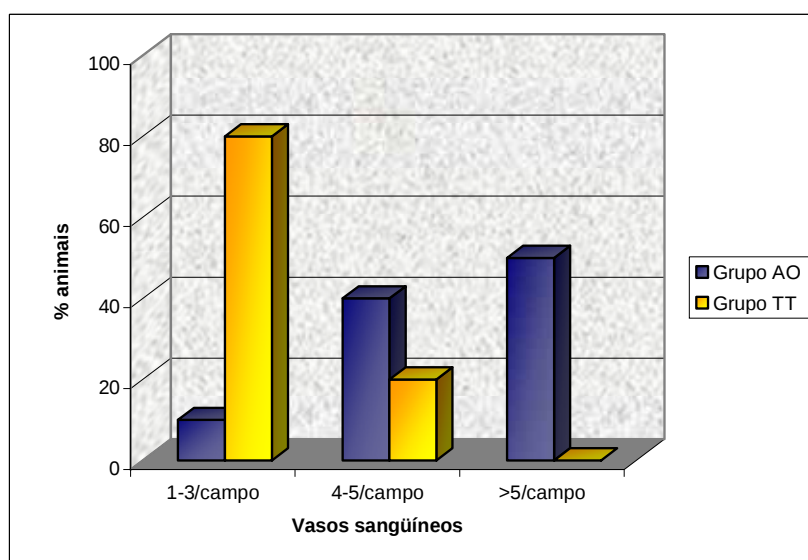


Gráfico 4 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, segundo a quantidade de vasos sanguíneos presentes na lâmina própria.

A área da lâmina própria da uretra ocupada pelo tecido conjuntivo denso foi analisada pelas lâminas coradas com Tricrômico de Masson. Independente da técnica de uretroplastia realizada, o acúmulo leve de colágeno ocorreu em pequena porcentagem dos animais. O acúmulo moderado de fibras colágenas foi evidenciado em 75% do Grupo TT, enquanto que a maior porcentagem de animais com intensa quantidade de colágeno (62,5%) estava presente no Grupo AO (Gráfico 5). Entretanto, esta diferença entre os grupos não foi significativa pela análise estatística ($p>0,05$).

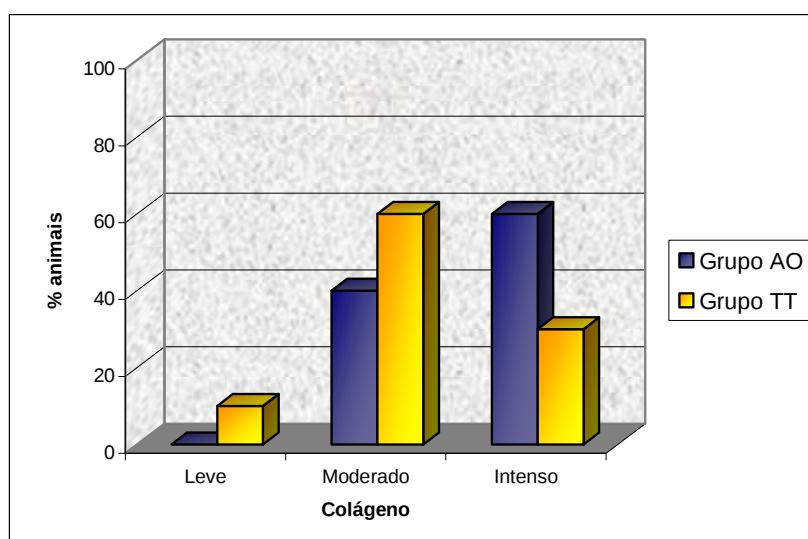


Gráfico 5 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, segundo a intensidade de fibras colágenas na lâmina própria.

Para analisar a presença de fibras musculares na lâmina própria da uretra, também foram examinadas as lâminas coradas com TM (Figura 10). Em 100% dos animais do Grupo TT, observou-se intensa quantidade de fibras musculares ($p < 0,001$). Nos animais do Grupo AO, foram identificadas apenas presença leve (60%) e moderada (40%) de musculatura. A representação destes valores pode ser observada no Gráfico 6.

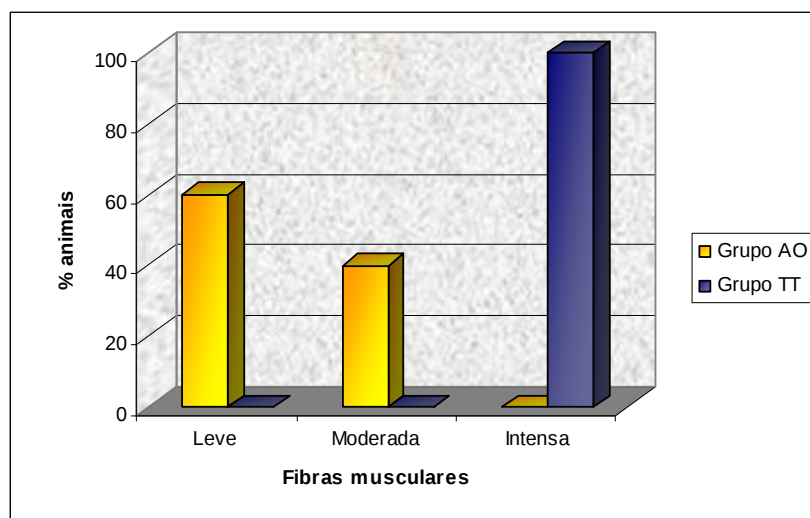


Gráfico 6 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, de acordo com a presença de fibras musculares na lâmina própria.

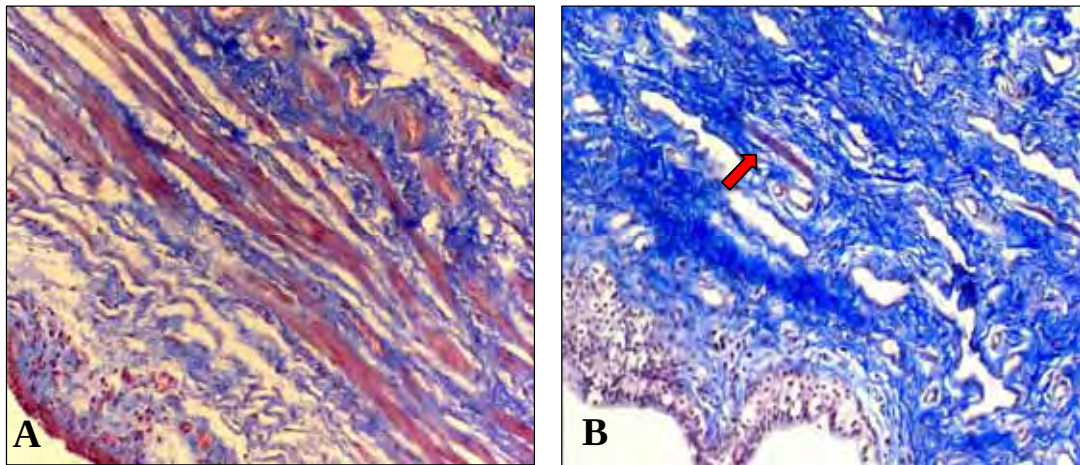


Figura 10 – A- Escore 2 para fibras colágenas e 3 para fibras musculares (Grupo TT), opondo-se à maior quantidade de colágeno (escore 3) e poucas fibras musculares (escore 1-seta), mostradas na Figura B (Grupo AO) (TM, 40x).

Ao analisar as lâminas coradas pelo Calleja, pode-se notar a quantidade de fibra elástica presente na lâmina própria da uretra, representada no Gráfico 7. No Grupo AO, 25% dos animais apresentaram quantidade leve e 75% quantidade moderada de fibras elásticas na uretra. Somente animais do Grupo TT apresentaram intensa quantidade de fibras elásticas (40%). Em duas lâminas, posteriormente identificadas como sendo de animais do Grupo AO, pode-se notar a presença de focos de fibras elásticas na lâmina própria (Figura 11).

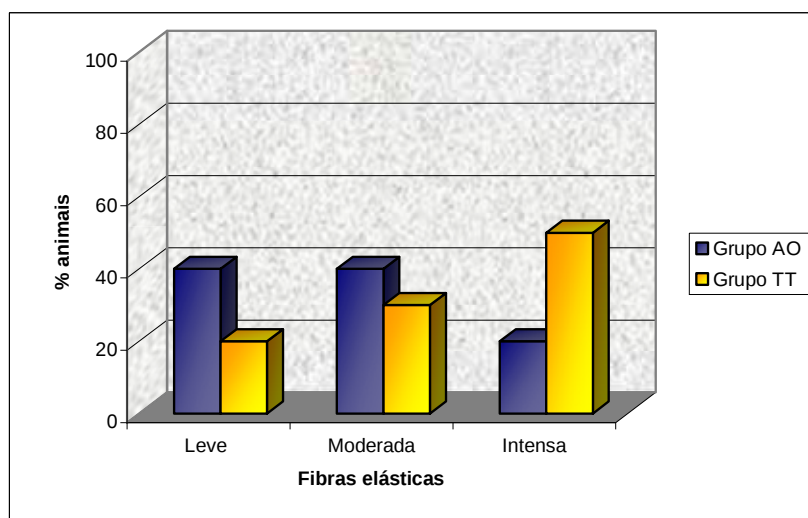


Gráfico 7 – Distribuição da porcentagem de animais dos diferentes grupos, segundo a intensidade de fibras elásticas ($p>0,05$).

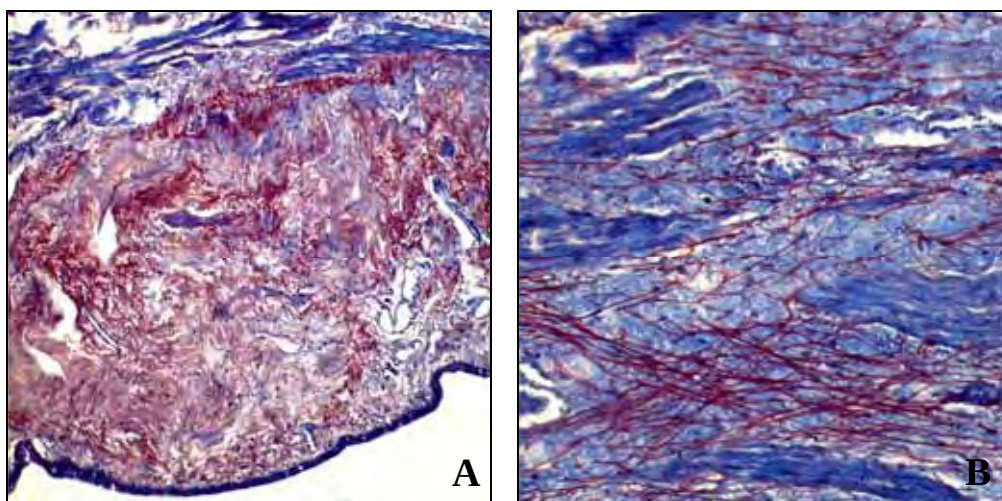


Figura 11 – A – Foco de fibras elásticas, desorganizadas (Grupo AO); B- Disposição de fibras elásticas (escore 3) em animal do Grupo TT (CJP, 20x).

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de matrizes acelulares absorvíveis foi recentemente proposto como uma opção nos casos onde há necessidade do uso de substitutos uretrais alternativos. Matrizes obtidas de diferentes modelos animais têm demonstrado melhor regeneração uretral, quando comparadas com o uso de matrizes absorvíveis sintéticas²⁷. Nossa proposta foi avaliar a incorporação da artéria aorta de suíno na uretroplastia tubular em coelhos.

O coelho é considerado um bom modelo experimental devido similaridade da anatomia e o tamanho do pênis com o de uma criança^{1,28}, sendo o animal mais utilizado em pesquisas que envolvem o reparo de lesões uretrais. Outras vantagens, também observadas por diferentes pesquisadores, incluem a facilidade de manipulação dos animais, baixo custo para manutenção e simplicidade do acesso cirúrgico^{24,29}. A histologia da uretra normal e em diferentes condições patológicas é bem documentada na literatura, facilitando a comparação entre os estudos²⁹. Consideramos ainda a experiência do nosso grupo experimental, adquirida em trabalhos anteriores envolvendo uretroplastias^{22,30}.

Enxertos de matrizes acelulares podem ser obtidos de diferentes fontes doadoras, como submucosa intestinal, bexiga, uretra e vasos sanguíneos¹⁶. A estrutura da matriz fornece um suporte adequado para replicação celular, sendo absorvida e substituída por tecido regenerado

do hospedeiro. Quando a matriz é tubular, como a artéria, elimina-se o tempo gasto para a confecção do tubo e a linha de sutura longitudinal^{12,26}, otimizando o tempo cirúrgico. Apesar de estar disponível na forma tubular, não há impedimento para que o cirurgião utilize *patch* da artéria em reconstruções *onlay*. Em comparação às veias, as artérias são caracterizadas por alta susceptibilidade à remoção de células e melhor preservação da matriz de colágeno e elastina³¹. As veias também apresentam como inconveniente a maior predisposição para formar criptas e pólipos³².

A fonte da matriz acelular afeta a qualidade de crescimento do tecido, mas ainda não foi comprovado qual o melhor animal para uso¹. A escolha do animal depende de considerações éticas, da proporção entre o material e o receptor, dos custos e da viabilidade para sua obtenção. No Brasil, a espécie suína é abatida diariamente para consumo, facilitando o acesso à matéria-prima para confecção das matrizes, com comprimento e diâmetros variados, oferecendo a oportunidade de criação de um banco de tecidos acelulares.

Para que bons resultados fossem obtidos com o uso da matriz heteróloga, um passo fundamental foi a escolha do método de descelularização. Este processo confere alta biocompatibilidade à matriz, por diminuir a antigenicidade do material e a sensibilização do hospedeiro²⁰. As diferentes técnicas de descelularização propostas consideram a eficácia da remoção celular, associada à manutenção da

integridade da matriz. Nós optamos pelo método químico utilizando o dodecil sulfato de sódio (SDS), considerando-se relatos de sucesso da descelularização de tecidos vasculares com o uso deste detergente^{20,33}.

Não há relatos na literatura descrevendo técnicas de uretroplastia com matriz acelular previamente preparada com SDS. Estudos que utilizaram uretra homóloga^{25,34-36} ou heteróloga²⁷ obtiveram a descelularização por meio do desoxicolato de sódio (DCA). Tanto o SDS quanto o DCA são classificados como detergentes iônicos. A técnica com DCA, inicialmente descrita por Meezan et al. e modificada por Probst et al.³⁷ inclui o tratamento prévio com DNase, um detergente enzimático. A associação é necessária, pois o DCA usado isoladamente não promove remoção celular completa.

A ação do DCA na descelularização de ureter³⁸ foi comparada com outros diferentes tratamentos, incluindo SDS, detergente não-iônico (Triton-X) e detergente enzimático (tripsina). A melhor taxa de descelularização e organização das fibras colágenas foi obtida com o Triton-X, seguida pelo DCA. Entretanto, os detergentes utilizados na descelularização de matrizes provenientes de tecidos urológicos parecem não ter a mesma eficácia quando utilizados em vasos e valvas sangüíneas. Isto realmente comprova que os protocolos variam de acordo com o tecido a ser descelularizado¹⁹. Como exemplo, tecidos valvares tratados com Triton-X¹⁶⁷ demonstraram perda de substâncias que estimulam angiogênese

e adesão celular (glicosaminoglicanas, laminina e fibronectina). Remoção incompleta de células de vasos sanguíneos também foi relatada¹⁹. Com relação ao DCA, de acordo com Gilbert et al¹⁹, este detergente tende a causar grande desarranjo na arquitetura da matriz, quando comparado ao SDS.

O SDS tem sido associado à eficiente remoção celular de tecidos vasculares²⁰. Mudanças nas propriedades mecânicas de tecidos vasculares⁴⁰ bem como nas concentrações de colágeno e glicosaminas não foram alteradas após o tratamento com SDS⁴¹. Utilizamos a concentração de 0,1%, uma vez que as concentrações superiores a 0,05% estão relacionadas à melhor taxa de descelularização e preservação da matriz²⁰.

Amostras de tecido tratadas com álcool etílico 75%, após a descelularização, apresentaram concentração residual de SDS 23 vezes menor, com satisfatório crescimento celular, quando comparadas às amostras lavadas com solução alcalina⁴¹. No presente estudo, optamos pelo armazenamento das matrizes em álcool 70%, diminuindo o efeito residual do SDS e a possibilidade de contaminação dos fragmentos. O resultado negativo das culturas realizadas aleatoriamente durante o estudo, em todas as fases do preparo da matriz, confirmaram a esterilização das amostras.

Outro diferencial proposto em nosso estudo foi a utilização da anestesia epidural. Apesar das particularidades anatômicas inerentes aos lagomorfos, que dificultam a intubação orotraqueal, a utilização da

anestesia inalatória foi citada em diversas pesquisas^{23,27,34}. Porém, não foram encontrados relatos de utilização da técnica epidural em uretroplastias experimentais em coelhos. No presente estudo, a via epidural proporcionou uma anestesia segura, por um tempo prolongado (aproximadamente 90 minutos), evitando a necessidade de doses adicionais de anestésicos, como ocorre quando protocolos dissociativos são instituídos^{22,24}. A estabilidade do paciente durante a cirurgia resultou em ausência de óbitos em decorrência do procedimento anestésico.

Com relação ao procedimento cirúrgico, adotou-se a distância de 2 cm do meato uretral externo para a fixação da parte superior do enxerto, cujo tamanho foi padronizado em 1 cm. Após a eutanásia, o pênis foi retirado em bloco, sendo a uretra incisada longitudinalmente desde o púbis até o meato uretral, abrangendo toda a região do enxerto. Esta margem de segurança possibilitou evitar o uso de sutura inabsorvível para demarcar a área substituída pela aorta acelular. O fio inabsorvível pode ter influência negativa no estudo da resposta do organismo ao enxerto^{27,29,34}, apesar deste procedimento ser adotado em diversos trabalhos experimentais, envolvendo uretroplastias parciais^{42,43} ou tubulares^{25,35}. A uretra bulbar do coelho é recoberta por uma escassa quantidade de tecido e a inflamação local prejudica diretamente o restabelecimento da lesão uretral²⁹. Foi observado ainda que a persistência do material de sutura na região periuretral está associada à ocorrência de fístulas^{29,34}.

A derivação urinária também é considerada controversa no pós-operatório de uretroplastias. A ausência de contato entre a urina e a área recém-operada pode propiciar melhores condições de cicatrização local, protegendo a anastomose durante a primeira semana⁴⁴. Quando enxertos são utilizados, a presença do cateter promove sua estabilização⁴⁵. A imobilidade e a vascularização do leito receptor garantem a melhor incorporação do enxerto⁴⁶. Em estudos experimentais, menores números de complicações foram relatados em animais mantidos com cateterização uretral^{5,27,28}. Porém, a cateterização prolongada pode causar inflamação exacerbada e ressecamento da uretra, prejudicando a cicatrização⁴⁵.

Os benefícios obtidos com a manutenção da sondagem contrapõem-se a algumas dificuldades técnicas, encontradas nos experimentos com coelhos. Theodorescu et al.⁴⁷ relataram a facilidade de obstrução do cateter no pós-operatório devido a urina concentrada deste animal, rica em cristais de fosfato. Outro obstáculo comum é a eficaz manutenção da sonda. Os resultados satisfatórios com a sondagem bem como sua permanência por tempo determinado foram observados com maior frequência nos estudos em que os animais eram mantidos contidos no PO^{5,28,45}, impossibilitando-os de acessar a região perineal. Porém, independente da restrição física, a maioria dos trabalhos refere perda prematura do cateter^{1,5,27,28,45}. Além disso, os coelhos fazem coprofagia e a restrição a este hábito é considerada fonte de estresse ao animal, podendo

levá-lo a óbito. A cistostomia também é referida na literatura como método viável de derivação em uretroplastias^{44,48}, apesar da maior morbidade do procedimento.

Parnigotto et al.²⁴, assim como outros autores que utilizaram matrizes acelulares em uretroplastia de coelhos^{22,23,42}, não mantiveram a derivação urinária. O baixo índice de complicações relatado, mesmo em reconstruções tubulares²⁴, sugere que a presença da sonda não é o principal fator que interfere na viabilidade do enxerto e patência do lúmen uretral. Em nosso estudo, optamos por manter a sondagem uretral apenas nas primeiras 24 horas de PO, sendo que 100% dos animais perderam espontaneamente o cateter.

Apesar das diferentes técnicas propostas na literatura, a incidência de fístulas uretrocutâneas é ainda considerada a complicação mais comum em uretroplastias⁴². O material de sutura pode ser fator predisponente para sua ocorrência. No presente trabalho, utilizamos ácido poliglicólico nas uretroplastias. Cimador et al.⁴⁹, analisando 535 pacientes submetidos à correção de hipospádia, afirmaram que fios de sutura com absorção lenta, como o ácido poliglicólico, podem reduzir a incidência de fístulas por promoverem um tempo de contato maior entre as extremidades reparadas. Entretanto, segundo os autores, a meticulosa realização da técnica e a experiência do cirurgião são fatores de maior relevância na análise das fístulas. Corroborando esta afirmação, a origem do fio não

pareceu ter influências sobre a casuística de fístulas observadas em nosso estudo, uma vez que estas foram detectadas apenas nos animais do Grupo AO. A ocorrência das fístulas provavelmente esteve mais relacionada a pouca vascularização do leito, a instabilidade do enxerto e a interposição da sutura da uretra com a pele.

Inicialmente, já familiarizados com a anatomia da genitália do coelho e sabendo da escassez de tecido que encontraríamos para recobrir o enxerto, propusemos um terceiro grupo utilizando túnica vaginal para envolver a matriz de aorta, com a finalidade de mantê-la distante da sutura de pele. A ocorrência de estenose e retenção urinária foram responsáveis pelo óbito de todos os animais, com menos de 30 dias (Apêndice). Resultados similares foram relatados por Theodorescu et al.²⁸. Segundo os autores, que utilizaram enxerto tubulizado de túnica na substituição uretral, os óbitos observados ocorreram em virtude da contração das fibras cremastéricas e conseqüente estenose. Poderíamos ter otimizado os resultados obtidos com o uso de um retalho de túnica, de modo similar ao realizado por Snow⁵⁰ para prevenir fístulas em correções de hipospádias, com bons resultados. Mas, para não alterar o delineamento do estudo e da aleatoriedade dos procedimentos cirúrgicos, optamos por não dar seguimento a este grupo.

Para identificar as estenoses uretrais, utilizamos a uretrografia retrógrada, método citado em grande parte dos estudos clínicos

e experimentais^{7,22,26} e considerado o padrão-ouro para o diagnóstico de estenoses uretrais. A uretrografia identificou diminuição do lúmen uretral em animais de ambos os grupos. Apesar do maior número de estenoses observados no Grupo AO, em M3, esta diferença não foi estatisticamente significativa. A simples manipulação da uretra delgada e da pele da região genital do coelho pode predispor à inflamação e fibrose²⁹, causando estenose, independente do uso de enxertos. A incidência de fístula e estenose observada em nosso estudo é inferior a alguns relatos da literatura^{35,51-53}, que chegam a ter índice de 100% destas complicações em reconstrução uretral tubular com matriz acelular^{35,52}. Porém, no estudo em que há maior similaridade com nossa metodologia, onde matriz acelular arterial homóloga²⁴ foi utilizada em coelhos, não foram observadas estenoses em 12 meses de seguimento.

Ainda é relevante ressaltar que os fios de sutura com absorção lenta, apesar da sua possível contribuição evitando o aparecimento de fístulas, podem aumentar o risco de estenose devido à prolongada reação tecidual durante a absorção da sutura⁵⁴. De fato, ao observarmos as lâminas coradas pelo HE, concluímos que tanto os animais do Grupo AO quanto do Grupo TT apresentaram inflamação uretral moderada na lâmina própria, cujas medianas não mostraram diferença estatística entre si. A reação inflamatória caracterizada pelo predomínio de células mononucleares denota a cronicidade do processo. Entretanto, a ausência de células gigantes

tipo corpo estranho nos animais do Grupo AO confirmam a antigenicidade do material utilizado. Na presença de matrizes extracelulares biodegradáveis, a reação imunogênica não deve ocorrer se o material foi adequadamente processado⁴⁷.

Não só a reação inflamatória exacerbada como também o excesso desorganizado de fibras colágenas aumentam o risco de estenose nas uretroplastias³². A resposta do hospedeiro é afetada também pela taxa de degradação da matriz. O processo de degradação da matriz no Grupo AO foi acompanhado por maior depósito de fibras colágenas na lâmina própria. A quantidade de colágeno avaliada não foi considerada significativa do ponto de vista estatístico, mas a maior concentração nos animais que receberam a aorta mostra que a fibrose é proporcional à injúria cirúrgica, como também observado em outras pesquisas com matriz em substituição uretral tubular^{11,35}.

Com relação ao Grupo TT, a menor lesão uretral foi acompanhada por menor acúmulo de colágeno. De modo similar a outros autores, mínima ou nenhuma evidência de fibrose foi identificada em pequenas lesões uretrais, substituídas com *patch* de matriz acelular²³. Kawano, em 2007²², não observou em seu estudo a correlação entre fibrose e estenose, conforme citado por Trindade Filho³⁰, ambos utilizando *patch* de diferentes matrizes. Isto indica que não só o tamanho da matriz como

também a sua constituição pode interferir no processo cicatricial e formação de fibrose.

Shokeir et al.³⁵ acrescentam ainda que o comprimento circunferencial do enxerto está diretamente relacionado à ocorrência de fibrose e estenose, o que justifica a maior ocorrência destas alterações na presença de tubos uretrais, como observado pela nossa análise das lâminas coradas com Tricrômico de Masson.

A matriz ideal deve também permitir a epiteliação de seu lúmen e promover vascularização⁴⁷. Para que isto ocorra, o enxerto precisa ser incorporado ao receptor, ocorrendo cicatrização mediante regeneração tecidual da área lesionada. Grande parte dos pesquisadores refere o crescimento do urotélio na matriz acelular 2 a 3 semanas após sua implantação^{23,24,34}. Também observamos completa epiteliação da neouretra dos animais do Grupo AO, com hiperplasia acentuada, caracterizada por 3 ou mais camadas de células epiteliais. A presença de várias camadas epiteliais nos animais que receberam matriz também foi demonstrada por Shaul et al.¹, observando o comportamento de enxerto tubulizado de peritôneo na uretra.

A hiperplasia epitelial do Grupo AO diferiu de modo significativo da regeneração observada na uretroplastia término-terminal do Grupo TT, caracterizada em sua maioria por 2 camadas celulares. O mesmo não foi encontrado por outros autores, que identificaram 3 a 4 camadas de

epitélio estratificado colunar em coelhos submetidos à simples uretrotomia⁵⁵.

Abaixo do epitélio, vasos sanguíneos e numerosas fibras musculares orientadas longitudinalmente são encontrados na lâmina própria da uretra³⁴. Observamos que as análises a respeito da quantidade de vasos por campo e da ocupação dos campos por fibras musculares apresentaram diferenças estatísticas significantes, sendo que maior número de vasos foi visto nos animais do Grupo AO enquanto que os animais do Grupo TT apresentaram maiores áreas de lâmina própria ocupada por fibras musculares. Resultados equivalentes foram relatados por Sievert et al.³⁴, que avaliaram uretroplastia término-terminal e implante de matriz acelular homóloga em coelhos, com maior neovascularização nos animais tratados com o implante e maior quantidade de fibras musculares nas uretroplastias término-terminais, após três meses.

Comparando-se o comportamento da matriz uretral acelular heteróloga e homóloga²⁵, a melhor resposta de regeneração uretral ocorreu na matriz homóloga, com neovascularização, epiteliação e regeneração muscular ocorrendo em maior intensidade e menor tempo, sugerindo que o enxerto heterólogo requer um intervalo de tempo maior para ter a mesma aparência histológica que o homólogo. Ambos os enxertos apresentaram regeneração funcional, sem sinais de rejeição.

Apesar de termos observado presença de feixes de fibras musculares nas uretroplastias com matriz acelular, acreditamos que o tempo de observação dos animais foi relativamente curto para avaliarmos a efetividade desta regeneração. Nuininga et al.¹⁵ não observaram feixes de fibras musculares no SIS, após 36 semanas de sua implantação uretral, enquanto que Rotariu⁴³ relatou completa regeneração de todas as camadas da uretra, após 18 semanas.

Em nosso estudo, a matriz acelular de aorta foi utilizada na uretroplastia do Grupo AO. A aorta é uma artéria elástica, com predomínio de elastina em suas paredes, além de colágeno e glicosaminoglicanas. No entanto, além dos vasos sangüíneos e fibras musculares, a uretra também possui lâminas elásticas, localizadas na lâmina própria³¹. Não foi possível discernir nestes animais as fibras elásticas uretrais das fibras da matriz. Apesar de não termos encontrado diferença significativa entre os dois grupos, 50% dos animais do Grupo TT apresentaram intensa quantidade de fibras elásticas nas lâminas coradas pelo Calleja. A menor agressão cirúrgica promovida pela uretrotomia foi responsável pela maior integridade da estrutura uretral original. Por outro lado, o fato de não termos encontrado maior quantidade de fibras elásticas nos animais do Grupo AO, que receberam uma matriz rica neste componente, nos permite afirmar que aos 3 meses grande parte deste material havia sido absorvido. Em alguns animais foi possível visualizar aglomerados desorganizados de

fibras elásticas na lâmina própria, logo abaixo do epitélio, sugerindo resquícios de matriz.

As alterações histopatológicas que caracterizaram os diferentes grupos estudados não possibilitaram determinar macro ou microscopicamente os limites entre a matriz acelular e a uretra normal. Outros autores que realizaram uretroplastia tubular em coelhos citam a impossibilidade de diferenciação entre a matriz e a uretra, com um período de observação semelhante^{24,25,51}. Diversos artigos que utilizaram matrizes acelulares em reconstrução parcial de uretra referem integração completa, em média aos 90 dias^{23,42,43}. Deve-se considerar, entretanto que a área dos enxertos tubulares é proporcionalmente maior, se comparada ao enxerto *onlay*, necessitando de um tempo maior para completa absorção. Atala et al.²¹ afirmou ser difícil definir o período exato para que ocorra o completo remodelamento devido às várias fontes de matrizes. Quando matriz arterial homóloga foi utilizada na uretroplastia de coelhos, observou-se integração após 3 meses, mas a disposição de fibras colágenas e musculares similar à uretra normal foi vista apenas com 12 meses²⁴. Acreditamos que o período proposto em nosso estudo foi relativamente curto para observarmos completa reorganização da estrutura uretral.

Mesmo considerando os sucessos após reconstruções tubulares, tanto em ensaios experimentais²⁴ como clínicos¹², resultados obtidos com enxertos *onlay* de matriz permanecem superiores, semelhante

ao que ocorre com enxertos autólogos. A faixa de uretra que permanece íntegra nas reconstruções *onlay* diminui a contração circunferencial do enxerto, mantendo sua estabilidade e alinhamento. A maior preservação de tecido que ocorre nas uretroplastias *onlay* atua como um bom leito para o enxerto, garantindo neovascularização mais rápida e eficiente nestes modelos⁵⁶.

Os benefícios proporcionados pelo uso de matriz acelular incluem sua pronta utilização e regeneração uretral, mas estenoses ainda ocorrem em altas proporções nos materiais tubulares^{35,51,53}. Para otimizar nossos resultados, consideramos que algumas possibilidades seriam aumentar o diâmetro do enxerto, realizar suturas oblíquas e sobrepor à matriz um retalho vascularizado de túnica vaginal.

Poderíamos ainda associar cultura de células do hospedeiro, feita a partir de biópsia prévia, ao uso da matriz. Alguns estudos que realizaram semeadura dos tubos com cultura de células^{35,51} relatam índices superiores de sucesso. Os resultados promissores, com significativa diminuição de complicações nestes grupos, pode ser a alternativa futura para viabilizar a implantação das matrizes acelulares em seres humanos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

1. O método desenvolvido no presente estudo, utilizando SDS e álcool, foi eficiente para promover a descelularização e conservação da aorta, tornando-a uma matriz acelular para pronta utilização.
2. Não houve diferença significativa na incidência de estenose entre os grupos AO e TT no momento M3, mas a ocorrência de fístula foi maior nos animais do Grupo AO.
3. A matriz acelular heteróloga utilizada na uretroplastia de coelhos apresentou boa integração para o período estudado, com intensa epitelização e vascularização. Contudo, neste período não houve regeneração muscular satisfatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. Shaul DB, Xie HW, Diaz JF, Mahnovski V, Hardy BE. Use of tubularized peritoneal free grafts as urethral substitutes in the rabbit. J Ped Surg. 1996; 31: 225-8.
2. Gearhart JP, Borland RN. *Onlay* island flap urethroplasty: variation on a theme. J Urol. 1992; 148: 1507-9.
3. Hendren WH, Crooks KK Tubed free skin graft for construction of male urethra. J Urol. 1980; 123: 858-61.
4. El-Sherbiny MT, Abol-Enein H, Dawaba MS, Ghoneim MA. Treatment of urethral defects: skin, buccal or bladder mucosa, tube or patch? An experimental study in dogs. J Urol. 2002; 167: 2225-8.
5. Fairbanks JL, Sheldon CA, Khoury AE, Gilbert A, Bove KE. Free bladder mucosal graft biology: unique engraftment characteristics in rabbits. J Urol. 1992; 148: 663-6.
6. Coleman JW. The bladder mucosal graft technique for hypospadias repair. J Urol. 1981; 125: 708-10.

¹ Normas para referências bibliográficas – Vancouver - International Committee of Medical Journal Editors Uniform - Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

7. Calado AA, Macedo A Jr, Delcelo R, de Figueiredo LF, Ortiz V, Srougi M. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: experimental study in rabbits. *J Urol*. 2005; 174: 765-70.
8. Foinquinos RC, Calado AA, Janio R, Griz A, Macedo A Jr, Ortiz V. The tunica vaginalis dorsal graft urethroplasty: initial experience. *Int Braz J Urol*. 2007; 33: 523-9.
9. Bhargava S, Chapple CR. Buccal mucosal urethroplasty: is it the new gold standard? *BJU Int*. 2004; 93:1191-3.
10. Barbagli G, Palminteri E, Guazzoni G, Montorsi F, Turini D, Lazzeri M. Bulbar urethroplasty using buccal mucosa grafts placed on the ventral, dorsal or lateral surface of the urethra: are results affected by the surgical technique? *J Urol*. 2005; 174: 955-8.
11. Foroutan HR, Khalili A, Geramizadeh B, Rasekhi AR, Tanideh N. Urethral reconstruction using autologous and everted vein graft: an experimental study. *Pediatr Surg Int*. 2006; 22: 259-62.
12. Shaeer OK, El-Sadat A. Urethral substitution using vein graft for hypospadias repair. *J Pediatr Urol*. 2006; 2: 518-21.
13. Barbagli G, Lazzeri M. Urethral reconstruction. *Current Opinion in Urology*. 2006; 16: 391-5.
14. Barbagli G, Palminteri E, De Stefani S, Lazzeri M. Penile urethroplasty. Techniques and outcomes using buccal mucosa grafts. *Contemp Urol*. 2006; 18: 25-33.

15. Wood DN, Allen SE, Andrich DE, Greenwell TJ, Mundy AR. The morbidity of buccal mucosal graft harvest for urethroplasty and the effect of nonclosure of the graft harvest site on postoperative pain. *J Urol*. 2004; 172: 580-3.
16. Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatric Research*. 2008; 63: 569-75.
17. Atala A. Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering. *Urol Clin North Am*. 1999; 26: 157-65.
18. Beiko DT, Knudsen BD, Waterson JD. Urinary tract biomaterials. *J Urol*. 2004; 171: 2438-44.
19. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
20. Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, Shapiro IM, Tarola NA, Leichter RF, Carabasi RA, Dimuzio PJ. Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering. *J Vasc Surg*. 2004; 40: 146-53.
21. Grossklaus DJ, Shappell SC, Adams MC, Brock JW. Small intestinal submucosa as a urethral coverage layer. *J Urol*. 2001; 166: 636-9.
22. Kawano PR. Colágeno acelular e mucosa oral na substituição parcial da uretra: estudo comparativo em coelhos. [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2007.

23. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair. *Urology*. 1999; 54: 407-10.
24. Parnigotto PP, Gamba PG, Conconi MT, Midrio P. Experimental defect in rabbit urethra repaired with acellular aortic matrix. *Urol Res*. 2000; 28: 46-51.
25. Sievert KD, Tanagho EA. Organ-specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. *World J Urol*. 2000; 18: 19-25.
26. Kahveci R, Kahveci Z, Sirmali S, Özcn M. Urethral reconstruction with autologous vein graft: an experimental study. *Br J Plast Surg*. 1995; 48: 500-3.
27. Sievert KD, Wefer J, Bakircioglu ME, Nunes L, Dahiya R, Tanagho EA. Heterologous acellular matrix graft for reconstruction of the rabbit urethra: histological and functional evaluation. *J Urol*. 2001; 165: 2096-102.
28. Theodorescu D, Balcom A, Smith CR, McLorie GA, Churchill BM, Khoury AE Urethral replacement with vascularized tunica vaginalis: defining the optimal form of use. *J Urol*. 1998; 159: 1708-11.
29. Scherz HC, Kaplan GW, Boychuk DI, Howard ML, Parriz H. Urethral healing in rabbits. *J Urol*. 1992; 148: 708-10.
30. Trindade Filho, J.C.S. Avaliação funcional, morfométrica e histológica da matriz acelular de aorta e da mucosa bucal quando implantados na uretra: estudo experimental no coelho [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2002.

31. Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs*. 2000; 24: 217-23.
32. Kjaer TB, Nilsson T, Madsen PO Total replacement of part of the canine urethra with lyophilized vein homografts. *Invest Urol*. 1976; 14: 159-61.
33. Palleschi JR, Tanagho EA. Urethral tube grafts in dogs. Prothesis of dacron lined silicone. *Invest. Urol*. 1978; 15: 408-11.
34. Sievert KD, Bakircioglu ME, Nunes L, Tu R, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous acellular matrix graft for urethral reconstruction in the rabbit: histological and functional evaluation. *J Urol*. 2000; 163: 1958-65.
35. Shokeir A, Osman Y, Gabr M, Mohsen T, Dawaba M, el-Baz M. Acellular matrix tube for canine urethral replacement: is it fact or fiction? *J Urol*. 2004; 171: 453-6.
36. Shokeir A, Osman Y, El-Sherbiny M, Gabr M, Mohsen T, El-Baz M. Comparison of partial urethral replacement with acellular matrix versus spontaneous urethral regeneration in a canine model. *Eur Urol*. 2003; 44: 603-9.
37. Probst M, Piechota HJ, Dahiya R, Tanagho EA. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU Int*. 2000; 85: 362-71.

38. Narita Y, Matsunuma H, Murase Y, Ueda Y. Decellularized ureter for tissue-engineered small-caliber vascular graft. *J Artif Organs*. 2008; 11:91–99.
39. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005; 27: 566-71.
40. Liao J, Joyce¹ EM, Sacks MS. Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet. *Biomaterials*. 2008; 29: 1065–74.
41. Gratzner PF, Harrison RD, Woods T. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. *Tissue Eng*. 2006; 12: 2975-83.
42. Nuininga JE, van Moerkerk H, Hanssen A, Hulsbergen CA, Oosterwijk-Wakka J, Oosterwijk E et al. Rabbit urethra replacement with a defined biomatrix or small intestinal submucosa. *Eur Urol*. 2003; 44: 266-71.
43. Rotariu P, Yohannes P, Alexianu M, Gershbaum D, Pinkashov D, Morgenstern N, Smith AD. Reconstruction of rabbit urethra with surgisis small intestinal submucosa. *J Endourol*. 2002;16: 617-20.
44. Macedo Jr A, Srougi M. Hipospádias. *Rev Ass Med Bras*. 1998; 2: 141-5.

45. 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.
46. Monfort G, Bretheau D, Di Benedetto V, Bankole R. Urethral stricture in children: treatment by urethroplasty with bladder mucosa graft. *J Urol.* 1992; 148:1504-6.
47. Santucci RA, Barber TD. Resorbable extracellular matrix grafts in urologic reconstruction. *Int Braz J Urol.* 2005; 31: 192-203.
48. Churchill BM, Van Savage JG, Khoury AE, Mclorie GA. The dartos flap as an adjunct in prevent urethrocutaneous fistulas in repeat hypospadias surgery. *J Urol.* 1996; 156: 2047-9.
49. Cimador M, Castagnetti M, Milazzo M, Sergio M, De Grazia E. Suture materials: do they affect fistula and stricture rates in flap urethroplasties? *Urol Int.* 2004; 73:320-4.
50. Snow BW, Cartwright PC, Unger K. Tunica vaginalis blanket wrap to prevent urethrocutaneous fistula: an 8-year experience. *J Urol.* 1995; 153: 472-3.
51. De Filippo RE, Yoo JJ, Atala A. Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices. *J Urol.* 2002; 168: 1789-92.
52. El-Assmy A, El-Hamid MA, Hafez AT. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int.* 2004; 94: 1132-5.

53. Fu Q, Deng CL, Liu W, Cao YL. Urethral replacement using epidermal cell-seeded tubular acellular bladder collagen matrix. *BJU Int.* 2007; 99: 1162-5.
54. Nanni L, Vallasciani S, Fadda G, Perrelli L. Free peritoneal grafts for patch urethroplasty in male rabbits. *J Urol.* 2001; 165: 578-80.
55. Kropp BP, Ludlow JK, Spicer D, Rippey MK, Badylak SF, Adams MC et al. Rabbit urethral regeneration using small intestinal submucosa *onlay* grafts. *Urology.* 1998; 52:138-42.
56. Wessells H, McAninch JW Use of free grafts in urethral stricture reconstruction. *J Urol.* 1996; 155: 1912-5.

Apêndice

Ilustrações referentes ao grupo associando o uso da túnica vaginal à matriz acelular – realização da técnica em 6 animais.

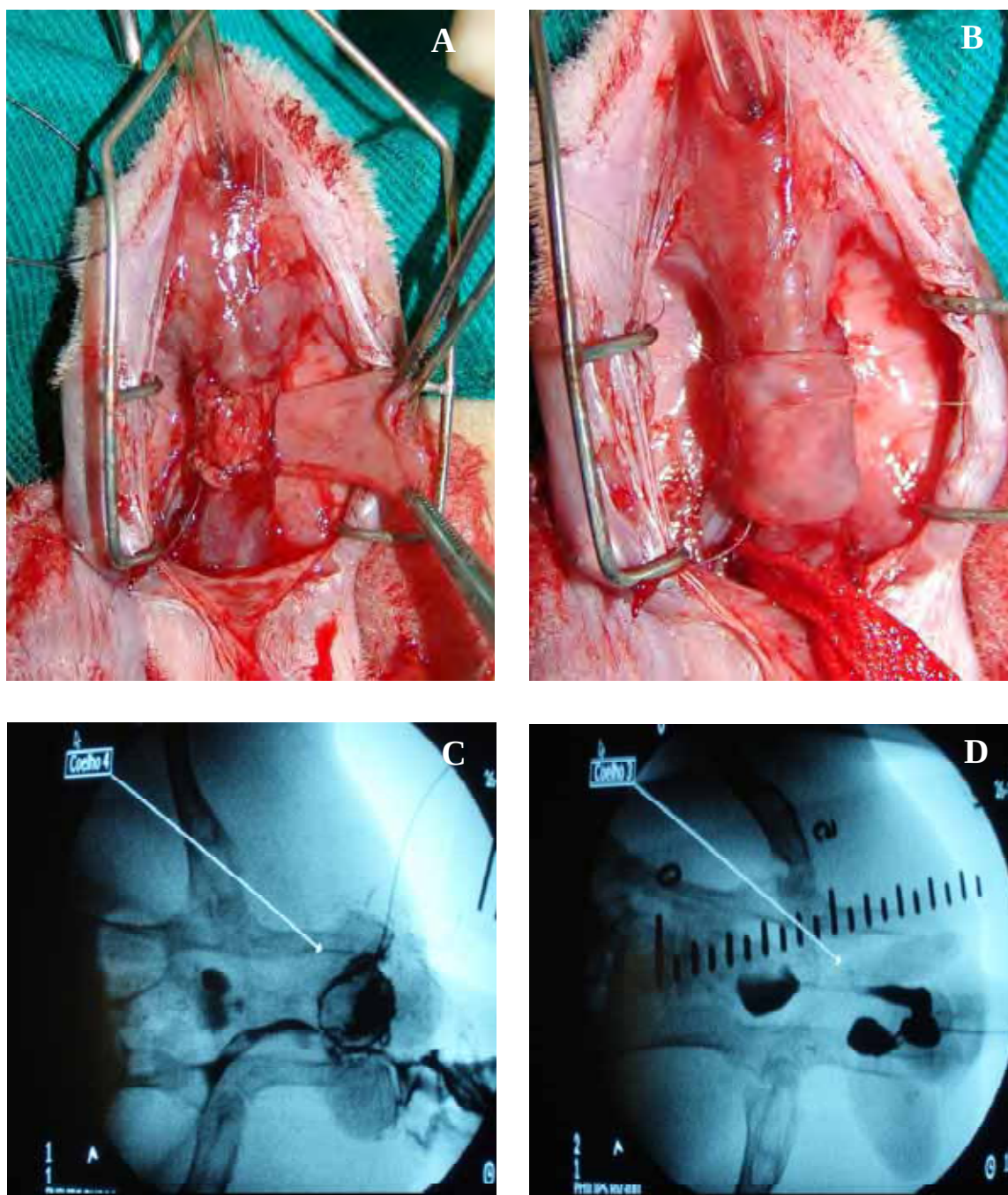


Figura I- A e B – Ilustração do retalho vascularizado de túnica, envolvendo a matriz; C- Fístula e estenose, observadas aos 15 dias de PO; D- Estenose.

Anexo

ANEXO 1 - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal