

*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*

*Campus de Botucatu*

**SUBMUCOSA INTESTINAL SUÍNA ACELULAR E SEMEADA COM  
CÉLULAS MUSCULARES LISAS HOMÓLOGAS NA REPARAÇÃO  
TECIDUAL DA BEXIGA DE CÃES**

**VICTOR JOSÉ VIEIRA ROSSETTO**

BOTUCATU

2012

*Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*

*Campus de Botucatu*

**SUBMUCOSA INTESTINAL SUÍNA ACELULAR E SEMEADA COM  
CÉLULAS MUSCULARES LISAS HOMÓLOGAS NA REPARAÇÃO  
TECIDUAL DA BEXIGA DE CÃES**

**VICTOR JOSÉ VIEIRA ROSSETTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Adj. Dr<sup>a</sup> Cláudia Valéria Seullner Brandão

Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Ass. Dr<sup>a</sup> Lígia Souza Lima Silveira da Mota

**Nome do autor:** Victor José Vieira Rossetto

**Título:** SUBMUCOSA INTESTINAL SUÍNA ACELULAR E SEMEADA COM  
CÉLULAS MUSCULARES LISAS HOMÓLOGAS NA REPARAÇÃO TECIDUAL  
DA BEXIGA DE CÃES

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Adj. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente da banca e orientadora

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ/ UNESP, Campus de Botucatu-SP

Prof<sup>a</sup> Ass. Juliany Gomes Quitzan

Membro titular da banca

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária/ PUCPR

São José dos Pinhais-PR

Prof. Ass. Bruno Watanabe Minto

Membro titular da banca

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

FCAV/ UNESP, Campus de Jaboticabal-SP

**Data da defesa:** 14 de maio de 2012

Aos meus pais, Antonio José e Maria Amélia,  
pelo amor e incentivo a mim dispensados  
ao longo dessa trajetória e por toda a minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Valéria Seullner Brandrão, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo exemplo no exercício da profissão de Médico Veterinário, pela confiança em mim depositada, e pelas palavras de carinho e estímulo, próprias de uma verdadeira amiga.

À minha Co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lígia Souza Lima Silveira da Mota, do Departamento de Genética do IBB/UNESP, pela amizade e pelos ensinamentos generosamente transmitidos durante a fase de padronização do cultivo celular, imprescindíveis para a concretização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Canevese Rahal – coordenadora do Conselho do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu-SP – e em nome deste, pela oportunidade concedida para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

Aos animais, razão dos meus estudos e dedicação, pelas suas valorosas contribuições.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noeme Sousa Rocha, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela participação na banca de qualificação e pelas suas sugestões. Pelos ensinamentos durante a análise histopatológica das amostras e pela validação do método de análise digital.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscilla Macedo de Souza, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela realização e interpretação dos exames ultrassonográficos e por sua ampla disposição em realizá-los.

Ao Prof. Dr. Hélio Amante Miot, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB/UNESP, pela pronta disposição na captura e análise das imagens digitais. Pelos ensinamentos em metodologia científica e pela realização da análise estatística.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Kiomi Takahira, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jaqueline Mamprim, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, por compartilharem seus conhecimentos e pelas preciosas sugestões para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Joaquim Tilton Ranzani, do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela participação na banca de qualificação e por suas estimáveis sugestões.

Ao pós-graduando Fabrizio Grandi, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e pelo auxílio durante a análise histopatológica. Pela padronização da técnica de imunocitoquímica e pelas importantes sugestões para a boa condução deste trabalho.

Às pós-graduandas Lídia Matsubara e Nádia Crosignani, do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e realização dos procedimentos anestésicos nos animais incluídos neste trabalho.

Ao técnico administrativo Valquiria Santiloni Cury, do Departamento de Genética do IBB/ UNESP, pela amizade e pelas sugestões durante a fase de padronização do cultivo celular.

Ao técnico administrativo Maria Valéria M. Dalanezi, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pelas colorações

histológicas das amostras e auxílio na confecção das lâminas.

Aos então pós-graduandos Thiago Müller e Danuta Doiche, ambos do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ/ UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e pela realização dos exames ultrassonográficos durante a fase de seleção dos animais utilizados no trabalho.

Aos residentes do Laboratório Clínico da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu pela realização e auxílio na interpretação dos incontáveis exames laboratoriais. Pela prontidão com que faziam isso.

Aos pós-graduandos Raquel Beneton Ferrioli e Hugo Enrique Orsini Beserra, ambos do Departamento de Clínica da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela validação do método de análise digital das imagens histopatológicas.

Ao Laboratório Ceva, pela doação do antibiótico Marbopet®, utilizado no pós-operatório dos animais incluídos no trabalho.

Às funcionárias do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ/ UNESP, Campus de Botucatu, Léo e Maria Clara, pela colaboração nos cuidados com o material cirúrgico.

Ao funcionário Luis, pela limpeza do canil e alimentação dos animais incluídos no trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, José Roberto, Maria e Patrícia, pela atenção e disponibilidade.

Ao técnico administrativo Fernando José P. Listoni, do Laboratório de Microbiologia, e à pós-graduanda Marília Junqueira Franco, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ/ UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e pela realização e interpretação dos exames de urina tipo II dos animais incluídos neste trabalho.

À então pós-graduanda Luciana Santini Iamaguti, do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e colaboração no levantamento bibliográfico.

Ao residente João Rodrigues Zamae, do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pela amizade e a correção da versão em inglês do resumo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães, do Departamento de Clínica Veterinária, e aos graduandos envolvidos no Projeto Amigos do Canil, da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, pelo auxílio na manutenção da sanidade dos animais do canil.

Aos graduandos Leonardo Prado, Bruna Fernanda Firmo e Renata Marujo pela amizade e o auxílio durante a realização das cirurgias e exames pós-operatórios dos animais incluídos no trabalho.

Aos amigos da Pós-graduação, residência e graduandos, pela convivência e por partilharem seus conhecimentos.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução das diversas etapas associadas deste trabalho.

## LISTA DE TABELAS

|                   |                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Avaliação clínica dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de polaciúria no período pós-operatório.....                                                             | 69 |
| <b>Tabela 2.</b>  | Avaliação clínica dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de polaciúria no período pós-operatório.....                                                              | 69 |
| <b>Tabela 3.</b>  | Avaliação clínica dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de hematúria macroscópica no período pós-operatório.....                                                 | 70 |
| <b>Tabela 4.</b>  | Avaliação clínica dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de hematúria macroscópica no período pós-operatório.....                                                  | 70 |
| <b>Tabela 5.</b>  | Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de proteinúria no período pós-operatório.....                                                       | 73 |
| <b>Tabela 6.</b>  | Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de proteinúria no período pós-operatório.....                                                        | 73 |
| <b>Tabela 7.</b>  | Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de cristalúria no período pós-operatório.....                                                       | 74 |
| <b>Tabela 8.</b>  | Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de cristalúria no período pós-operatório.....                                                        | 74 |
| <b>Tabela 9.</b>  | Distribuição das principais alterações ultrassonográficas visibilizadas aos 30 (M30) e 60 (M60) dias de pós-operatório nos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT)..... | 81 |
| <b>Tabela 10.</b> | Principais características do tecido de reparação das superfícies externa e interna da bexiga dos animais dos grupos Controle e Tratado aos 60 dias de pós-operatório.....      | 86 |

|                   |                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 11.</b> | Principais alterações histológicas observadas na amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT) após 60 dias da cistoplastia..... | 98  |
| <b>Tabela 12.</b> | Distribuição da quantidade de tecido muscular das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT).....                             | 102 |
| <b>Tabela 13.</b> | Distribuição da quantidade de tecido colagenoso das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT).....                           | 102 |

## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                       |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> | Implante da membrana SIS acelular em bexiga de cão. Note a colocação de suturas em padrão simples contínuo entre as bordas da membrana e a bexiga.....                                                | 50 |
| <b>Figura 2.</b> | Fragmentos de tecido muscular de bexiga de cão transferidos para tubo estéril para centrifugação e ressuspensos em meio de cultura enriquecido.....                                                   | 50 |
| <b>Figura 3.</b> | Membrana semeada com CMLH sob o fundo de placa de Petri. Note os pesos de vidro posicionados sob os vértices da membrana (seta).....                                                                  | 53 |
| <b>Figura 4.</b> | Morfologia das células musculares lisas vesicais à microscopia de fase em microscópio invertido. Note células poligonais achatadas e alongadas (seta), com projeções celulares irregulares (40x)..... | 62 |
| <b>Figura 5.</b> | Células musculares lisas vesicais à microscopia de fase em microscópio invertido após 10 dias do cultivo inicial. Note a confluência de aproximadamente 70% (40x).....                                | 62 |
| <b>Figura 6.</b> | Fotomicrografia de células musculares lisas vesicais com citoplasma imunomarcado com anti $\alpha$ -actina de músculo liso. (Imunocitoquímica pelo método LSAB; 20x).....                             | 64 |
| <b>Figura 7.</b> | Fotomicrografia de fibras colágenas coradas em vermelho, organizadas em múltiplas camadas. Note os inúmeros núcleos fusiformes marcadamente basofílicos no interior dessas fibras (H/E,10x).....      | 64 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 8.</b>  | Fotomicrografia de membrana SIS semeada com células musculares lisas vesicais. Note fibras colágenas coradas em azul (seta), entremeadas a fibras colágenas coradas em vermelho (Masson, 20x).....                                                                                       | 65 |
| <b>Figura 9.</b>  | Distribuição dos pesos corpóreos médios dos animais dos grupos Controle e Tratado durante o período total de avaliação.....                                                                                                                                                              | 68 |
| <b>Figura 10.</b> | Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 30 dias de pós-operatório em animal do GC. Note os pontos ecogênicos flutuantes no interior da bexiga (microcálculos) e a parede com infiltrado inflamatório na camada muscular (aspecto anecogenico mais evidente na parede) (seta)..... | 78 |
| <b>Figura 11.</b> | Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 30 dias de pós-operatório em animal do GC. Notar a estrutura hipoeecogênica e cística, aderida à membrana, sugestiva de pseudomassa (seta).....                                                                                           | 78 |
| <b>Figura 12.</b> | Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note entre os cursores a parede espessada no local de implantação da membrana.....                                                                                                             | 79 |
| <b>Figura 13.</b> | Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note entre os cursores a estrutura hipereecogênica formadora de sombra acústica, compatível com urólito.....                                                                                   | 79 |
| <b>Figura 14</b>  | Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note o achatamento dorso ventral e compartimentalização em terço médio da bexiga (seta).....                                                                                                   | 80 |

- Figura 15.** Aspecto macroscópico do tecido de reparação na face externa da vesícula urinária de cão. Notar os pontos simples interrompidos utilizando fio de náilon para demarcação dos limites da membrana (seta)..... 84
- Figura 16.** Fragmento obtido de biópsia de bexiga de cão reparada com SIS semeada com CMLH no M60. Note a superfície brilhante e com boa continuidade com o tecido vesical original..... 85
- Figura 17.** Estrutura semelhante à camada da membrana, frouxamente aderida à face intraluminal da bexiga de cão reparada com SIS acelular. Note os pequenos urólitos incrustados em sua superfície e bordas..... 85
- Figura 18.** Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a variação de espessura do urotélio com área de falha completa do revestimento (seta) (HE; 6,25x)..... 89
- Figura 19.** Fotomicrografia de região central de cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a presença de fibras colágenas multidirecionais coradas em azul (Masson; 6,25x)..... 89
- Figura 20.** Fotomicrografia de região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a presença de fragmentos de membrana sendo fagocitados por macrófagos (seta) (HE, 32x)..... 90
- Figura 21.** Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar ao centro a presença de fragmentos longitudinais de aspecto fibrilar e hialinizado, corados em azul (Masson, 32x)..... 90

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 22.</b> | Fotomicrografia da região central de lesão vesical reparada com a SIS acelular (GC). Notar ausência da arquitetura vesical típica e presença de fibras musculares coradas em vermelho, dispostas em feixes de diversos calibres. (Masson, 4x).....  | 92  |
| <b>Figura 23.</b> | Fotomicrografia da região central da cistoplastia tratada com a SIS semeada com CMLH (GT). Notar ao centro ninho de Brunn subjacente a área focal de hiperplasia urotelial. (HE, 12,5x).....                                                        | 92  |
| <b>Figura 24.</b> | Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS semeada com CMLH (GT). Notar os inúmeros fascículos musculares corados em vermelho (Masson, 12,5x).....                                                                        | 94  |
| <b>Figura 25.</b> | Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS acelular e a bexiga original (GC). Notar os feixes musculares de diferentes calibres, distribuídos de forma aleatória (Masson, 2x).....                                                       | 97  |
| <b>Figura 26.</b> | Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS semeada com CMLH e a bexiga original (GT). Notar a disposição típica das camadas longitudinal externa (E), circular média (M) e longitudinal interna (I) da túnica muscular (Masson, 2x)..... | 97  |
| <b>Figura 27.</b> | Dispersão das amostras centrais dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à quantidade de macrófagos.....                                                                                                                                    | 100 |
| <b>Figura 28.</b> | Dispersão das amostras periféricas dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à quantidade de macrófagos.....                                                                                                                                 | 100 |
| <b>Figura 29.</b> | Dispersão das amostras na região central dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras musculares.....                                                                                                                   | 103 |

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 30.</b> Dispersão das amostras na região de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras musculares..... | 103 |
| <b>Figura 31.</b> Dispersão das amostras na região central dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras colágenas.....       | 104 |
| <b>Figura 32.</b> Dispersão das amostras na região de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras colágenas.....  | 104 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**GC:** Grupo Controle

**GT:** Grupo Tratado

**SIS:** Submucosa intestinal suína

**CMLV:** Células musculares lisas vesicais

**CMLH:** Células musculares lisas homólogas

**CCT:** Carcinoma de células transicionais

**DTUIF:** Doença do trato urinário inferior dos felinos

**M1:** 24 horas de pós-operatório

**M3:** 72 horas de pós-operatório

**M7:** 7 dias de pós-operatório

**M30:** 30 dias de pós-operatório

**M60:** 60 dias de pós-operatório

ROSSETTO, V.J.V. **Submucosa intestinal suína acelular e semeada com células musculares lisas homólogas na reparação tecidual da bexiga de cães**. Botucatu/SP, 2012, 159p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## RESUMO

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga abrangem traumas graves com perda tecidual extensa, neoplasias, cistites intersticiais, disfunções neurológicas e anormalidades congênitas. Devido a inúmeras complicações associadas às técnicas de cistoplastia com o emprego de segmentos gastrointestinais, o presente estudo teve como objetivo analisar comparativamente a reparação anatômica da bexiga de cães utilizando-se a submucosa intestinal suína (SIS) acelular e semeada com células musculares lisas homólogas (CMLH), bem como avaliar as possíveis complicações e efeitos colaterais inerentes a cada um dos tipos de enxerto empregados. Para tal foram utilizados 10 cães adultos, fêmeas, subdivididos em dois grupos, sendo: Grupo Controle (GC), constituído por cinco animais submetidos à cistoplastia com SIS; e Grupo Tratado (GT), constituído por cinco animais submetidos à cistoplastia com SIS semeada com CMLH. As células foram obtidas a partir de fragmentos de espessura completa, provenientes de bexigas de cães que vieram a óbito por motivos não infecciosos ou neoplásicos, cultivadas e expandidas *in vitro*. Em todos os grupos foi criado um defeito de 3 cm x 2 cm, preservando-se a região do trígono vesical, o qual foi reparado pelos respectivos implantes. Os cães de ambos os grupos foram submetidos à biópsia cirúrgica com 60 dias de pós-operatório, sendo essas obtidas da área central do tecido neoformado e da adjacência entre o mesmo e a bexiga original. Após a implantação dos enxertos, os

animais foram avaliados por meio de exames clínico, ultrassonográfico abdominal e laboratoriais. Todas as amostras foram destinadas à avaliação histológica pelas colorações de H/E e Tricromio de Masson, analisadas com um fotomicroscópio Nikon conectado ao sistema de análise de imagem ImageJ. Não foram verificadas alterações clínicas, laboratoriais e/ou histopatológicas compatíveis com rejeição em nenhum dos grupos avaliados. Adicionalmente, a SIS semeada com as células musculares lisas homólogas promoveu processo de reparação tecidual com maior porcentagem de fibras musculares lisas e arquitetura histológica típica na região da cistoplastia.

**Palavras-chave:** bioengenharia de tecidos; reconstrução tecidual; SIS; terapia celular.

**ROSSETTO, V.J.V. Acellular swine intestinal submucosa and seeded with homologous smooth muscle cells in tecidual repairing of the bladder of dogs.**

Botucatu/SP, 2012, 159p. Dissertação (Master in Veterinary Surgery) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

### **ABSTRACT**

The indications for bladder surgical repair includes severe trauma with extensive tissue loss, neoplasms, interstitial cystitis, neurological disfunctions and congenital abnormalities. The reconstruction of the bladder has been traditionally performed by transposition of autologous segments of the stomach or intestine. However, the performing of cystoplasty using gastrointestinal segments may result in numerous complications such as infection, urolithiasis and retraction of the graft. Due to these complications, the present study had as aim to comparatively analyze the anatomic repair of the bladder of dogs using the swine intestinal submucosa (SIS) acellular and seeded with homologous smooth muscle cells (HSMC), as well as assess the possible side effects and complications of each type of graft used. For such purpose, 10 adult female dogs were used and divided in two groups: Control Group (CG), constituted of five animals submitted to cystoplasty with SIS; and Treated Group (TG), constituted of five animals submitted to cystoplasty with SIS seeded with HSMC. The cells were obtained from full thickness fragments deriving from bladders of dogs that came to death, for non infectious nor neoplastic, cultivated and expanded in vitro. In all the groups it was created a defect of 3 cm x 2 cm, preserving the bladder trigone region, which was repaired later by the respective implants. The dogs of both groups had been

submitted to a surgical biopsy 60 days after surgery, being these obtained from the central area of the newly formed tissue and from the adjacent area between the bladder and the original tissue. After the implantation of the grafts, the animals were frequently assessed by clinical and laboratorial examination, and abdominal ultrasound. All samples went through histological evaluation by H/E and Masson's Trichrome staining method, analyzed with a Nikon Photomicroscope connected to the ImageJ image analysis system. There were no clinical, laboratory and/or histopathological abnormalities consistent with rejection in both assessed groups. Additionally, SIS seeded with homologous smooth muscle cells promoted repair tissue process with highest percentage of smooth muscle fibers and typical histological architecture in the region of cystoplasty.

**Key-words:** bioengineered tissue; cell therapy; SIS; tissue reconstruction.

## SUMÁRIO

|                                                                          |              |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                             | <b>xiii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                             | <b>x</b>     |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                                        | <b>xv</b>    |
| <b>RESUMO.....</b>                                                       | <b>xvi</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                     | <b>xviii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                | <b>21</b>    |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                 | <b>24</b>    |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                     | <b>25</b>    |
| <b>3.1. Embriologia da bexiga.....</b>                                   | <b>25</b>    |
| <b>3.2. Anatomia cirúrgica da bexiga.....</b>                            | <b>26</b>    |
| <b>3.3. Princípios da cirurgia reconstrutiva da bexiga.....</b>          | <b>27</b>    |
| <b>3.4. Indicações de cirurgia reconstrutiva da bexiga.....</b>          | <b>30</b>    |
| <b>3.5. Principais técnicas de cirurgia reconstrutiva da bexiga.....</b> | <b>33</b>    |
| 3.5.1. Enterocistoplastia e Gastrocistoplastia.....                      | 33           |
| 3.5.2. Cistoplastia com materiais sintéticos.....                        | 35           |
| 3.5.3. Cistoplastia com materiais naturais.....                          | 37           |
| 3.5.4. Terapia celular.....                                              | 40           |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODO.....</b>                                         | <b>44</b>    |
| <b>4.1. Seleção dos animais e ambiente de experimentação.....</b>        | <b>44</b>    |
| <b>4.2. Aspectos éticos.....</b>                                         | <b>45</b>    |
| <b>4.3. Procedimentos cirúrgicos.....</b>                                | <b>45</b>    |
| 4.3.1. Procedimentos pré-operatórios e anestésicos.....                  | 45           |
| 4.3.2. Cistoplastia.....                                                 | 46           |

|              |                                                                      |           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.3.       | Avaliação macroscópica e biópsia vesical.....                        | 47        |
| 4.3.4.       | Procedimentos pós-operatórios imediatos.....                         | 48        |
| <b>4.4.</b>  | <b>Cultura das células musculares lisas da bexiga.....</b>           | <b>48</b> |
| 4.4.1.       | Obtenção das células musculares lisas da bexiga.....                 | 48        |
| 4.4.2.       | Isolamento e cultivo das CMLH.....                                   | 49        |
| 4.4.3.       | Semeadura das CMLH sobre a SIS.....                                  | 52        |
| <b>4.5.</b>  | <b>Avaliação clínica e laboratorial.....</b>                         | <b>54</b> |
| <b>4.6.</b>  | <b>Avaliação ultrassonográfica abdominal.....</b>                    | <b>55</b> |
| <b>4.7.</b>  | <b>Histopatologia.....</b>                                           | <b>56</b> |
| <b>4.8.</b>  | <b>Análise quantitativa inflamatória, vascular e tecidual.....</b>   | <b>57</b> |
| <b>4.9.</b>  | <b>Análise digital das imagens histopatológicas.....</b>             | <b>58</b> |
| 4.9.1.       | Análise quantitativa das fibras colágenas e musculares.....          | 58        |
| 4.9.2.       | Quantificação da espessura da túnica muscular.....                   | 59        |
| <b>4.10.</b> | <b>Análise dos urólitos.....</b>                                     | <b>59</b> |
| <b>4.11.</b> | <b>Análise estatística.....</b>                                      | <b>60</b> |
| <b>5.</b>    | <b>RESULTADOS.....</b>                                               | <b>61</b> |
| <b>5.1.</b>  | <b>Padronização do cultivo celular.....</b>                          | <b>61</b> |
| 5.1.1.       | Isolamento e cultivo das células musculares lisas vesicais.....      | 61        |
| 5.1.2.       | Semeadura das células musculares lisas vesicais sobre a SIS.....     | 63        |
| <b>5.2.</b>  | <b>Avaliação clínica e laboratorial.....</b>                         | <b>66</b> |
| 5.2.1.       | Avaliação clínica.....                                               | 66        |
| 5.2.2.       | Avaliação laboratorial.....                                          | 71        |
| <b>5.3.</b>  | <b>Avaliação ultrassonográfica abdominal.....</b>                    | <b>75</b> |
| <b>5.4.</b>  | <b>Avaliação macroscópica da bexiga após implantação da SIS.....</b> | <b>82</b> |

|             |                                                                             |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.5.</b> | <b>Análise da composição dos urólitos.....</b>                              | <b>87</b>  |
| <b>5.6.</b> | <b>Análise histopatológica descritiva.....</b>                              | <b>87</b>  |
| 5.6.1.      | Análise histopatológica das amostras centrais.....                          | 87         |
| 5.6.2.      | Análise histológica das amostras de transição.....                          | 93         |
| <b>5.7.</b> | <b>Análise quantitativa do processo inflamatório.....</b>                   | <b>99</b>  |
| <b>5.8.</b> | <b>Análise histopatológica digital quantitativa.....</b>                    | <b>101</b> |
| 5.8.1.      | Análise quantitativa das fibras colágenas e musculares.....                 | 101        |
| 5.8.2.      | Quantificação da espessura da túnica muscular.....                          | 105        |
| <b>6.</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                       | <b>106</b> |
| <b>6.1.</b> | <b>Cultivo celular.....</b>                                                 | <b>106</b> |
| <b>6.2.</b> | <b>Avaliação clínica e laboratorial.....</b>                                | <b>111</b> |
| <b>6.3.</b> | <b>Avaliação ultrassonográfica abdominal.....</b>                           | <b>118</b> |
| <b>6.4.</b> | <b>Avaliação macroscópica e análise da composição dos urólitos.....</b>     | <b>122</b> |
| <b>6.5.</b> | <b>Análise histopatológica descritiva e do processo inflamatório.....</b>   | <b>125</b> |
| <b>6.6.</b> | <b>Análise descritiva e quantitativa das fibras colágenas e musculares.</b> | <b>134</b> |
| <b>7.</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                      | <b>138</b> |
| <b>8.</b>   | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                     | <b>140</b> |
| <b>9.</b>   | <b>ANEXOS.....</b>                                                          | <b>158</b> |
| <b>10.</b>  | <b>TRABALHO CIENTÍFICO.....</b>                                             | <b>159</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga abrangem desde lesões mecânicas a exemplo de traumas graves com perda tecidual extensa, até processos neoplásicos, cistites intersticiais recorrentes, pseudotumores inflamatórios, disfunções neurológicas e anormalidades genitourinárias congênitas (O’SULLIVAN e BARRETT, 1993; ATALA, 2000; KROPP e CHENG, 2000; DANIELSSON et al., 2006; KOH et al., 2008).

Em todas essas situações, a reconstrução da bexiga após cistectomia parcial tem sido tradicionalmente desempenhada por meio de transposição de segmentos autólogos de estômago ou intestino. Entretanto, segundo a literatura médica, a realização de cistoplastia com o emprego de segmentos gastrointestinais pode resultar em inúmeras complicações, como infecção, urolitíase e retração do enxerto (GITLIN et al., 1999, KROPP e CHENG, 2000; DANIELSSON et al., 2006). Devido a essas complicações, muitos tipos de enxerto têm sido utilizados na reparação tecidual da bexiga, aloplásticos ou biodegradáveis, com ou sem a implantação de células. Entre os diferentes materiais empregados, a submucosa intestinal suína (SIS) constitui o mais amplamente investigado e destaca-se pela sua capacidade de regeneração da bexiga e outros tecidos do trato urinário (YIANG e GUOMIN, 2008).

A neobexiga formada a partir da SIS é macroscopicamente similar a uma bexiga normal, porém difere histologicamente quanto à organização e quantidade das fibras musculares lisas, presentes de maneira desorganizada e em menor número (KROPP et al., 1996). Uma alternativa para minimizar tal ocorrência e reparar mais fielmente a anatomia da bexiga é a implantação de células associada à bioengenharia tecidual.

As diferentes fontes celulares utilizadas na engenharia de tecidos possuem suas

vantagens e inconvenientes. Embora as células autólogas – obtidas do próprio indivíduo – constituam a primeira opção, a quantidade de células que se consegue obter é geralmente muito limitada, em especial se a idade do paciente for avançada ou incorrer a riscos para sua vida (ALVEZ et al., 2009). Segundo Yinan e Guomin (2008), a utilização de células autólogas também não é aplicável em pacientes com câncer, uma vez que está associada a um elevado risco de recorrência tumoral devido à coleta e cultura de células neoplásicas. Uma alternativa seria o uso de células homólogas, obtidas a partir de cadáveres, por exemplo.

De acordo com os autores supracitados, as células homólogas possuem as mesmas características das células autólogas, incluindo a sua capacidade de se auto-replicarem. Essas células podem ser propagadas e expandidas *in vitro* para a produção de bancos celulares, onde são preservadas recorrendo-se às técnicas de criopreservação (ALVEZ et al., 2009). Adicionalmente, quando expandidas *in vitro*, as células homólogas possuem potencial imunogênico bastante reduzido e podem ser utilizadas com segurança no reparo de lesões em diferentes tipos de tecido (WAKITANI et al., 2008).

Ainda nesse contexto, é reduzido o número de trabalhos clínicos que empregam recursos de bioengenharia de tecidos e terapia celular no cão, o que ressalta a necessidade de maiores estudos também nessa espécie.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo analisar comparativamente a reparação anatômica da bexiga de cães utilizando-se a SIS acelular e semeada com células musculares lisas homólogas, bem como avaliar as possíveis complicações locais e sistêmicas, inerentes a cada um dos tipos de enxerto empregados.

Adicionalmente, pretende-se avaliar o método de cultivo celular e a semeadura das células sobre a SIS.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Embriologia da bexiga**

A porção caudal do intestino posterior embrionário forma a cloaca que serve de reservatório comum aos tratos digestivo e urinário. A partir dessa porção do intestino desenvolve-se o alantóide, divertículo que atravessa o orifício umbilical e estabelece continuidade com o celoma extraembrionário, participando da formação da placenta nos mamíferos domésticos e cuja função é o armazenamento de excretas (MOORE e PERSAUD, 2000; NODEN e DE LAHUNTA, 2001).

O ângulo de união entre o alantóide e o intestino posterior, constituído pelo endoderma do intestino e o mesoderma esplâncnico que o reveste, cresce no sentido caudal formando o septo urorretal (NODEN e DE LAHUNTA, 2001). Esse, por sua vez, com a progressão do desenvolvimento embrionário, divide a cloaca em duas câmaras: a dorsal que origina o reto e parte do canal anal; e a ventral que se comunica com o alantóide e origina o seio urogenital (MOORE e PERSAUD, 2000; NODEN e DE LAHUNTA, 2001; AGUT et al., 2002; MAUCH e ALBERTINE, 2002).

O seio urogenital é contínuo cranialmente com a porção intrabdominal do alantóide que se dilata para formar a bexiga. A essa porção dá-se o nome de parte vesical do seio urogenital. As demais porções do alantóide se estendem do vértice da bexiga ao orifício umbilical e originam posteriormente o úraco. Já a parte média do seio urogenital se desenvolve para formar o colo da bexiga (NODEN e DE LAHUNTA, 2001).

O epitélio da bexiga deriva do endoderma que reveste a parte vesical do seio urogenital, enquanto que as outras camadas de sua parede são originadas do mesoderma esplâncnico adjacente e exterior ao seio. Com o desenvolvimento da bexiga, contudo,

outras estruturas são incorporadas à parede. É o caso das porções distais dos ductos mesonéfricos que contribuem para a formação do trígono da bexiga (MOORE e PERSAUD, 2000; NODEN e DE LAHUNTA, 2001; AGUT et al., 2002).

### **3.2. Anatomia cirúrgica da bexiga**

A bexiga é um órgão muscular oco, cujas funções são armazenar temporariamente e eliminar a urina produzida nos rins. Sua localização depende do volume de urina presente, sendo habitualmente encontrada no interior do canal pélvico, e quando distendida deslocada cranial e ventralmente para o abdome caudal. Sua posição é frouxamente mantida por ligamentos laterais bilaterais e pelo ligamento ventral médio que conecta a bexiga à sínfise púbica e linha alba (WALDRON, 2003; FOSSUM et al., 2008).

A bexiga pode ser dividida em três porções, denominadas ápice (porção cranial), colo (porção entre o corpo da bexiga e a uretra proximal) e corpo (porção média). A região onde os ureteres desembocam é denominada trígono vesical e localiza-se sobre a superfície dorsal do colo. Essa região possui formato triangular e seus vértices compreendem os dois óstios ureterais e o orifício uretral (WALDRON, 2003; FOSSUM et al., 2008).

A superfície dorsal da bexiga faz relação com o intestino delgado e cólon descendente. Além disso, nas fêmeas a bexiga relaciona-se dorsalmente com o corpo uterino. Já nos machos, a relação dorsal ocorre com os ductos deferentes que avançam em sentido cranio-caudal (WALDRON, 2003).

A túnica muscular da bexiga é mal definida e formada por uma camada longitudinal interna e uma circular externa de fibras musculares lisas em toda a sua

extensão. A partir da porção inferior dos ureteres há também uma camada longitudinal externa que associada às demais camadas origina o esfíncter interno da uretra. Ao conjunto destas camadas musculares denomina-se músculo detrusor da bexiga (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008).

O suprimento sanguíneo da bexiga é feito a partir das artérias vesicais caudal e cranial, ramos respectivamente das artérias urogenital e umbilical (FOSSUM et al., 2008). O sangue venoso é drenado para as veias pudendas internas, enquanto que os vasos linfáticos drenam para os linfonodos hipogástricos, sublobares e ilíacos (WALDRON, 2003).

A inervação da bexiga é complexa e realizada pelos nervos pélvico, hipogástrico e pudendo. O nervo pélvico origina-se nos segmentos sacrais S1-S3 da medula espinhal e é responsável pela inervação parassimpática da bexiga. Seu estímulo induz a contração do músculo detrusor da bexiga e consequentemente a eliminação de urina. O nervo hipogástrico origina-se nos segmentos medulares lombares L1-L4 em cães e L2-L5 em gatos e é responsável pela inervação simpática da bexiga, bem como da musculatura lisa do esfíncter uretral interno. Seu estímulo resulta no relaxamento do músculo detrusor e na contratura do esfíncter uretral interno, ocasionando o enchimento da bexiga por urina. Já o nervo pudendo origina-se entre os segmentos sacrais S1-S3 e fornece inervação somática ao músculo estriado do esfíncter uretral externo (DEWEY, 2006; TUDURY et al., 2006).

### **3.3. Princípios da cirurgia reconstrutiva da bexiga**

A cistotomia (incisão da bexiga que permite acesso ao seu lúmen) e cistectomia (remoção de uma porção da bexiga) consistem nas principais cirurgias envolvendo a

bexiga de pequenos animais e destinam-se ao tratamento de diversas afecções vesicais. Após a sua realização, a cicatrização tecidual ocorre em aproximadamente 14 a 21 dias por meio da combinação de processos de regeneração epitelial, síntese e remodelagem do tecido cicatricial, hipertrofia e proliferação da musculatura lisa, e distensão do tecido remanescente (WALDRON, 2003; FOSSUM et al., 2008).

Segundo estudos, o alongamento do tecido remanescente ocorre em alguns meses desde que excisada a parede da bexiga em até 75% da sua extensão e preservados o trígono e uretra proximal (SAITO et al., 1996; WALDRON, 2003). Nas situações em que a área total removida seja superior a esse valor, contudo, deve-se recorrer à reconstrução tecidual da bexiga a fim de garantir a complacência vesical (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; ATALA, 2000; DANIELSSON et al., 2006).

No que compreende a cirurgia reconstrutiva vesical, o material considerado ideal, definido por Andretto et al. (1981), deve atender aos seguintes requisitos: ser biodegradável e absorvido; não predispor à formação de urólitos ou infecção urinária; oferecer resistência e impermeabilidade; possuir neutralidade imunológica; não induzir ou promover uma neoplasia; não alterar a fisiologia dos órgãos adjacentes; manter a capacidade volumétrica e contratilidade vesical; e não induzir metaplasia óssea.

Adicionalmente, o material ideal não deve resultar em processo inflamatório exacerbado ou desenvolver resposta do tipo corpo estranho, deve permitir o rápido crescimento do seu epitélio de revestimento e não alterar o equilíbrio eletrolítico em virtude da absorção inadequada de íons de amônia e cloreto em suspensão na urina (GITLIN, 1999; KROPP e CHENG, 2000; ROCHA e WHANG, 2004).

Desse modo, a reparação de tecidos lesionados ou funcionalmente alterados pode ser realizada utilizando-se enxertos sintéticos ou biológicos, sendo esses provenientes de tecidos autólogos, homólogos ou heterólogos. Os tecidos autólogos são

oriundos do mesmo indivíduo e podem ser obtidos a partir da pele, segmentos do trato gastrointestinal, mucosa de diversas regiões anatômicas, entre outros. Já os tecidos homólogos são obtidos de um doador vivo ou cadavérico imediatamente ao óbito, geneticamente não idêntico, mas da mesma espécie do receptor. Por fim, os tecidos heterólogos são aqueles obtidos de outras espécies, como o pericárdio bovino ou eqüino, a serosa ou submucosa intestinal suína e outras matrizes acelulares, empregados experimentalmente na reconstrução tecidual em humanos e cães (ATALA, 2000; TEIXEIRA et al., 2007).

A fundamentação para o uso desses tecidos, seja qual for sua origem, está na elevada capacidade proliferativa das células que os compõem naturalmente e no fato de poderem ser utilizados como arcabouço para a adesão e transplantação de diversos outros tipos celulares. Segundo Atala (2000), o emprego de células, selecionadas e transplantadas em diferentes biomateriais, permite a substituição parcial ou total de órgãos lesionados ou degenerados.

Independentemente do material escolhido, os enxertos para a reconstrução parcial da bexiga necessitam ser fixados ao tecido remanescente. Assim como nas cirurgias convencionais de bexiga, a sutura deve ser realizada empregando-se fios monofilamentares absorvíveis sintéticos com agulha atraumática, como polidioxanona, poligliconato ou poliglactina 910, dentre outros. Fios não absorvíveis em contato com o lúmen vesical podem atuar como ninho para formação de urólitos (WALDRON, 2003).

Os padrões de sutura para oclusão da bexiga podem ser invertidos ou aposicionais, sendo esses preferidos em bexigas pequenas ou cuja parede esteja significativamente espessada. A sutura pode ainda ser única ou dupla, deve envolver a submucosa a fim de garantir maior estabilidade e evitar, sempre que possível, a incorporação da mucosa (WALDRON, 2003; FOSSUM et al., 2008).

### **3.4. Indicações de cirurgia reconstrutiva da bexiga**

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga são inúmeras e abrangem ruptura com laceração tecidual grave, neoplasias, cistites intersticiais crônicas, disfunções neurológicas e anormalidades genitourinárias congênitas (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; ATALA, 2000; KROPP e CHENG, 2000; DANIELSSON et al., 2006; KOH et al., 2008).

A ruptura com laceração tecidual grave da parede vesical normalmente decorre de traumatismos abdominais físicos contusos ou penetrantes, dentre os quais, são especialmente comuns os acidentes envolvendo veículos automotores. A alta ocorrência de lesões extensas envolvendo a bexiga nesses casos deve-se ainda pela presença concomitante de lesões ortopédicas, como fraturas pélvicas cujos fragmentos ósseos estejam voltados para o interior do canal pélvico (WALDRON, 2003). Segundo Figuera et al. (2008) em estudo retrospectivo, avaliando 155 cães atropelados, 16 (10,3%) animais apresentavam ruptura de órgãos ocos, sendo a bexiga o mais acometido.

Nas situações em que o grau de laceração e/ou contusão dos tecidos for excessivo e suspeitando-se de sua viabilidade, é recomendada técnica de reforço da sutura com retalho de serosa de segmento intestinal adjacente ou, a depender da gravidade, outras técnicas reconstrutivas mais avançadas (WALDRON, 2003).

Em relação às neoplasias de bexiga, diversos autores afirmam que sua incidência em comparação às demais localizações anatômicas, corresponde a aproximadamente 2% de todas as neoplasias no cão. Entretanto, apesar de pouco comum, são de real importância em uma população canina bastante numerosa, agravado sobremaneira devido ao seu difícil e tardio diagnóstico (KNAPP, 2001; HENRY, 2007). Segundo

Chun (2006), o diagnóstico das neoplasias de bexiga, em especial o carcinoma de células transicionais (CCT), torna-se difícil devido ao fato das células neoplásicas serem muito similares às células transicionais reativas a quaisquer outros processos inflamatórios.

O CCT consiste na neoplasia vesical mais rotineiramente observada em cães, porém outros tipos de tumores vesicais menos comuns também têm sido descritos, como o carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma indiferenciado, papiloma, fibroma, rabdomiossarcoma, pseudotumores inflamatórios e outros tumores mesenquimais (KNAPP, 2001; ROCHA et al., 2002; CHUN, 2006; MADARAME et al., 2006; FOSSUM et al., 2008).

No que diz respeito à ressecção de tumores envolvendo grandes extensões da parede vesical, a técnica de cistectomia radical se faz imprescindível para a obtenção de margens livres e melhor prognóstico ao paciente (ROSSETTO et al., 2009). Entretanto, apesar da técnica de cistectomia ser eficiente, a utilização de enxertos é necessária em diversas situações para a otimização dos resultados (FIGUEIREDO, 2004).

Adicionalmente, a ressecção de porções da bexiga pode ser requerida, embora em menor frequência, nos casos de necrose secundária a cistites graves e crônicas de etiologia variada. Segundo estudos anteriores, as infecções bacterianas ocorrem mais comumente em cães do que em gatos (NELSON e COUTO, 2010); já nestes, a etiologia tende a ser multifatorial e de natureza indeterminada, sendo os termos doença do trato urinário inferior dos felinos (DTUIF) e cistite idiopática felina, os mais empregados atualmente (RECHE JR. e HAGIWARA, 2004). De acordo com Wouters et al. (1998), avaliando 13 gatos com cistite idiopática felina, em quatro animais foi verificado desnudamento focal ou difuso da mucosa e, em um caso, cistite transmural difusa crônica.

Entretanto, tanto nas cistites bacterianas em cães quanto nas idiopáticas em gatos, estão presentes lesões da parede vesical que podem levar à recidiva ou reinfecção do trato urinário e, mediante ausência de resposta ao tratamento clínico, podem ser passíveis de remoção cirúrgica e reconstrução tecidual (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; RECHE JR. e HAGIWARA, 2004; DANIELSSON et al., 2006; NELSON e COUTO, 2010).

Em relação às disfunções neurológicas do trato urinário inferior, a cirurgia reparadora da bexiga permite melhora na qualidade de vida dos pacientes com atonia do músculo detrusor secundária a afecções envolvendo o sistema nervoso central, uma vez que possibilita a manutenção da complacência vesical (KROPP e CHENG, 2000). Além disso, a atonia do músculo detrusor quando não tratada acarreta em incontinência urinária, infecção recorrente do trato urinário e aumento da pressão intravesical, podendo levar à deterioração renal (LEES, 2004; LORENZ e KORNEGAY, 2006). As principais afecções centrais que cursam com distúrbios miccionais incluem a mielodisplasia e lesões da medula espinhal (KROPP e CHENG, 2000).

As anormalidades congênitas quando não diagnosticadas e adequadamente tratadas também podem resultar em infecção e outras lesões do trato urinário, necessitando de reparo cirúrgico e, em casos mais graves, reconstrução tecidual (DANIELSSON et al., 2006).

Entre as principais anormalidades congênitas envolvendo a bexiga incluem-se persistência do úracó e extrofia da bexiga. A primeira consiste na manutenção de um conduto embrionário, resultando em um cisto, seio ou divertículo da parede vesical (WALDRON, 2003). Já a segunda trata-se de uma má-formação da linha média abdominal e parede ventral da bexiga, ocasionando a eversão desta através de defeito abdominal ventral, escoamento de urina e queimaduras (ADER e HOBSON, 1978). Em

ambas as situações, e mais impreterivelmente na extrofia da bexiga, faz-se necessária a reconstrução ou substituição da parede vesical (ADER e HOBSON, 1978; DANIELSSON et al., 2006).

### **3.5. Principais técnicas de cirurgia reconstrutiva da bexiga**

#### **3.5.1. Enterocistoplastia e gastrocistoplastia**

A reconstrução da bexiga tem sido historicamente realizada desde os primeiros estudos conduzidos por Tizzoni e Foggi (1888) (caput THÜROFF et al., 1986), os quais substituíram a bexiga de cães, após cistectomia parcial, por segmento ileal interposto entre as porções remanescentes (O’SULLIVAN e BARRETT, 1993; SCHAUFFERT et al., 1999; GRECA et al., 2004; RIGAUD e LE NORMAND, 2004).

A partir de então, as técnicas mais amplamente difundidas consistem na gastrocistoplastia e enterocistoplastia, e caracterizam-se respectivamente pela obtenção de segmentos pediculados da curvatura maior do estômago e de diferentes porções do intestino, sendo o íleo e o cólon os mais empregados (SCHWARZ et al, 1991; LIMA et al., 1995; UENO et al., 2001).

Quanto à gastrocistoplastia, Piser et al. (1987) descrevem a ressecção de um segmento de antro e fundo estomacal em forma de cunha, com base na curvatura maior e ápice, próximo à curvatura menor, preservando-se o pedículo vascular formado pela artéria gastroepiplóica, a fim de reconstruir parte da parede vesical previamente resseccionada.

Já a enterocistoplastia consiste na utilização de um segmento intestinal com aporte vascular intacto e incisado em sua borda antimesentérica (SCHWARZ et al., 1991). A mucosa intestinal do segmento obtido pode ser opcionalmente erodida com o

auxílio de uma tesoura de Metzembaum ou lâmina de bisturi, sendo sua ressecção, contudo, recomendável por resultar numa melhor e mais rápida epitelização do enxerto (SCHWARZ et al., 1991; ABÍLIO et al., 2003). Subsequentemente, o segmento intestinal pediculado é suturado à porção remanescente do tecido original, assumindo a configuração de uma “bolsa” como reservatório (SCHWARZ et al., 1991). Nos casos em que se faz necessário, pode-se ainda realizar a reconstrução do óstio ureteral (SCHWARZ et al., 1991; KRISTJARSON et al., 1996).

As principais vantagens que motivaram o uso corrente de segmentos do estômago ou intestino abrangem sua disponibilidade e o reconhecimento biológico. Entretanto, segundo a literatura, esses procedimentos podem resultar em inúmeras complicações, sendo as principais: infecção; obstrução intestinal; anormalidades eletrolíticas; perfuração; produção de muco; e carcinogênese (GITLIN et al., 1999, KROPP e CHENG, 2000; DANIELSSON et al., 2006).

As complicações resultantes de contaminação bacteriana são os maiores desafios nas cirurgias reconstrutivas com utilização de segmentos intestinais em humanos. Segundo Messetti et al. (2011), complicações infecciosas provenientes de contaminação fecal ocorrem em 18% a 20% dos casos. Quanto à carcinogênese, Gitlin et al. (1999) verificaram alterações histológicas que poderiam contribuir para o seu desenvolvimento, como metaplasia glandular e crescimento exagerado de um epitélio transicional hiperplásico nas junções entero e gastrovesicais.

Associada a essas potenciais complicações, a enterocistoplastia não permite o completo esvaziamento vesical por micção normal e demanda tempo cirúrgico significativo (O’SULLIVAN e BARRETT, 1993; KWON et al., 2008). Já o emprego de segmentos do estômago está relacionado com o desenvolvimento de anemia ferropriva ou megaloblástica, hipoproteinemia, síndrome do estômago curto,

esteatorréia e vômitos incoercíveis (GRECA et al., 2004).

### 3.5.2. Cistoplastia com materiais sintéticos

Muitos são os materiais sintéticos utilizados na reparação de defeitos vesicais após cistectomia ou com o intuito de aumentar a complacência vesical em bexigas retraídas, sendo classificados, de acordo com a sua capacidade de degradação e substituição por tecido original, em não degradáveis ou inabsorvíveis, como polivinil, silicone, politetrafluoroetileno (Teflon) e poliéster (Dacron), e degradáveis ou absorvíveis, como poliglactina e gelatina (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; YOO et al., 1998; ATALA, 2000; CUNHA JÚNIOR, 2006; DANIELSSON et al., 2006).

Apesar da ampla disponibilidade dos materiais sintéticos, esses e principalmente os não degradáveis, estão relacionados com a ocorrência de inúmeras complicações, incluindo distúrbios metabólicos, perfuração ou extrusão do enxerto, infecção, produção excessiva de muco e formação de urólitos (ASHKAR e HELLER, 1967; O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; DANIELSSON et al., 2006).

Segundo O'Sullivan e Barrett (1993), as complicações verificadas com a utilização de enxertos sintéticos não degradáveis devem-se ao fato desses materiais não possibilitarem a completa reepitelização da bexiga, o que predispõe à incrustação por sais dissolvidos na urina e infecção de difícil erradicação. Rohrmann et al. (1996) avaliando reservatórios de silicone na substituição da bexiga em cinco ovinos, referem a ocorrência de infecção em três animais (60%). O tempo médio de sobrevivência, entretanto, foi de 348 dias e os autores não verificaram a presença de incrustação nos componentes prostéticos utilizados.

Em relação à extrusão do material sintético, Ashkar e Heller (1967), utilizando enxerto de silicone, referem manutenção do posicionamento do mesmo até a ocorrência

de infecção, quando então o material foi deslocado para o lúmen vesical. Segundo O'Sullivan e Barrett (1993), a extrusão do material também é passível de ocorrer com enxertos de politetrafluoroetileno e poliéster, e resultaria do crescimento da mucosa abaixo do enxerto implantado.

As complicações supramencionadas, contudo, são menos usualmente verificadas com a utilização dos materiais sintéticos degradáveis, visto esses serem reabsorvidos ou incorporados como arcabouço durante o processo de reparação tecidual (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; BADYLACK, 2002; KIM et al., 2008). Segundo Know et al. (2008), avaliando oito cães submetidos à cistectomia parcial seguida por reparação da bexiga utilizando enxerto de poliglactina acelular e associado a células uroteliais e musculares autólogas, verificaram à histologia, em ambos os grupos, morfologia próxima ao normal após seis meses da cirurgia. Além disso, não foram observadas complicações sistêmicas durante todo o período de avaliação.

Já Youssef et al. (1988), utilizando enxerto de poliglactina após cistectomia em ratos, verificaram boa reparação da parede vesical associada à ocorrência de urolitíase secundária à infecção urinária em três (15%) dos 20 animais avaliados. Monsour et al. (1987), em estudo similar avaliando a reparação da bexiga de ratos com enxerto de poliglactina, verificam como principal complicação a substituição do enxerto de poliglactina por tecido cicatricial.

De acordo com O'Sullivan e Barrett (1993) e mais recentemente Zhang et al. (2006), a diminuição da capacidade contrátil da bexiga secundária à deposição de um tecido cicatricial e, consequente contratura do enxerto, seria uma das principais complicações atribuídas ao emprego dos materiais sintéticos degradáveis (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993; ZHANG et al., 2006).

### 3.5.3. Cistoplastia com materiais naturais

Os materiais naturais têm sido amplamente utilizados tanto em estudos experimentais quanto em pacientes com alguma disfunção gastrointestinal que inviabilize as técnicas de gastro ou enterocistoplastia (BADYLAK, 2004; MOON et al., 2010). Dentre os diferentes materiais naturais utilizados na reconstrução da bexiga podem-se citar o emprego de membranas placentárias e de pericárdio equino ou bovino (ANDRETTO et al., 1981; FISHMAN et al., 1987). Segundo Moon et al. (2010), a utilização desses seria indicada por não apresentarem as complicações descritas previamente com o uso dos segmentos gastrointestinais e atuarem como suporte para a adesão, migração e proliferação celular.

Andretto et al. (1981), utilizando fragmentos de pericárdio equino com dimensões de 6 cm x 4 cm na reparação de bexiga de 22 cães, verificaram completo revestimento epitelial do enxerto após aproximadamente 120 dias, e ausência de complicações clínicas, como urolitíase ou inflamação. O exame do sedimento urinário não apresentou alterações importantes e a urografia excretora permitiu visibilizar boa integridade anatômica com a porção vesical remanescente. Resultados semelhantes também foram observados por Kambic et al. (1992), avaliando 10 cães após 2,5 anos da realização de cistoplastia com enxerto pericárdico. De acordo com os estudos, o exame histológico revelou completa reepitelização da superfície do enxerto sem a presença de irregularidades nas linhas de sutura. Entretanto, foi verificada ausência da camada muscular no ápice da bexiga, mas que não interferiu negativamente na avaliação urodinâmica.

Apesar de não verificada nos estudos supracitados, Kropp e Cheng (2000), contudo, relatam que a exposição crônica desses biomateriais à urina poderia levar a formação de cicatrizes na parede vesical e, em consequência disso sua utilização clínica

seria limitada. Com a finalidade de identificar um material biodegradável com menor potencial reativo, outros estudos foram conduzidos utilizando matrizes extracelulares à base de colágeno (KROPP et al., 1996; KROPP e CHENG, 2000).

As matrizes extracelulares têm sido utilizadas para a reconstrução de diversos tecidos e órgãos, sendo empregadas em cirurgia urológica desde a década de 1990 (DAVIS et al., 2010). Tais matrizes são provenientes de tecidos animais, confeccionadas por meio de tratamentos físico, químico e/ou enzimático que visam romper as membranas extracelulares e extrair as membranas celulares internas remanescentes (GILBERT et al., 2006; DAVIS et al., 2010). O resultado desse processo de descelularização é a formação de uma rede ultraestrutural de fibras colágenas que, assim como os materiais orgânicos descritos acima, atuam como substrato para a adesão e proliferação celulares, porém de limitado potencial antigênico, uma vez que não possuem células em sua constituição (GILBERT et al., 2006).

O crescimento e a diferenciação celulares são ainda subsidiados pela presença de diversas outras proteínas estruturais entremeadas às fibras de colágeno, além de fatores de crescimento, citocinas e glicoproteínas resistentes ao processo de descelularização (VOYTIK-HARBIN et al., 1996; KROPP e CHENG, 2000; YAMADA et al., 2003; GRECA et al., 2004; DAVIS et al., 2010).

A obtenção de um substrato que favorecesse a adesão e proliferação celulares aliada ao limitado potencial antigênico das matrizes extracelulares propiciaram diversos estudos no âmbito da cirurgia urológica envolvendo a utilização principalmente da submucosa intestinal suína (SIS) (KROPP e CHENG, 2000). A SIS é uma matriz extracelular elaborada por meio da remoção mecânica das camadas mucosa, serosa e muscular do intestino delgado de suínos, seguida de descelularização por tratamentos diversos (KROPP et al., 1996; KROPP e CHENG, 2000).

Kropp et al. (1996), avaliando 19 cães após 15 meses da cistectomia de 35-45% da bexiga e cistoplastia imediata com SIS, não verificaram a ocorrência de rejeição ou quaisquer outras complicações locais e sistêmicas. Greca et al. (2004), em estudo avaliando a SIS como alternativa para o aumento da capacidade vesical em oito cães também não observaram a ocorrência de seroma, hematoma, abscesso, fístula, deiscência, aderências e litíase. Adicionalmente, segundo ambos os estudos, a SIS permitiu a proliferação do urotélio e tecidos conjuntivo e vascular sobre o enxerto mesmo já aos 30 dias de pós-operatório. Kropp et al. (1996), descrevem ainda após o mesmo período, a ocorrência das três camadas histológicas (mucosa, muscular e serosa), porém, com perdas da organização e arquitetura normal da camada muscular em algumas regiões.

Dentre as demais matrizes extracelulares utilizadas na reparação vesical podem-se citar as derivadas de tecidos como derme e bexiga, normalmente de origem suína, sendo a última também denominada BSM (Bladder Submucosal Matrix) (BADYLAK, 2004; KIM et al., 2008; DAVIS et al., 2010). Assim como a SIS, são constituídas basicamente por colágeno, porém podem diferir quanto aos tipos predominantes. De acordo com Davis et al. (2010), a SIS é constituída principalmente por colágeno do tipo I, enquanto que a BSM apresenta proporcionalmente maiores quantidades de colágeno dos tipos III, IV e VI.

Entretanto, apesar das diferenças moleculares, estudos experimentais e clínicos com as diversas matrizes extracelulares têm apresentado em geral resultados semelhantes (KIM et al., 2008; DAVIS et al., 2010). Probst et al. (2000), avaliando sete cães submetidos à cistoplastia com BSM homóloga, verificaram à histologia invasão de células uroepiteliais já aos 30 dias de pós-operatório com completa reparação das áreas periféricas aos sete meses. Poucas células inflamatórias mononucleares foram

verificadas após 30 dias da cirurgia.

Apesar dos resultados promissores, Know et al. (2008), verificaram que os enxertos acelulares induziram acentuada reação do tipo corpo estranho quando comparados aos implantados com células. Davis et al. (2010), sugerem que a presença de resquícios de DNA porcino nas matrizes extracelulares sejam os responsáveis pela acentuada reação inflamatória. Em concordância, Badylak (2004) também infere que agentes foto-oxidantes e químicos, empregados no processo de descelularização, possam estar envolvidos e diante da especulação, a principal recomendação da maioria dos autores tem sido avaliar a real segurança desses materiais por meio de estudos prospectivos longos. A associação desses materiais a técnicas de cultivo celular, abordadas a seguir, constitui outra opção para evitar ou minimizar essa e demais potenciais complicações.

#### 3.5.4. Terapia celular

Visando aprimorar os resultados obtidos com o uso de matrizes extracelulares e outros materiais sintéticos degradáveis, a bioengenharia com base na terapia celular tornou-se uma alternativa à reparação da bexiga (ATALA et al., 2006). O emprego de células, selecionadas e transplantadas em diferentes materiais, permite a substituição parcial ou total de órgãos lesados ou degenerados (ATALA, 2000). No que se refere à cirurgia urológica, a utilização de células uroepiteliais e musculares lisas possibilitou a reparação anatômica e funcional da bexiga (KWON et al., 2008). Da mesma maneira, Yoo et al. (1995), avaliando a reparação uretral por meio do uso de enxertos biodegradáveis semeados com células uroepiteliais e musculares, constataram que a transplantação das células foi efetiva no retorno à função tecidual.

Adicionalmente, o uso de células em enxertos previne a formação de contraturas

e a sua reabsorção, uma vez que a ocorrência de processo inflamatório exacerbado, induzido pelo contato prolongado de urina com o enxerto desnudo, ou seja, sem a cobertura celular, seria o responsável pela sua reabsorção (CHENG et al., 1999; ATALA, 2000).

As diferentes fontes celulares utilizadas na engenharia de tecidos possuem suas vantagens e inconvenientes. As células autólogas utilizadas na reparação tecidual da bexiga podem ser obtidas de biópsias cirúrgicas da bexiga, ureter e pelve renal do paciente a ser beneficiado com a terapia celular (ATALA, 2000; ZHANG et al., 2008). Zhang et al. (2008) descrevem ainda a obtenção de células autólogas viáveis a partir da própria urina. A obtenção de células autólogas em pacientes com lesões neoplásicas, contudo, torna a segurança do procedimento bastante questionável (YINAN e GUOMIN, 2007; ZHANG et al., 2008).

Já as células homólogas podem ser obtidas de tecidos cadavéricos e consistem em uma alternativa para a reparação de tecidos lesados, uma vez que possuem as mesmas características das células autólogas, incluindo a sua capacidade de se auto-replicarem (ALVEZ et al., 2009). Segundo Wakitani et al. (2008), as células homólogas quando expandidas *in vitro* possuem também potencial imunogênico reduzido e podem ser utilizadas com segurança no reparo de lesões em diferentes tecidos.

As células podem ainda ser provenientes de outras fontes, como a medula óssea e embriões (ZHANG et al., 2008; XIONG et al., 2009). Nesses casos, as células são pluripotentes e normalmente necessitam ser diferenciadas em condições específicas para cada tipo celular desejado (ZHANG et al., 2008; KOH et al., 2009; XIONG et al., 2009).

Para o alcance de sucesso utilizando-se células, contudo, faz-se necessária a semeadura dessas sobre superfícies que contenham propriedades adequadas para adesão,

sobrevivência, diferenciação e interação com outras células também transplantadas e do tecido circunvizinho (ATALA, 2000; CUNHA JÚNIOR, 2006). De acordo com a literatura, as matrizes acelulares originadas de tecidos de mamíferos possuem tais características (ZHANG et al., 2008; EBERLI et al., 2009).

Estudos utilizando a SIS semeada com células uroepiteliais e/ou musculares lisas na reparação da bexiga apresentaram resultados favoráveis ao seu emprego. Segundo Zhang et al. (2005), avaliando a reparação tecidual da bexiga de cães com células uroepiteliais e musculares *versus* células da medula óssea, semeadas na SIS, verificaram excelente expansão do enxerto e manutenção do formato da bexiga em aproximadamente 33% (2/6) dos cães submetidos à cistoplastia com enxerto semeado com células. Paralelamente, os enxertos acelulares apresentaram falhas na organização das fibras musculares que permaneceram localizadas apenas na transição entre o enxerto e o tecido nativo, bem como retração moderada do enxerto, urolitíase e a formação de áreas de calcificação distrófica.

Já no estudo conduzido por Yoo et al. (1997), avaliando 10 cães da raça beagle, não foram observadas diferenças histopatológicas entre as bexigas neoformadas com enxerto acelular e com células uroepiteliais e musculares. A capacidade vesical, porém apresentou maior aumento nas bexigas reconstruídas com enxertos semeados com células.

Nesse contexto, as células musculares são importantes para a manutenção da integridade estrutural e organização celular do enxerto (ATALA, 2000; EBERLI et al., 2009). Enxertos que não são semeados com células musculares apresentam falha de reepitelização e complicações, pois apesar do epitélio possuir uma alta capacidade regenerativa, são as células musculares que de alguma maneira ordenam a proliferação celular (ATALA, 2000).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1. Seleção dos animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, fêmeas, com faixa etária entre cinco e nove anos, castradas, peso entre 10 e 22 quilos, procedentes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

Os animais integraram os grupos após avaliação clínica, exame coproparasitológico, hemograma completo, bioquímica sérica, urina tipo I (urinálise), urina tipo II (cultura urinária) e exame ultrassonográfico abdominal. Os exames bioquímicos compreenderam a mensuração da proteína plasmática total, albumina, uréia, creatinina e cálcio total. Todos os animais selecionados apresentaram esses exames dentro dos padrões de normalidade para a espécie.

Durante a execução do experimento, os animais permaneceram alojados em baias coletivas com dois cães cada, sendo alimentados com ração comercial<sup>1</sup>, duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Para a execução dos procedimentos cirúrgicos foram utilizadas as instalações do Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais, sendo:

Grupo Controle (GC): cinco animais submetidos à cistoplastia com enxerto de submucosa intestinal suína.

Grupo Tratado (GT): cinco animais submetidos à cistoplastia com enxerto de submucosa intestinal suína semeada com células musculares lisas homólogas.

---

<sup>1</sup> Socil Guyomarc'h Ind. Com. Ltda. – Descalvado, SP.

## 4.2. Aspectos éticos

Os procedimentos experimentais desenvolvidos estavam de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, sob parecer nº 104/2009-CEUA.

## 4.3. Procedimentos cirúrgicos

### 4.3.1. Procedimentos pré-operatórios e anestésicos

Todos os cães foram mantidos em jejum alimentar de 12 horas e hídrico de duas horas anteriormente aos procedimentos operatórios. Imediatamente antes da cirurgia, os animais foram pré-medicados com acepromazina<sup>2</sup> (0,05 mg/kg) e morfina<sup>3</sup> (0,5 mg/kg), administrados conjuntamente pela via intramuscular, além de ceftriaxona<sup>4</sup> (30 mg/kg) pela via intravenosa.

A anestesia foi induzida com propofol<sup>5</sup> (5 mg/kg), administrado ao efeito pela via endovenosa, enquanto que sua manutenção realizada com isoflurano<sup>6</sup> diluído em oxigênio.

Seguida da indução anestésica foi realizada lidocaína a 2%<sup>7</sup> com vasoconstritor (0,25 ml/kg), associada a morfina<sup>3</sup> (0,1 mg/kg), ambas pela via epidural.

Os animais foram então posicionados em decúbito dorsal, sendo realizadas ampla tricotomia e antissepsia da região abdominal com clorexidine degermante<sup>8</sup> e clorexidine

---

2 Acepran 0,2%® – Laboratório Ouro Fino

3 Dimorf® – Laboratório Cristália Prod. Quim. Farm. Ltda.

4 Ceftriaxona dissódica hemieptaidratada 1g, Nova Farma

5 Propovan® 10 mg/mL, Cristália

6 Isofurine 100 mL, Cristália

7 Xylestesin® 20mg/mL, Cristália

8 Riohex® 2%, Digluconato de Clorexidine com tensoativo, RioQuímica, S. José do Rio Preto-SP

alcoólico<sup>9</sup>.

#### 4.3.2. Cistoplastia

Para a cistoplastia foi realizada incisão retroumbilical de pele, seguida de divulsão do subcutâneo e localização da linha alba, a qual foi incisada com auxílio de lâmina de bisturi n° 24.

Após acesso à cavidade abdominal e identificação da bexiga, foi realizada cistocentese seguida de cistotomia na face ventral da bexiga para permitir a cateterização de ambos os ureteres e a uretra com cateteres para acesso venoso n° 24 e sonda uretral n° 6 ou 8, respectivamente.

Em seguida, foi realizada ressecção de um defeito retangular, de espessura completa, com aproximadamente 3 cm de comprimento X 4 cm de largura, localizado na face ventral da bexiga e preservando-se a região do trígono vesical previamente identificada.

Para a cistoplastia foi utilizada a SIS<sup>10</sup> acelular e semeada com CMLH, respectivamente nos animais do GC e GT. Nos cães do GT, a superfície semeada da SIS foi posicionada na face extraluminal da bexiga. Em ambos os grupos, a SIS foi suturada às bordas da parede vesical remanescente com fio de poliglactina 910 3-0<sup>11</sup> em padrão de sutura simples interrompido nos vértices do retalho, e padrão simples contínuo entre as bordas da membrana e a bexiga (Figura 1).

Não foi desempenhada manobra de aproximação e/ou fixação do epíplon à bexiga, procurando inclusive afastá-lo das circunvizinhanças. Para a identificação exata do local destinado a realização das biópsias, foram colocadas suturas com fio de náilon 3-0<sup>12</sup> ao longo da bexiga original e distantes 0,5 cm da linha de transição entre o enxerto e a mesma,

---

9 Riohex® 2%, Digluconato de Clorexidine alcoólico, RioQuímica, S. José do Rio Preto-SP

10 SurgiSis®, Cook Urological

11 Brasuture Ind. Com. Imp. Exp. Ltda., S. S. Gramma-SP

abrangendo-se apenas a camada serosa.

Ao término dessa sutura, foi realizada a repleção da bexiga com solução fisiológica estéril a 0,9% para verificar possíveis pontos de extravasamento. As suturas da musculatura abdominal, subcutâneo e pele foram realizadas conforme técnicas de rotina.

#### 4.3.3. Avaliação macroscópica e biópsia vesical

Após 60 dias do pós-operatório, todos os cães foram submetidos à laparotomia exploratória para a avaliação macroscópica da parede vesical, segundo os mesmos procedimentos cirúrgicos descritos anteriormente.

Nesta foram analisados, subjetivamente, a qualidade da reparação interna e externa da parede vesical, considerando-se:

- brilho na região reparada, classificado em normal ou opaco;
- continuidade, representada pela integração com o tecido adjacente e classificada em adequada ou inadequada;
- superfície da região, classificada de acordo com a topografia em plana ou depressão, e o aspecto em lisa ou irregular;
- O tecido neoformado foi ainda avaliado quanto à presença ou ausência macroscópica de porções da SIS e/ou urólitos/incrustações em sua superfície interna.

A biópsia de espessura completa da parede vesical foi feita em tira, abrangendo duas regiões distintas: a) região central da cistoplastia e b) região de transição entre o tecido neoformado e vesical original adjacente.

A cistografia após biópsia da bexiga foi realizada em padrão simples contínuo com fio de poliglactina 910 3-0<sup>10</sup>.

#### 4.3.4. Procedimentos pós-operatórios imediatos

Ao final de ambos os procedimentos cirúrgicos, foram administrados 0,5 mg/kg de morfina<sup>3</sup> e 0,2 mg/kg de meloxicam<sup>13</sup>, respectivamente pelas vias intramuscular e intravenosa.

Todos os animais foram mantidos com colar Elizabetano até a cicatrização da ferida cirúrgica. Antibioticoterapia profilática foi realizada utilizando-se marbofloxacin<sup>14</sup> por via oral, na dose de 5 mg/kg, a cada 24 horas, durante sete dias.

Adicionalmente, foram administrados meloxicam<sup>12</sup> (0,1 mg/kg, a cada 24 horas) e dipirona sódica<sup>15</sup> (25 mg/kg, a cada 8 horas) durante três dias.

A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada diariamente com solução aquosa de iodopovidine<sup>16</sup> a 1%. Os pontos de pele foram removidos entre o sétimo e décimo dia de pós-operatório.

### 4.4. Cultivo das células musculares lisas da bexiga

#### 4.4.1. Obtenção das células musculares lisas da bexiga

As células musculares lisas vesicais (CMLV) foram obtidas a partir de fragmentos de bexiga provenientes dos animais do GC no transoperatório ou de dois cães sem raça definida que vieram a óbito no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu, por motivos não infecciosos ou neoplásicos. Nestes cães, a coleta da bexiga procedeu-se imediatamente após o óbito e considerando-se os princípios de assepsia e antisepsia cirúrgicas.

Todos os fragmentos foram acondicionado em tubo estéril contendo meio de cultura

---

13 Maxicam® - Laboratório Ouro Fino

14 Marbopet®, Ceva, Brasil

15 Dipirona Sódica 50% Ibasa® - Ibasa

16 Laboriodine tópico® - Laboratório Glicolabor Ind. Farm

Ham F-12<sup>17</sup> e mantido sob refrigeração até o envio ao laboratório de Genética Animal do Instituto de Biociências/UNESP, Campus de Botucatu.

#### 4.4.2. Isolamento e cultivo das CMLH

As amostras de bexiga foram dissecadas em capela de fluxo laminar, com auxílio de instrumental cirúrgico, a fim de se obter apenas o tecido muscular. Após a sua completa fragmentação, o tecido muscular foi transferido para tubo estéril, ressuspendido em meio de cultura Ham F-12<sup>16</sup> e centrifugados a 2.000 rpm por 5 minutos (Figura 2). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o procedimento de centrifugação repetido.

Os fragmentos foram transferidos para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, contendo meio Ham F-12 acrescido de soro fetal bovino<sup>18</sup> a 20% e penicilina/estreptomicina associada a anfotericina B<sup>19</sup> a 1%.

As CMLV foram cultivadas em monocamada sob o fundo dos frascos de cultura, à temperatura de 36,7°C e pressão de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada dois dias.

As avaliações microscópicas foram realizadas rotineiramente utilizando microscopia de fase em microscópio invertido<sup>20</sup>.

Ao atingirem aproximadamente 70% de confluência celular, as células foram repicadas e transferidas para novos frascos de cultura, mantidos sob as mesmas condições descritas acima. Foram realizadas em média três passagens visando diminuir a expressão antigênica das células.

---

17 Ham F-12 Nutrient Mixture – GIBCO – Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil

18 Fetal Bovine Serum – GIBCO – Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil

19 Antibiotic-Antimycotic – GIBCO – Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo – SP, Brasil

20 Leica – Modelo Leitz DM IL



Figura 1: Implante da membrana SIS acelular em bexiga de cão. Note a colocação de suturas em padrão simples contínuo entre as bordas da membrana e a bexiga.



Figura 2: Fragmentos de tecido muscular de bexiga de cão, transferidos para tubo estéril para centrifugação e ressuspensos em meio de cultura enriquecido.

A contagem do número de células e a porcentagem de células viáveis também foram realizadas utilizando o corante Azul de Trypan<sup>21</sup>, em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer).

Para confirmação do tipo celular e validação do cultivo, as células foram isoladas com solução de tripsina versene<sup>22</sup> durante 3 minutos à 37°C, posteriormente inativada com meio Ham F-12 contendo soro fetal bovino a 5%.

O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 2 mL de meio de cultura enriquecido. Metade do volume foi transferida para novo frasco de cultura, completado com 4 mL de meio enriquecido, e as células novamente cultivadas nas mesmas condições. A outra metade do volume foi dispensada cuidadosamente sobre uma lâmina de vidro carregada eletricamente<sup>23</sup> que se encontrava no interior de uma placa de Petri estéril de 60 cm de diâmetro, a aderência celular à lâmina.

Após três horas, foi adicionado 5 mL de meio de cultura, recobrimo-se completamente o fundo da placa de Petri, bem como a lâmina com células aderidas à sua superfície. A placa de Petri foi acondicionada em estufa climatizada à temperatura de 36,7°C e pressão de 5% de CO<sub>2</sub>.

A substituição do meio foi feita a cada dois dias e em aproximadamente quatro dias da passagem inicial, quando as células apresentavam aproximadamente 70-80% de confluência, a lâmina foi fixada em álcool etílico a 95% durante 24 horas.

Posteriormente, a lâmina foi processada para técnica de imunocitoquímica pelo método LSAB. Para isso, foi realizada a sua lavagem em água corrente por três minutos, seguida de inibição da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 8% em metanol, durante 30 minutos, em ambiente escuro.

---

21 Trypan Blue Solution, Cellgro

22 ATV – Associação de Tripsina (0,2%) e Versene (0,02%) – Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – SP, Brasil

Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente por mais três minutos e dessa vez submetida à inibição dos sítios de ligação hidrofóbicos inespecíficos, utilizando-se leite desnatado<sup>24</sup> a 5% por 30 minutos.

A lâmina foi então lavada em água corrente e incubada com anticorpo primário anti-alfa actina de músculo liso<sup>25</sup>, previamente padronizado e diluído em diluente de anticorpo (Novocastra)<sup>26</sup>, “overnight” à 4°C.

Depois de realizada a incubação inicial, a lâmina foi lavada com solução de Tris (pH 7,6) e incubada com o segundo anticorpo (Biotynilated Link)<sup>26</sup> durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada nova lavagem com solução de Tris (pH 7,6) e incubação com HRP-streptavidin<sup>26</sup> por 30 minutos, também à temperatura ambiente.

Por fim, a lâmina foi incubada por três minutos com cromógeno DAB contendo substrato<sup>26</sup>. A reação foi inibida em água destilada e a lâmina contracorada pelo método de hematoxilina de Harris por 15 minutos, seguida de desidratação e montagem com lamínula e resina<sup>27</sup>. A análise da lâmina foi feita em microscopia óptica.

#### 4.4.3. Semeadura das CMLH sobre a SIS

Ao atingirem cerca de 70% de confluência celular, as células musculares lisas foram isoladas por meio de tratamento com solução de tripsina versene à 37°C, durante 3 minutos.

Em seguida, a solução de tripsina foi inativada em meio de cultivo contendo soro fetal bovino a 5%, e as células submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm. Descartado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio enriquecido e depositadas sobre a membrana, localizada no fundo de uma placa de Petri.

Após três horas, foi adicionado meio de cultura suplementar, recobrimo-se o fundo da placa de Petri. Foram posicionados pesos de vidro de 0,5 cm de diâmetro sobre os

---

23 Amitel positive charged slides

24 Molico®, Nestlé

25  $\alpha$ -SMA, Clone 1A4, Código SC32251, Mouse Monoclonal IgG 2 $\beta$ , Santa Cruz Biotechnology

26 Dako LSAB + System – HRP, Edition 06/07, Code K0679/K0690, Dako, UK

vértices da membrana, evitando que a mesma flutuasse sobre o meio (Figura 3).

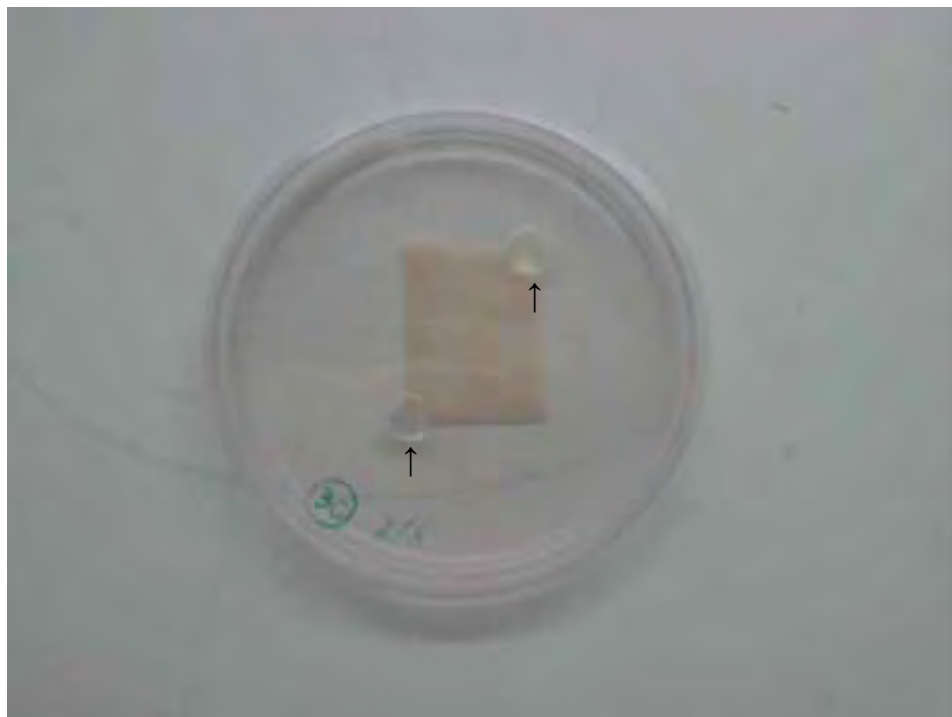


Figura 3: Membrana semeada com CMLH sob o fundo de placa de Petri. Note os pesos de vidro posicionados sob os vértices da membrana (seta).

A placa de Petri foi acondicionada em estufa climatizada à temperatura de 36,7°C e pressão de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído após dois dias e as avaliações microscópicas realizadas durante o período de incubação, utilizando-se microscópio de luz invertida.

Durante as avaliações, entretanto, não foi possível visualizar as células em sua totalidade devido à opacidade da membrana, sendo apenas identificadas as células localizadas em suas bordas.

Para a confirmação da presença das células, portanto, foi realizada a fixação da membrana em solução de formaldeído tamponado a 10%, seguida de preparo histológico usual e coloração pelo método de Tricrômico de Masson<sup>28</sup>. Desse modo, as células musculares lisas foram coradas em vermelho, entremeadas às fibras colágenas da membrana, coradas em azul.

Ao término de aproximadamente três dias de incubação, a membrana foi destinada para a implantação nos animais do GT, conforme descrito anteriormente.

#### **4.5. Avaliação clínica e laboratorial**

Os animais foram avaliados por meio de exame clínico nos períodos compreendidos por 24 (M1) e 72 (M3) horas e posteriormente aos sete (M7), 30 (M30) e 60 (M60) dias de pós-operatório. Foram avaliados as frequências cardíaca e respiratória; coloração das mucosas; temperatura corpórea; consistência, forma e tamanho dos linfonodos palpáveis; atitude do animal (prostrado ou alerta), peso corpóreo. Adicionalmente, os animais foram avaliados nos mesmos períodos acima quanto à presença ou não de anormalidades e

---

28 Easy Path Tricrômico de Masson com azul de anilina – Bio-Optica, Milão, Itália

sensibilidade dolorosa à palpação abdominal, bem como alterações miccionais e macroscópicas da urina.

O hemograma completo e o exame de urina tipo I (urinálise) foram realizados nos M7, M30 e M60, enquanto que os exames bioquímicos e urina tipo II (cultura aeróbica) realizados no M60.

Para os exames de urina tipo I e tipo II, os animais foram submetidos à cistocentese guiada por exame ultrassonográfico, excetuando-se aos sete dias de pós-operatório quando a urina foi coletada preferencialmente por micção espontânea a fim de não lesionar inadvertidamente a área reconstituída pela membrana.

Adicionalmente, foi realizado exame coproparasitológico pelos métodos de Willis e Faust previamente à cistoplastia e no M60.

Os animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos e que apresentaram complicações pós-operatórias foram tratados e acompanhados diariamente até a resolução das anormalidades.

#### **4.6. Avaliação ultrassonográfica abdominal**

Todos os animais foram submetidos ao exame ultrassonográfico abdominal previamente à cistoplastia e nos M30 e M60. Para tal, os cães foram contidos manualmente e posicionados em decúbito dorsal. A região abdominal foi tricotomizada com posterior aplicação tópica de gel acústico.

Foi utilizado aparelho de ultrassonografia<sup>29</sup> com transdutor linear multifrequencial na frequência de 6-10 MHz, documentado por impressão em vídeo printer<sup>30</sup> em papel 110 HD tipo II<sup>31</sup> e CD-rom.

As imagens abdominais foram obtidas em planos transversal e longitudinal com

---

29 Aparelho GE® - General Electric Company, modelo Logic 3

30 Modelo UP - 890 MD, Sony Brasil Ltda

especial ênfase à bexiga, objetivando avaliar seu formato e localização, bem como a presença ou ausência das seguintes alterações:

- pseudomassas;
- sedimento urinário;
- cistólitos intraluminais ou aderidos à parede vesical;
- espessamento difuso da parede vesical e no local de implantação da membrana;
- áreas de irregularidades no local de implantação da membrana ou adjacências;
- compartimentalização da bexiga.

Os demais órgãos internos e linfonodos foram avaliados quanto à presença de possíveis alterações.

#### **4.7. Histopatologia**

Todas as biopsias do GC e GT, abrangendo as áreas central e de transição, foram fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, processadas pelos métodos rotineiros de histologia e incluídas em parafina. Posteriormente, foram obtidos cortes seriados com 5 µm de espessura e as lâminas coradas pelas técnicas de Hematoxilina/Eosina (H/E) e Tricrômico de Masson.

As análises histológicas foram realizadas utilizando-se microscópio óptico<sup>32</sup>, enquanto que os cortes histológicos fotografados em microscópio digital Nikon Coolscope II<sup>33</sup>.

Foi analisada a arquitetura tecidual (H/E) quanto à disposição das túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa, bem como a presença de:

---

31 Sony Brasil Ltda

32 Carl Zeiss Axio Lab 1

33 Nikon Coolscope II, Nikon Corporation

- revestimento urotelial completo;
- hiperplasia urotelial;
- cistos de Brunn;
- estratificação típica da túnica muscular, caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular externa e longitudinal interna;
- resquícios da membrana;
- inflamação aguda, caracterizada pela presença predominantemente de células inflamatórias polimorfonucleares, graus variáveis de congestão e edema;
- inflamação crônica, caracterizada pela presença predominantemente de células inflamatórias mononucleares, tecido de granulação e fibrose.

A coloração de Tricrômico de Masson foi realizada com o intuito de identificar a natureza colagenosa de determinadas estruturas, além de diferenciar as fibras de tecido conjuntivo das musculares, permitindo a sua quantificação.

#### **4.8. Análise quantitativa inflamatória, vascular e tecidual**

Para a análise quantitativa do processo inflamatório, as lâminas histológicas, coradas pela técnica de H/E, foram digitalizadas utilizando-se microscópio digital Nikon Coolscope II.

Foram escolhidos aleatoriamente 10 campos microscópicos com aumento de 40x, abrangendo-se a túnica submucosa, para cada uma das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado.

O processo inflamatório foi quantificado com base no número de células inflamatórias em: discreto, caracterizado pela presença de cinco a 15 células inflamatórias, sejam mononucleares ou polimorfonucleares; moderado (16 a 25 células); e acentuado

(mais de 25 células inflamatórias) (GREGA et al., 2004; KWON et al., 2008).

Adicionalmente, o processo inflamatório foi classificado em agudo ou crônico com base na contagem e predomínio, respectivamente, de células inflamatórias polimorfonucleares e mononucleares. Os macrófagos foram analisados separadamente uma vez que possuem especial papel na remoção de restos celulares e de elementos extracelulares, como corpos estranhos.

Os vasos e fibroblastos das amostras centrais e de transição também foram contabilizados, objetivando avaliar a qualidade do processo de reparação tecidual considerando-se o aporte nutricional e a síntese de tecido colagenoso.

#### **4.9. Análise digital das imagens histopatológicas**

##### **4.9.1. Análise quantitativa das fibras colágenas e musculares**

Para a quantificação das fibras colágenas e musculares, as lâminas histológicas coradas pelo método de Tricrômico de Masson foram digitalizadas utilizando-se microscópio digital Nikon Coolscope II.

Em ambos os grupos foram realizadas fotomicrografias das áreas central e de transição entre os tecidos neoformado e da bexiga adjacente, com aumento de 5x e especial ênfase às regiões constituídas por fibras musculares, evitando-se incluir nas imagens o urotélio e demais campos contendo grandes vasos, resquícios da membrana e artefatos. Foram amostrados oito campos por lâmina. O número de campos foi estabelecido com base em um teste prévio, visando coeficiente de variação menor que 10%.

Cada imagem foi processada pelo “software” ImageJ<sup>34</sup> utilizando-se o plugin “K-means Clustering”. O número de “clusters” variou entre cinco a sete, de acordo com o contraste das fotomicrografias.

---

<sup>34</sup> ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA

Em seguida, cada um dos “clusters” de cor foi atribuído a um pico de “pixels” em um histograma em imagem de 8-bit. Os valores de cada pico foram então transferidos para o “software” Microsoft Office Excel 2007<sup>®35</sup>, por meio do qual foram realizados os cálculos das porcentagens médias de fibras musculares e de fibras colágenas, e da relação entre as fibras musculares e colágenas.

A validação da quantificação das fibras colágenas e musculares por análise digital das imagens foi realizada por três patologistas, individualmente, de acordo com o modelo baseado na gradação por cruzes (Anexo 1).

#### 4.9.2. Quantificação da espessura da túnica muscular

Para a análise da espessura da túnica muscular, as lâminas histológicas coradas pelo método de Tricrômico de Masson foram digitalizadas utilizando-se microscópio digital Nikon Coolscope II.

Foi realizada fotomicrografia com aumento de 2x, abrangendo-se todas as camadas da túnica muscular das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado.

Cada fotomicrografia foi processadas pelo software ImageJ, convertendo-se uma distância conhecida em pixels para micrômetros e tomando-se a média de cinco mensurações da túnica muscular.

#### 4.10. Análise dos urólitos

Os urólitos vesicais encontrados durante as biópsias cirúrgicas da bexiga foram coletados e encaminhados para o Minnesota Urolith Center da Universidade do Minnesota, Minnesota, EUA, previamente identificados e sob as condições legais e de envio

---

35 Microsoft Office, Microsoft Corporation

requeridas, respectivamente pelo serviço de Inspeção do Departamento de Agricultura dos EUA e pelo Instituto Universitário.

Os urólitos foram submetidos à análise de sua composição química por camadas desde o seu interior até a superfície de revestimento.

#### **4.11. Análise estatística**

As variáveis categóricas foram representadas pelas suas porcentagens e comparadas entre os grupos pelo teste exato de Fisher.

As variáveis contínuas foram representadas pelas médias ou medianas, de acordo com a normalidade evidenciada pelo teste de Shapiro-Wilk., sendo comparadas entre os grupos pelos testes t de Student, ou Mann-Whitney, quando indicado.

A evolução do peso corpóreo foi comparada entre os grupos por modelo linear generalizado misto.

Todos os testes foram realizados utilizando-se o software IBM SPSS 20<sup>36</sup>, considerando-se para os valores p com significância estatística aqueles menores ou iguais a 0,05.

---

<sup>36</sup> IBM SPSS Statistics 20, IBM Corporation

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Padronização do cultivo celular

#### 5.1.1. Isolamento e cultivo das células musculares lisas vesicais

A obtenção de células musculares lisas a partir de fragmentos da bexiga dos animais do GC, realizada durante a cistoplastia, não interferiu no resultado final do procedimento ou aumentou o tempo operatório. A coleta da bexiga dos animais que vieram à óbito, no entanto, proporcionou maior quantidade de células e consequentemente maior densidade celular.

A contagem inicial média das células musculares lisas provenientes de animais do GC foi correspondente a  $1,5 \times 10^5$  células/mL, enquanto que a dos doadores 1 e 2, respectivamente,  $4,5 \times 10^5$  e  $6 \times 10^5$  células/mL. Não foi verificada diferença quanto à viabilidade celular em ambas as situações, sendo de aproximadamente 95%.

Adicionalmente, não se constataram contaminação dos fragmentos e outras complicações durante a coleta, refrigeração ou transporte do material.

As células aderiram-se ao fundo dos frascos entre o 1º ao 5º dias de cultivo. Logo após sua adesão, as CMLV iniciaram o processo de divisão, assumindo morfologia poligonal achatada e alongada, com projeções celulares e estruturas intracitoplasmáticas pareadas que remetiam a miofilamentos contráteis (Figura 4). O número de células aumentou exponencialmente até se atingir confluência de aproximadamente 70% (Figura 5).

Foram realizadas em média três passagens antes que as células fossem finalmente semeadas sobre a SIS.

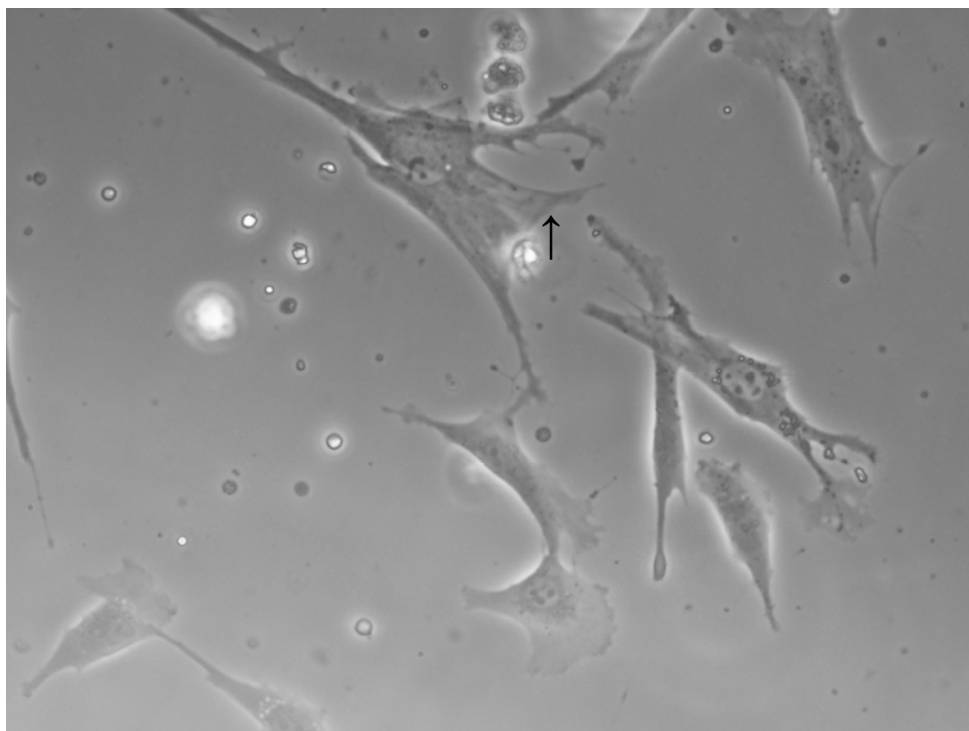


Figura 4: Morfologia das células musculares lisas vesicais à microscopia de fase em microscópio invertido. Note células poligonais achatadas e alongadas (seta), com projeções celulares irregulares (40x).

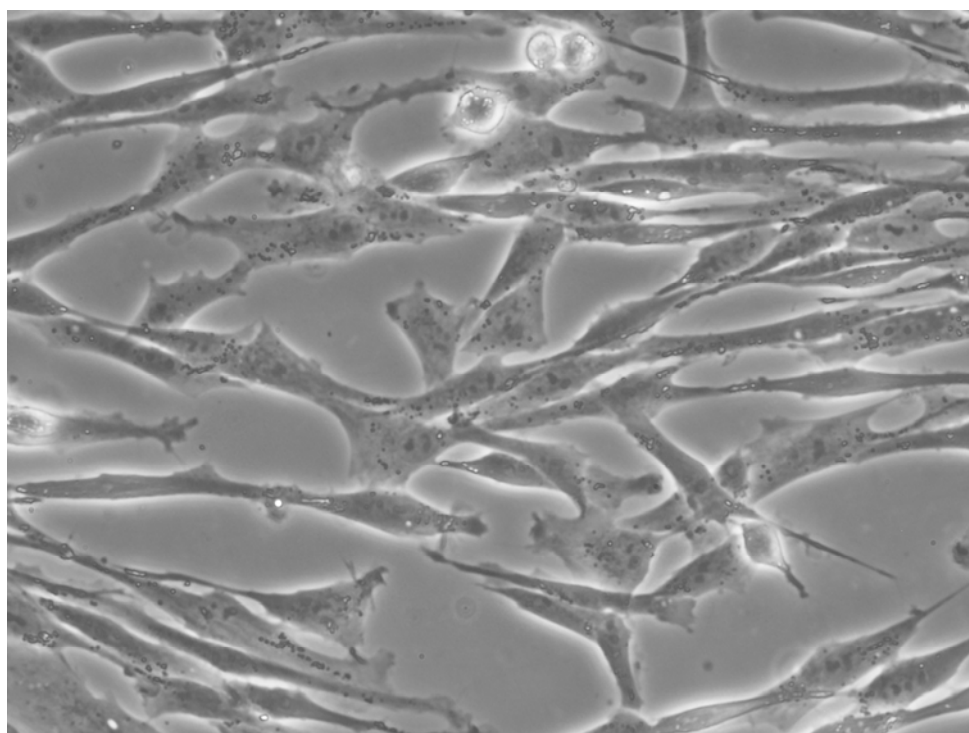


Figura 5: Células musculares lisas vesicais à microscopia de fase em microscópio invertido após 10 dias do cultivo inicial. Note a confluência de aproximadamente 70% (40x).

A quantidade de células semeadas sobre a membrana foi de  $7 \times 10^5$  a  $7,5 \times 10^5$  células/mL. O comportamento e morfologia das células permaneceram inalterados durante as passagens.

A técnica de imunocitoquímica pelo método LSAB resultou na marcação positiva acastanhada para o antígeno alfa-actina de músculo liso, e consequentemente na confirmação do tipo celular e validação do cultivo (Figura 6).

#### 5.1.2. Semeadura das células musculares lisas vesicais sobre a SIS

A presença de células nas adjacências da membrana foi inicialmente observada após 24 horas da semeadura. Essas, assim que se aderiam ao fundo, assumiram características semelhantes às descritas anteriormente e iniciaram a divisão a partir do 2º dia de cultivo.

Na região central da membrana, devido a sua opacidade, a avaliação das células foi feita por análise histopatológica pela coloração de H/E; nesta observou-se uma rede de fibras colágenas coradas em vermelho, de aspecto fibrilar e organizadas em múltiplas camadas. No interior dessas fibras, notaram-se inúmeros núcleos fusiformes marcadamente basofílicos, distribuídos aleatoriamente (Figura 7). Em algumas regiões notou-se a presença de estruturas semelhantes a vasos, compostas exclusivamente pela túnica muscular e delimitando espaços luminais de variados tamanhos.

Adicionalmente, foi realizada coloração de Tricrômico de Masson, a qual revelou a presença de fibras colágenas com ausência de padrão fibrilar, substituídas por material amorfo fortemente corado em vermelho. Em determinadas áreas, contudo, as fibras apresentavam-se coradas em azul, espessadas focalmente e compostas por denso acúmulo de núcleos sem organização bem definida (Figura 8).



Figura 6: Fotomicrografia de células musculares lisas vesicais com citoplasma imunomarcado com anti  $\alpha$ -actina de músculo liso. (Imunocitoquímica pelo método LSAB; 20x).

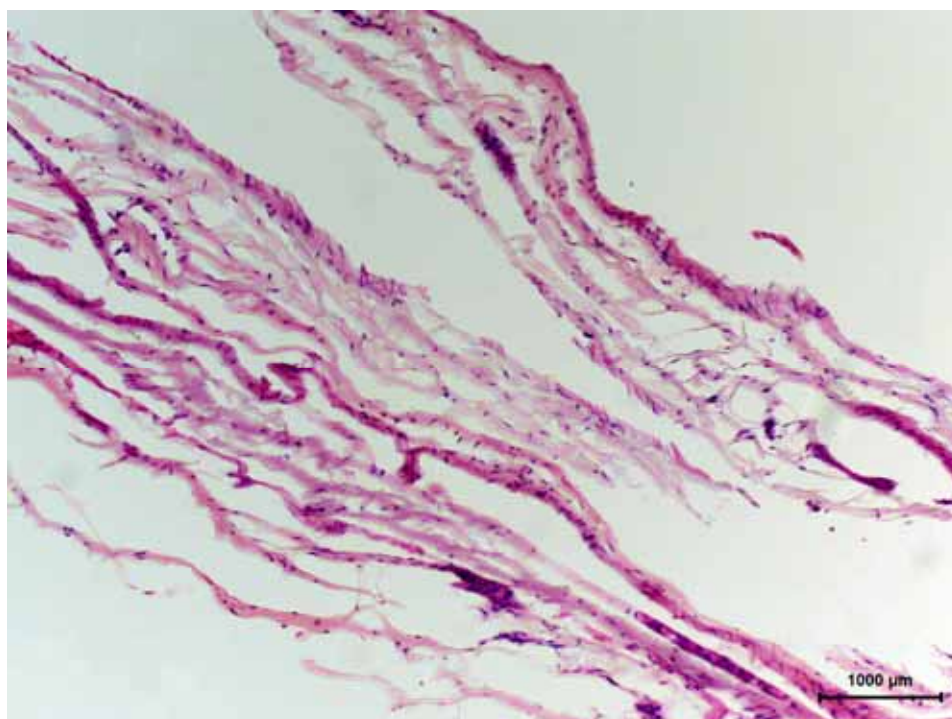


Figura 7: Fotomicrografia de fibras colágenas coradas em vermelho, organizadas em múltiplas camadas. Note os inúmeros núcleos fusiformes marcadamente basofílicos no interior dessas fibras (H/E, 10x).

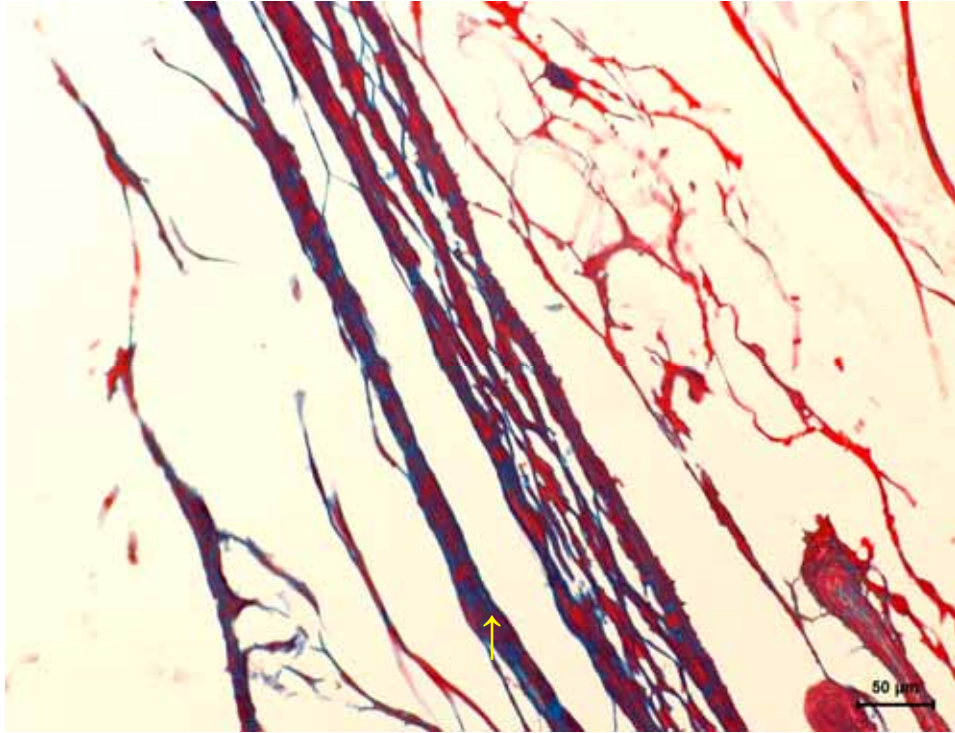


Figura 8: Fotomicrografia de membrana SIS semeada com células musculares lisas vesicais. Note fibras colágenas coradas em azul (seta), entremeadas a fibras colágenas coradas em vermelho (Masson, 20x).

As membranas semeadas foram destinadas à implantação nos animais do GT entre quatro a seis dias.

## **5.2. Avaliação clínica e laboratorial**

### **5.2.1. Avaliação clínica**

As avaliações clínicas procederam sem intercorrências, não sendo necessárias sedação ou anestesia dos animais.

Em ambos os grupos, as frequências cardíaca e respiratória apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade, bem como a coloração das mucosas e a temperatura corpórea. Os linfonodos inguinais estavam discretamente aumentados de tamanho em quatro animais (80%) do GC ( $p=0,52$ ). Entre os animais do GT, os linfonodos inguinais estavam aumentados em um animal, enquanto o poplíteo esquerdo em outro. A linfadenomegalia foi observada entre o M3 e o M7 com resolução completa entre o M7 e o M30.

Quanto à presença de alterações comportamentais, quatro animais (80%) do GC e um do GT ( $p=0,20$ ) apresentaram apatia discreta no M1, sendo esta a única alteração comportamental verificada.

Todos os animais dos GT e GC apresentaram emagrecimento ao longo do primeiro mês de observação (Figura 9). No GC a perda total média de peso foi de 580g (variabilidade entre 100g a 1 kg) e no GT de 860g (100g a 2,3kg). Não foi verificada, entretanto, diferença significativa entre o GC e GT quanto ao peso corpóreo nos diferentes momentos de avaliação, o que demonstra que os tratamentos não influenciaram nos resultados obtidos. Todos os animais recuperaram o peso corpóreo inicial ao final das avaliações.

Quatro cães do GC manifestaram sensibilidade dolorosa à palpação abdominal no M1. Desses apenas um apresentou sensibilidade moderada, enquanto que os outros três manifestaram discreto desconforto. Entre os animais do GT, apenas um apresentou discreto desconforto abdominal no M1 ( $p=0,20$ ). Todos os animais foram adequadamente medicados e deixaram de apresentar sensibilidade à palpação abdominal em menos de 72 horas de pós-operatório.

Quatro animais do GC apresentaram polaciúria, sendo que um apresentou a alteração em dois episódios distintos. Tal disfunção foi manifestada no M1 ( $n=3/5$ ) e M7 ( $n=2/5$ ). A remissão deste sinal foi verificada entre o M3 e M30. Entre os animais do GT, três apresentaram polaciúria no M1, com retorno da frequência de micção normal no M3 ( $p=1,00$ ).

A distribuição dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto a presença de polaciúria durante o período de avaliação está demonstrada nas Tabelas 1 e 2.

Adicionalmente, quatro animais do GC e cinco do GT apresentaram hematúria macroscópica no M1 (Tabelas 3 e 4) com remissão do sinal clínico até o M7 ( $p=1,00$ ). Apenas um animal do GC apresentou recidiva do sinal no M30 com resolução do mesmo até o M60.

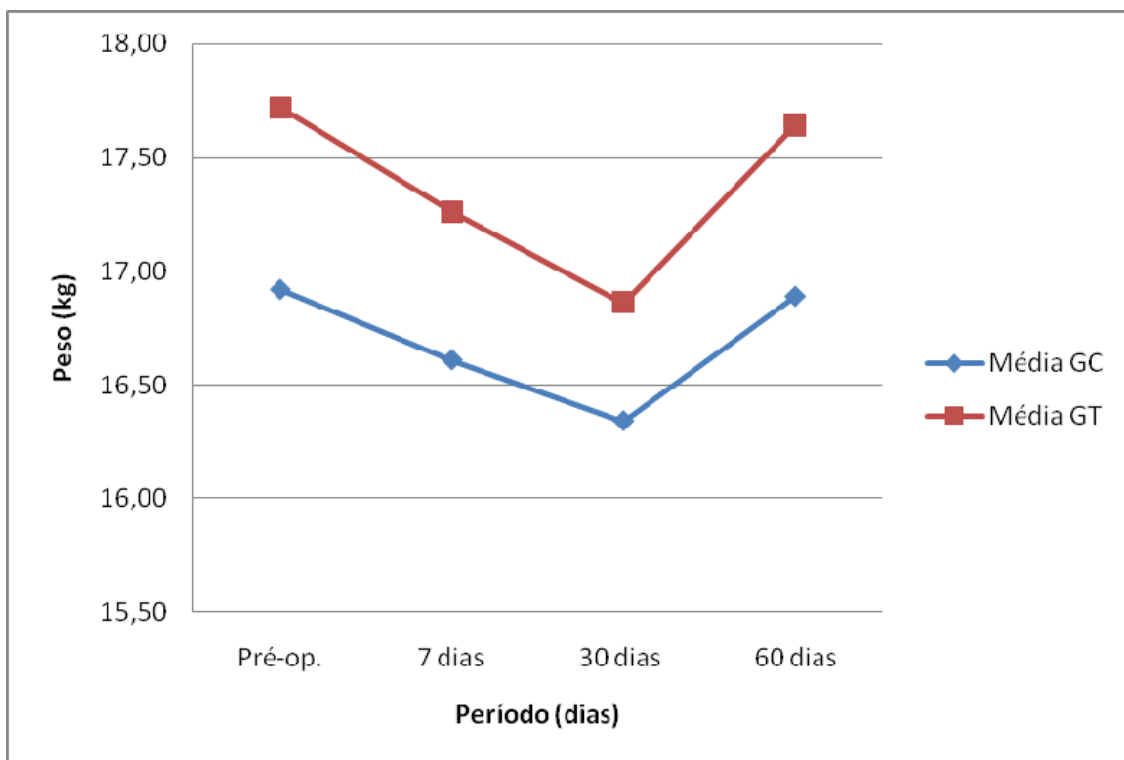


Figura 9. Distribuição dos pesos corpóreos médios dos animais dos grupos Controle e Tratado durante o período total de avaliação.  $p(\text{grupo})=0,65$ ;  $p(\text{tempo})=0,98$ ;  $p(\text{grupo} \times \text{tempo})=1,00$ ; GC: Grupo Controle; GT: Grupo Tratado.

**Tabela 1.** Avaliação clínica dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de polaciúria no período pós-operatório

|          | M1  | M3 | M7 | M30 | M60 |
|----------|-----|----|----|-----|-----|
| Animal 1 | +++ | ++ | ++ | -   | -   |
| Animal 2 | +   | +  | +  | -   | -   |
| Animal 3 | +   | -  | +  | -   | -   |
| Animal 4 | -   | -  | -  | -   | -   |
| Animal 5 | -   | -  | +  | -   | -   |

Legenda: (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada; (+++) intenso

**Tabela 2.** Avaliação clínica dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de polaciúria no período pós-operatório

|          | M1 | M3 | M7 | M30 | M60 |
|----------|----|----|----|-----|-----|
| Animal 1 | -  | -  | -  | -   | -   |
| Animal 2 | +  | -  | -  | -   | -   |
| Animal 3 | +  | -  | -  | -   | -   |
| Animal 4 | +  | -  | -  | -   | -   |
| Animal 5 | -  | -  | -  | -   | -   |

Legenda: (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada; (+++) intenso

**Tabela 3.** Avaliação clínica dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de hematúria macroscópica no período pós-operatório

|          | <b>M1</b> | <b>M3</b> | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | -         | -         | -         | -          | -          |
| Animal 2 | +         | +         | -         | -          | -          |
| Animal 3 | +         | +         | -         | +          | -          |
| Animal 4 | +         | +         | -         | -          | -          |
| Animal 5 | ++        | +         | -         | -          | -          |

Legenda: (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada; (+++) intenso

**Tabela 4.** Avaliação clínica dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de hematúria macroscópica no período pós-operatório

|          | <b>M1</b> | <b>M3</b> | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | +         | +         | -         | -          | -          |
| Animal 2 | ++        | +         | -         | -          | -          |
| Animal 3 | +         | +         | -         | -          | -          |
| Animal 4 | +         | +         | -         | -          | -          |
| Animal 5 | +         | +         | -         | -          | -          |

Legenda: (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada; (+++) intenso

### 5.2.2. Avaliação laboratorial

No hemograma completo dos animais do GC e GT não foram constatadas variações quantitativas e morfológicas das séries eritrocitária e plaquetária nos momentos pós-operatórios avaliados.

Quanto à série leucocitária foi verificada intensa eosinofilia no M60 em três animais do GC (média de  $2,00 \times 10^3$  eosinófilos/uL e variação de  $1,24 \times 10^3$  a  $3 \times 10^3$  eosinófilos/uL) e um animal do GT ( $2,324 \times 10^3$  eosinófilos/uL) ( $p=0,52$ ). Destaca-se que nos animais de ambos os grupos não foram observados ao exame coproparasitológico ovos e/ou larvas de parasitas.

Aos exames bioquímicos não foram observadas alterações durante o período de avaliação, com exceção do aumento sérico da uréia em um animal do GC (67mg/dL) no M60. Em ambos os grupos, no entanto, não foi verificado aumento concomitante do nível sérico de creatinina.

A relação albumina/globulina e o nível sérico de cálcio foram mantidos dentro dos padrões de normalidade em ambos os grupos durante o período de avaliação.

Quanto à urina tipo I, todos os animais do GC e GT apresentaram urina de coloração amarelo escuro no M1, com resolução da alteração até o M7. Um animal do GC tornou a apresentar urina de coloração escura no M30, não observada novamente no M60.

Da mesma forma, todos os animais do GC e GT apresentaram urina de aspecto discretamente turvo a turvo no M1, com resolução da alteração até o M7. Dois animais do GC tornaram a apresentar urina de aspecto turvo no M30, não observada novamente no M60.

A densidade urinária média dos animais do GC foi 1.041, 1.027 e 1.024, respectivamente no M7, M30 e M60, com média  $1.030 \pm 20,1$  durante todo o período de

avaliação (variação de 1.010 a 1.092). Já no GT, a densidade urinária média foi 1.031, 1.015 e 1.046, respectivamente no M7, M30 e M60, com média  $1.031 \pm 21,5$  (variação de 1.002 a 1.066).

O pH urinário médio dos animais do GC foi 6,7, 8,1 e 7,1, respectivamente no M7, M30 e M60, com média  $8,0 \pm 1,15$  durante todo o período de avaliação (variação de 5,5 a 9,0). Já no GT, o pH urinário médio foi 7,0 em todos os momentos avaliados, com média  $7,0 \pm 1,2$  (variação de 5,0 a 8,5).

A ocorrência de proteinúria foi constatada em todos os animais do GC e em três do GT durante o período de avaliação, sendo que um animal de cada grupo apresentou a alteração em mais de um momento ( $p=0,44$ ). A quantidade de proteína presente na urina dos animais do GC e GT está representada, respectivamente, nas Tabelas 5 e 6.

A presença de cristais de fosfato de amônio magnésiano no sedimento urinário foi verificada em três animais do GC e em três do GT, sendo que um animal de cada grupo apresentou a alteração em mais de um momento. A quantidade de cristais presente na urina dos animais do GC e GT está representada, respectivamente, nas Tabelas 7 e 8.

Quanto à mensuração de hemácias nos períodos estipulados, todos os animais do GC apresentaram quantidade igual ou inferior a 5 hemácias/uL, excetuando-se um animal (nº 3) com 45-50 hemácias/uL no M30. Entre os animais do GT foi verificada hematúria microscópica no M7 em três cães ( $p=0,52$ ), sendo de 10-15 hemácias/uL no primeiro, 20-15 hemácias/uL no segundo e 75-100 hemácias/uL no terceiro. Ao contrário do observado com o animal nº 3 do GC, em todos os cães do GT a grande quantidade de hemácias na urina não foi acompanhada de leucocitúria e/ou bacteriúria.

**Tabela 5.** Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de proteinúria no período pós-operatório

|          | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | -         | + / +++    | -          |
| Animal 2 | + / +++   | -          | -          |
| Animal 3 | + / +++   | ++ / +++   | -          |
| Animal 4 | -         | + / +++    | -          |
| Animal 5 | + / +++   | -          | -          |

Legenda: (-) ausente; (+) 30 mg/dL; (++) 100 mg/dL; (+++) 500 mg/dL

**Tabela 6.** Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de proteinúria no período pós-operatório

|          | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | -         | -          | -          |
| Animal 2 | + / +++   | + / +++    | -          |
| Animal 3 | -         | -          | -          |
| Animal 4 | + / +++   | -          | -          |
| Animal 5 | -         | -          | -          |

**Tabela 7.** Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Controle (GC) quanto à presença de cristalúria no período pós-operatório

|          | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | -         | -          | -          |
| Animal 2 | -         | + / +++    | -          |
| Animal 3 | -         | +++ / +++  | + / +++    |
| Animal 4 | -         | -          | -          |
| Animal 5 | -         | -          | +++ / +++  |

Legenda: (-) ausente; (+) discreta; (++) moderada; (+++) intenso

**Tabela 8.** Avaliação laboratorial dos animais do Grupo Tratado (GT) quanto à presença de cristalúria no período pós-operatório

|          | <b>M7</b> | <b>M30</b> | <b>M60</b> |
|----------|-----------|------------|------------|
| Animal 1 | -         | -          | -          |
| Animal 2 | -         | -          | + / +++    |
| Animal 3 | -         | -          | -          |
| Animal 4 | + / +++   | -          | + / +++    |
| Animal 5 | + / +++   | -          | -          |

A quantidade de leucócitos foi igual ou inferior a 5 leucócitos/uL em todos os animais do GC nos períodos avaliados, excetuando-se os animais nº 5 e nº 3, com respectivamente 15-20 leucócitos/uL no M7 e 50-75 leucócitos/uL no M30. Do mesmo modo, a quantidade de leucócitos foi igual ou inferior a 5 leucócitos/uL em todos os animais do GT.

A quantidade de bactérias foi mensurável nos animais 3 e 5 do GC, com ++/++++ e +++/++++, respectivamente no M7 e M30. Nos animais do GT foram visualizadas apenas raras bactérias em algumas ocasiões, sugestivas de contaminação durante o momento da coleta e, portanto, não passíveis de mensuração. Apesar disso, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,44$ ).

Os exames de urina tipo I, associados às alterações clínicas e ultrassonográficas, foram condizentes com cistite nos animais 3 e 5 do GC. Em ambos os casos e também na urina dos animais 1 e 2 do GC foram isolados o agente microbiano *Staphylococcus  $\beta$  hemolítico*. Não foi isolado nenhum agente na urina dos animais do GT ao longo do período de avaliação.

### **5.3. Avaliação ultrassonográfica abdominal**

Em todos os animais, no pré-operatório, a bexiga foi caracterizada por arquitetura e localização anatômica preservadas, conteúdo anecóico homogêneo e presença de paredes finas e regulares.

No M30 foi visualizado espessamento da parede vesical em três animais do GC (n<sup>os</sup> 1, 2 e 5) e em quatro do GT (n<sup>os</sup> 1, 2, 3 e 5), mais acentuado na face ventral da bexiga, ao redor da membrana implantada. Ainda no mesmo período, outros dois animais do GC apresentaram espessamento da parede apenas nessa região. A espessura

média da parede da bexiga na região próxima a membrana foi de 1 e 0,95 cm, respectivamente, no GC e GT.

Em quatro animais do GC (n<sup>os</sup> 1, 2, 3 e 5) foi visibilizado sedimento urinário, caracterizado por pontos ecogênicos flutuantes no interior da bexiga (Figura 10). O mesmo, contudo, não foi observado em nenhum dos animais do GT (p=0,05).

Adicionalmente, foram visualizadas irregularidades na região da membrana implantada em todos os animais do GC e GT. Um animal do GC (n<sup>o</sup> 3) apresentou ainda estrutura hipoecogênica e cística, compatível com pseudomassa, aderida à membrana (Figura 11). Não foram verificadas estruturas hiperecogênicas e formadoras de sombra acústica, sugestivas de urólitos, aderidas à membrana em ambos os grupos; bem como alterações no formato da bexiga, e em linfonodos e demais órgãos abdominais.

No M60 foi visibilizado espessamento da parede vesical, embora de menor valor quando comparado ao M30, em três animais do GC (n<sup>os</sup> 1, 2 e 5), principalmente ao redor da membrana implantada (Figura 12). Já no GT, um cão (n<sup>o</sup> 2) apresentou espessamento da parede vesical, maior ao redor da membrana implantada, enquanto que os outros quatro apresentaram espessamento exclusivamente na região da membrana. A espessura média na região próxima à membrana foi de 0,52 e 0,57 cm, respectivamente nos animais do GC e GT.

Adicionalmente, foram visibilizadas irregularidades na região da membrana implantada em quatro animais do GC (n<sup>os</sup> 1, 2, 3 e 4) e em dois animais do GT (n<sup>os</sup> 2 e 3). Associadas a essas áreas irregulares foram visualizadas, em três animais do GC (n<sup>os</sup> 1, 4 e 5), estruturas hiperecogênicas de tamanhos variáveis e formadoras de sombra acústica, sugerindo-se a presença de urólitos aderidos à membrana (Figura 13). Não foram verificadas tais estruturas nos animais do GT (p=0,17).

Em dois animais do GC foram visibilizados a presença de sedimentos urinários

discreto (n° 1) e acentuado (n° 3), representado por pontos ecogênicos flutuantes no interior da bexiga.

Adicionalmente, um cão do GC (n° 2) apresentou compartimentalização da bexiga devido a achatamento dorso-ventral do seu terço médio (Figura 14). Não foram visibilizados sedimento urinário ou compartimentalização nos animais do GT, bem como alterações nos linfonodos e demais órgãos abdominais em ambos os grupos avaliados.

As principais alterações ultrassonográficas observadas nos grupos Controle e Tratado nos M30 e M60, bem como os valores “p” estão elencados na Tabela 9.



Figura 10: Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 30 dias de pós-operatório em animal do GC. Note os pontos ecogênicos flutuantes no interior da bexiga (microcálculos) e a parede com infiltrado inflamatório na camada muscular (aspecto anecogenico mais evidente na parede) (seta).

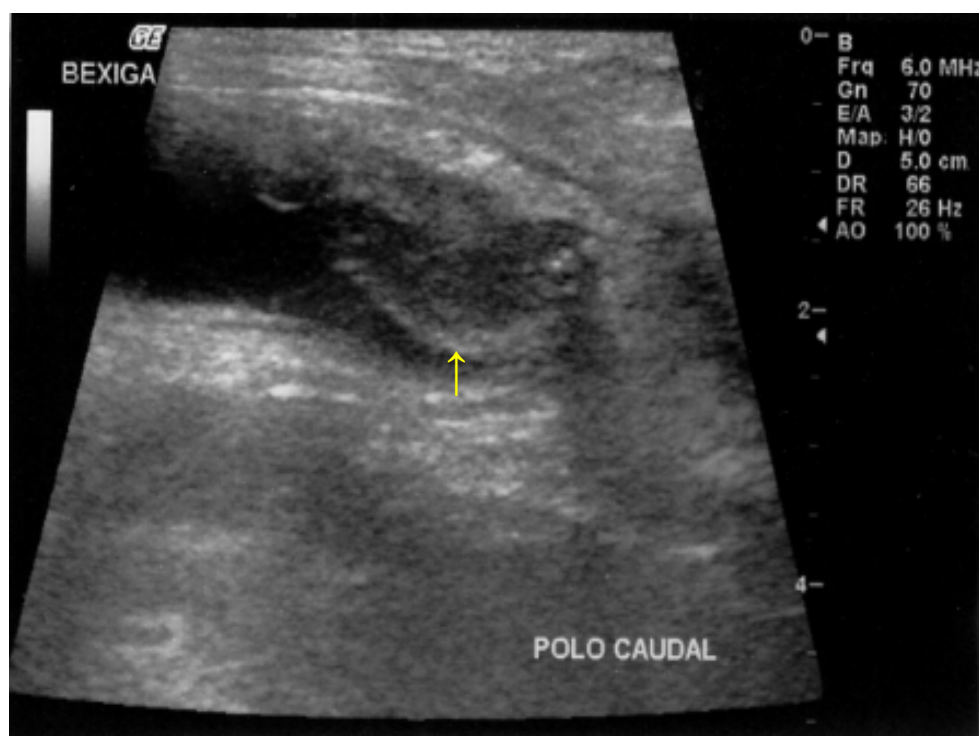


Figura 11: Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 30 dias de pós-operatório em animal do GC. Notar a estrutura hipoeecogênica e cística, aderida à membrana, sugestiva de pseudomassa (seta).



Figura 12: Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note entre os cursores a parede espessada no local de implantação da membrana.

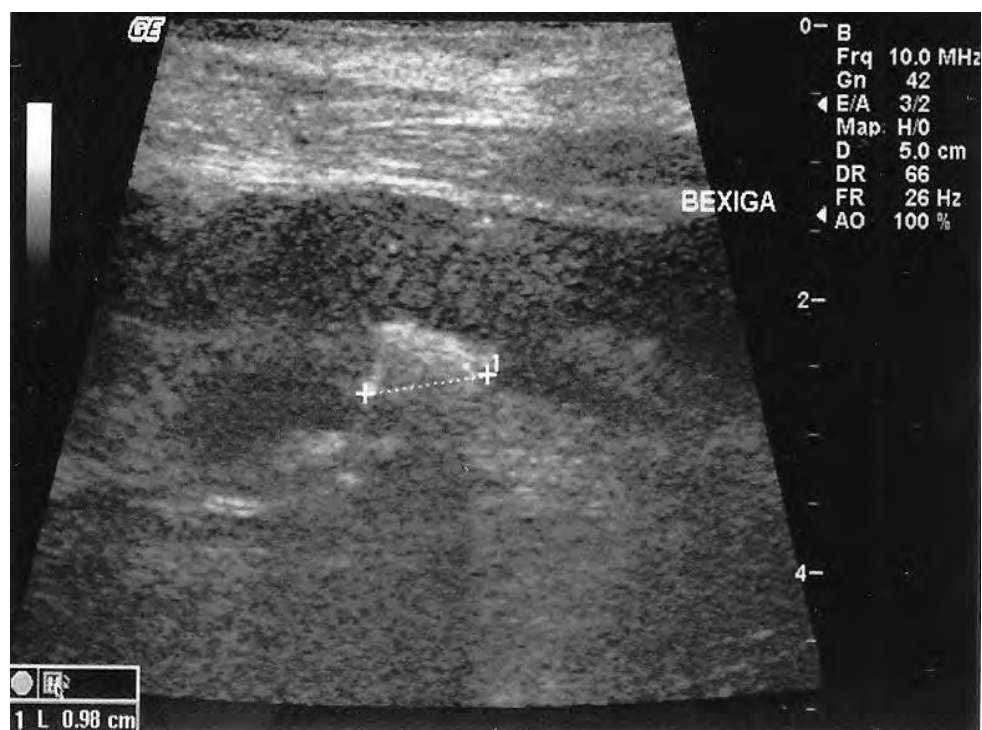


Figura 13: Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note entre os cursores a estrutura hiperecogênica formadora de sombra acústica, compatível com urólito.

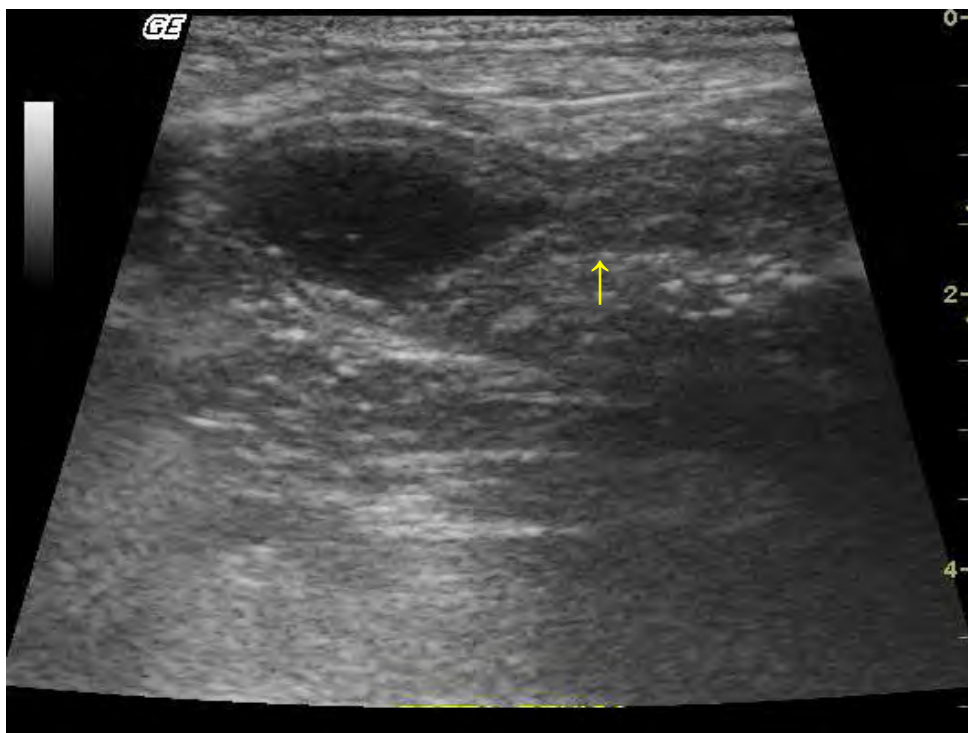


Figura 14: Imagem ultrassonográfica sagital de bexiga com 60 dias de pós-operatório em animal do GC. Note o achatamento dorso ventral e compartimentalização em terço médio da bexiga (seta).

**Tabela 9.** Distribuição das principais alterações ultrassonográficas visibilizadas aos 30 (M30) e 60 (M60) dias de pós-operatório nos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT)

| Alterações                         | M30 |      |     |     |      |             | M60 |     |     |     |     |      |
|------------------------------------|-----|------|-----|-----|------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|                                    | GC  |      |     | GT  |      |             | GC  |     |     | GT  |     |      |
|                                    | N   | %    | N   | N   | %    | p*          | N   | %   | N   | N   | %   | p*   |
| Pseudomassas                       | 1/5 | 20%  | 0/5 | 0/5 | 20%  | 1,00        | 0/5 | 0%  | 0/5 | 0/5 | 0%  | 1,00 |
| Sedimento urinário                 | 4/5 | 80%  | 0/5 | 0/5 | 0%   | <b>0,05</b> | 2/5 | 40% | 0/5 | 0/5 | 0%  | 0,44 |
| Urólitos                           | 0/5 | 0%   | 0/5 | 0/5 | 0%   | 1,00        | 3/5 | 60% | 0/5 | 0/5 | 0%  | 0,17 |
| Áreas de irregularidades da parede | 5/5 | 100% | 5/5 | 5/5 | 100% | 1,00        | 4/5 | 80% | 2/5 | 40% | 40% | 0,52 |
| Espessamento da região da membrana | 5/5 | 100% | 4/5 | 4/5 | 80%  | 1,00        | 4/5 | 80% | 4/5 | 80% | 80% | 1,00 |
| Espessamento da parede vesical     | 3/5 | 60%  | 4/5 | 4/5 | 80%  | 1,00        | 3/5 | 60% | 1/5 | 20% | 20% | 0,52 |
| Compartimentalização               | 0/5 | 0%   | 0/5 | 0/5 | 0%   | 1,00        | 1/5 | 20% | 0/5 | 0/5 | 0%  | 1,00 |
| Alterações em linfonodos           | 0/5 | 0%   | 0/5 | 0/5 | 0%   | 1,00        | 0/5 | 0%  | 0/5 | 0/5 | 0%  | 1,00 |
| Alterações em órgãos               | 0/5 | 0%   | 0/5 | 0/5 | 0%   | 1,00        | 0/5 | 0%  | 0/5 | 0/5 | 0%  | 1,00 |

\*Teste Exato de Fisher

#### 5.4. Avaliação macroscópia da bexiga após implantação da SIS

O tecido de reparação presente na face externa de todos os animais do GC e GT, no M60, apresentou superfície brilhante, plana e lisa, contínua ao tecido vesical original (Figura 15). Assim, a distinção exata da região de cistoplastia só foi possível devido à presença dos pontos simples interrompidos com fio de náilon, aplicados no ato operatório. Foi verificada ainda a adesão espontânea do epíplon e/ou gordura periuretral à superfície externa da bexiga em quatro animais do GC e três animais do GT. A SIS implantada não foi visibilizada nos animais de ambos os grupos.

Na face interna da bexiga, notou-se tecido de reparação com superfície brilhante em todos os cães do GT e em dois animais do GC ( $p=0,17$ ); nos outros três animais do GC, a mesma estava opaca.

Adicionalmente, verificaram-se superfícies internas planas, na região da cistoplastia, em três animais do GC e em todos do GT; de aspecto liso em dois animais do GC e em três do GT; irregular em três cães do GC (dois com áreas de depressão associada) e em dois do GT (Figura 16). A continuidade do tecido de reparação na superfície intraluminal com o tecido original da bexiga foi considerada adequada em dois animais do GC e em todos os do GT, e inadequada em três animais do GC ( $p=0,17$ ).

Em três animais do GC foram observados urólitos de tamanhos e formatos variáveis, aderidos à superfície interna da membrana. Tais achados não foram observados nos animais do GT. Na comparação entre grupos, houve maior formação de urólitos no GC ( $p<0,01$ ).

Em um animal do GC foi verificada ainda a presença de estrutura semelhante a uma camada da membrana, incrustada com pequenos urólitos e frouxamente aderida à

face intraluminal da bexiga (Figura 17).

Na Tabela 10 estão apresentadas as principais características do tecido de reparação, nas superfícies vesicais, do GC e GT.



Figura 15: Aspecto macroscópico do tecido de reparação na face externa da vesícula urinária de cão. Notar os pontos simples interrompidos utilizando fio de náilon para demarcação dos limites da membrana (seta).

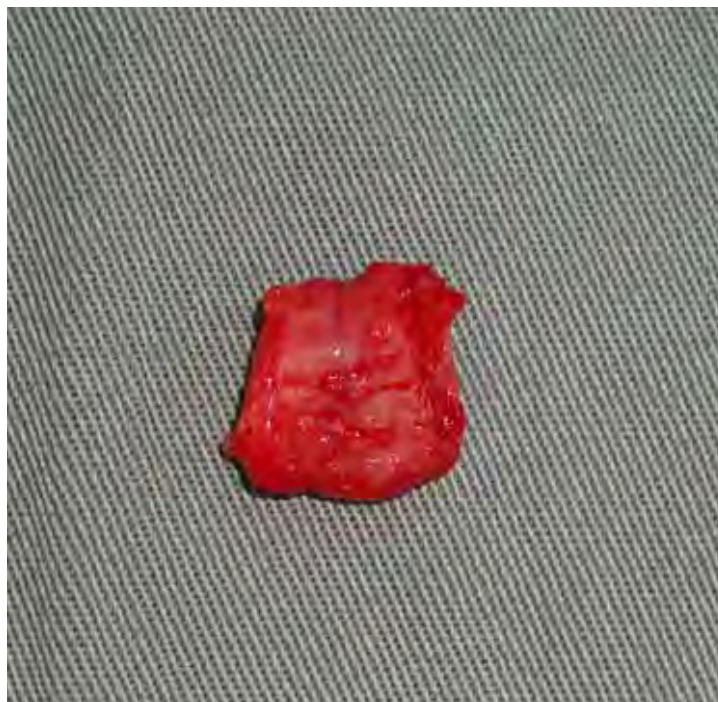


Figura 16: Fragmento obtido de biópsia de bexiga de cão reparada com SIS semeada com CMLH no M60. Note a superfície brilhante e com boa continuidade com o tecido vesical original.

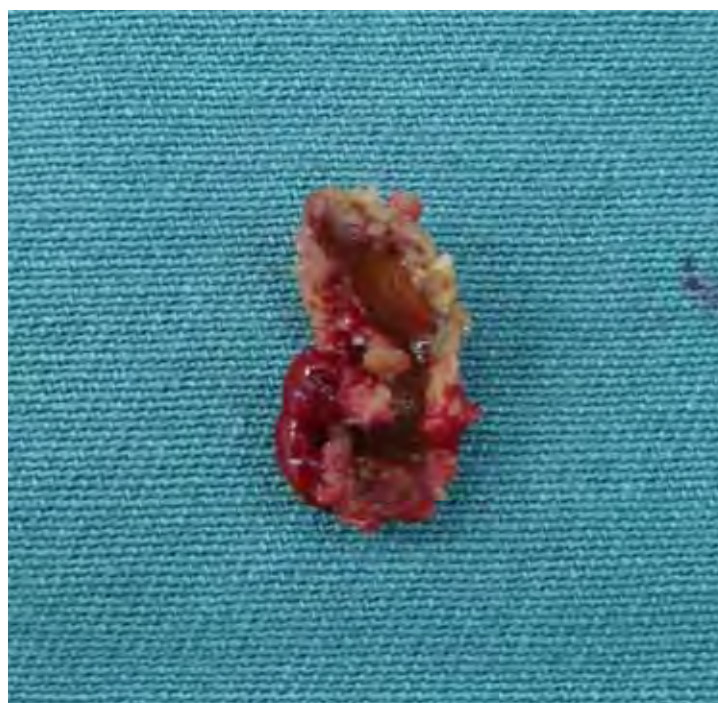


Figura 17: Estrutura semelhante à camada da membrana, frouxamente aderida à face intraluminal da bexiga de cão reparada com SIS acelular. Note os pequenos urólitos incrustados em sua superfície e bordas.

**Tabela 10.** Principais características do tecido de reparação das superfícies externa e interna da bexiga dos animais dos grupos Controle e Tratado aos 60 dias de pós-operatório

|                                        | Face externa |      |     |      | Face interna |      |     |      |
|----------------------------------------|--------------|------|-----|------|--------------|------|-----|------|
|                                        | GC           |      | GT  |      | GC           |      | GT  |      |
| Características                        | N            | %    | N   | %    | N            | %    | N   | %    |
| Reparação da lesão                     | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% |
| Brilho normal                          | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 2/5          | 40%  | 5/5 | 100% |
| Superfície plana                       | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 3/5          | 60%  | 5/5 | 100% |
| Superfície lisa                        | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 2/5          | 40%  | 3/5 | 60%  |
| Boa continuidade com o tecido original | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 2/5          | 40%  | 5/5 | 100% |
| Urólitos aderidos à superfície         | -            | -    | -   | -    | 5/5          | 100% | 0/5 | 0%   |

\*Teste exato de Fisher

## 5.5. Análise da composição dos urólitos

Os urólitos vesicais foram obtidos durante a biópsia de três animais do GC.

À análise da composição química por camadas, desde o seu interior até a superfície de revestimento, revelou:

Animal 1: urólito constituído por 100% de oxalato de cálcio;

Animal 2: urólito constituído por 5% de oxalato de cálcio e 95% de materiais diversos, principalmente componentes celulares e proteináceo;

Animal 4: Centro do urólito constituído por 50% de fosfato de amônio magnesiano (estruvita) e 50% de materiais diversos, sendo principalmente material fibroso não identificado. Região periférica constituída por 100% de fosfato de amônio magnesiano (estruvita).

Ressalta-se, conforme descrito anteriormente, que os níveis séricos de cálcio prévios e no M60 estavam de acordo com os parâmetros de referência para a espécie.

## 5.6. Análise histopatológica descritiva

### 5.6.1. Análise histopatológica das amostras centrais

No GC, na túnica mucosa foram observadas áreas de revestimento urotelial heterogêneas, apresentando uma a duas camadas de células ou até a ausência completa de urotélio no cão 5 (Figura 18). Adicionalmente, em três cães foram verificadas áreas de hiperplasia urotelial difusa (animais 1, 2 e 4) e subjacente à essas, na túnica submucosa, raros ninhos de Brunn (animais 1 e 4), apresentando por vezes espaços centrais semelhantes a ácinos e túbulos.

Na túnica submucosa foram observadas áreas compostas por feixes de fibras

colágenas, desorganizados e associados a raros fibroblastos, e outras com predomínio de fibroblastos e tecido conjuntivo colagenoso de aspecto denso. A natureza colagenosa de tais fibras foi confirmada pelo método de Tricrômico de Masson (Figura 19). Verificaram-se também múltiplos focos de hemorragia aguda entremeados a vasos sanguíneos congestos de pequeno calibre. Estes, por sua vez, estavam circundados por células inflamatórias com predomínio de polimorfonucleares (cães 1 e 2) ou mononucleares (cães 3, 4 e 5).

Foram observados fragmentos residuais da membrana (animais 3 e 4), circundados por inúmeros macrófagos epitelióides com atividade fagocitária (Figura 20) e raras células gigantes tipo corpo estranho; Os fragmentos da membrana, cuja natureza colagenosa foi confirmada pelo Tricrômio de Masson, apresentaram basofilia variável e aspecto fibrilar a hialinizado (Figura 21). Tais fragmentos também foram observados no tecido intersticial entre as camadas musculares (circular e longitudinais) da túnica muscular (animais 4 e 5).

Na túnica muscular, observada apenas nas biopsias dos animais 4 e 5, foi verificada disposição das fibras musculares em feixes de diferentes calibres, no entanto, sem apresentarem arquitetura típica (Figura 22). Notou-se, portanto, ausência da túnica muscular em três cães (1, 2 e 3).

Na túnica serosa foi observada arquitetura típica, porém com ausência de revestimento mesotelial.

As amostras referentes aos animais 1 e 3 apresentaram estruturas bacterianas aderidas ao urotélio de morfologia cocóide e coloração Gram positiva.

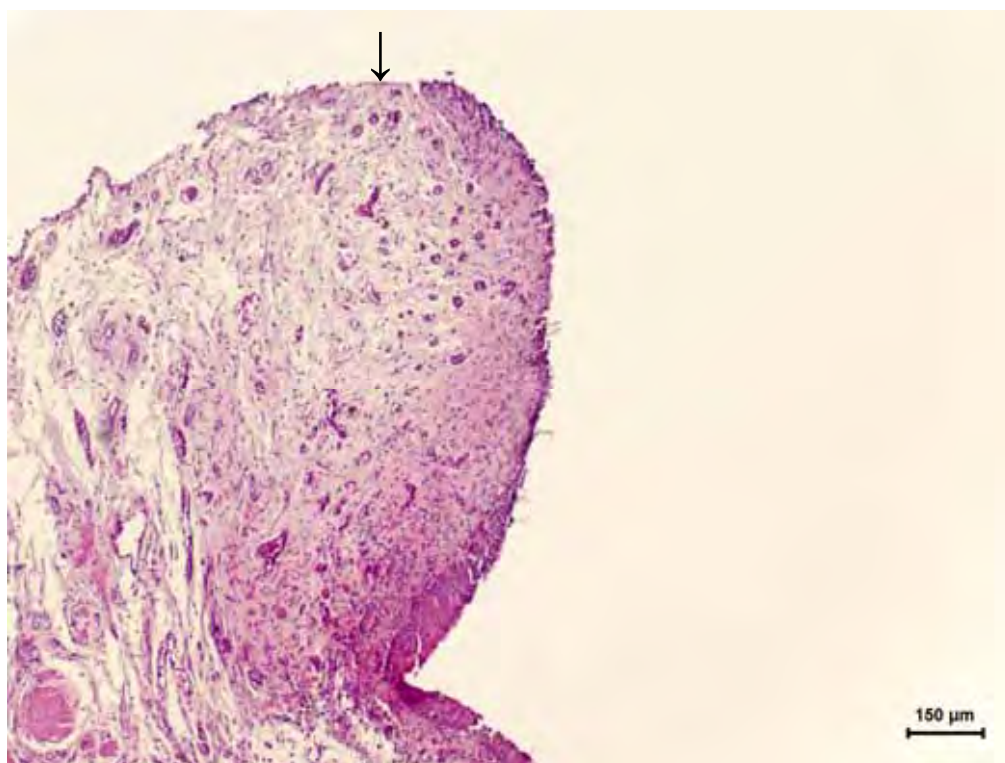


Figura 18: Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a variação de espessura do urotélio com área de falha completa do revestimento (seta) (HE; 6,25x).

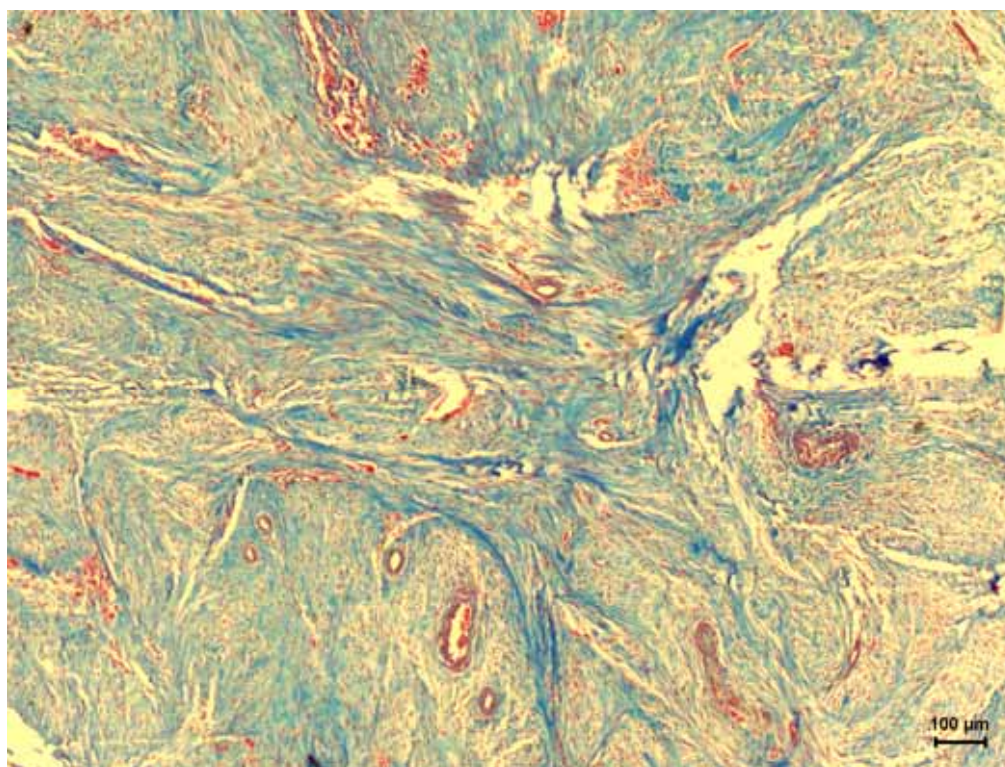


Figura 19: Fotomicrografia de região central de cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a presença de fibras colágenas multidirecionais coradas em azul (Masson; 6,25x).

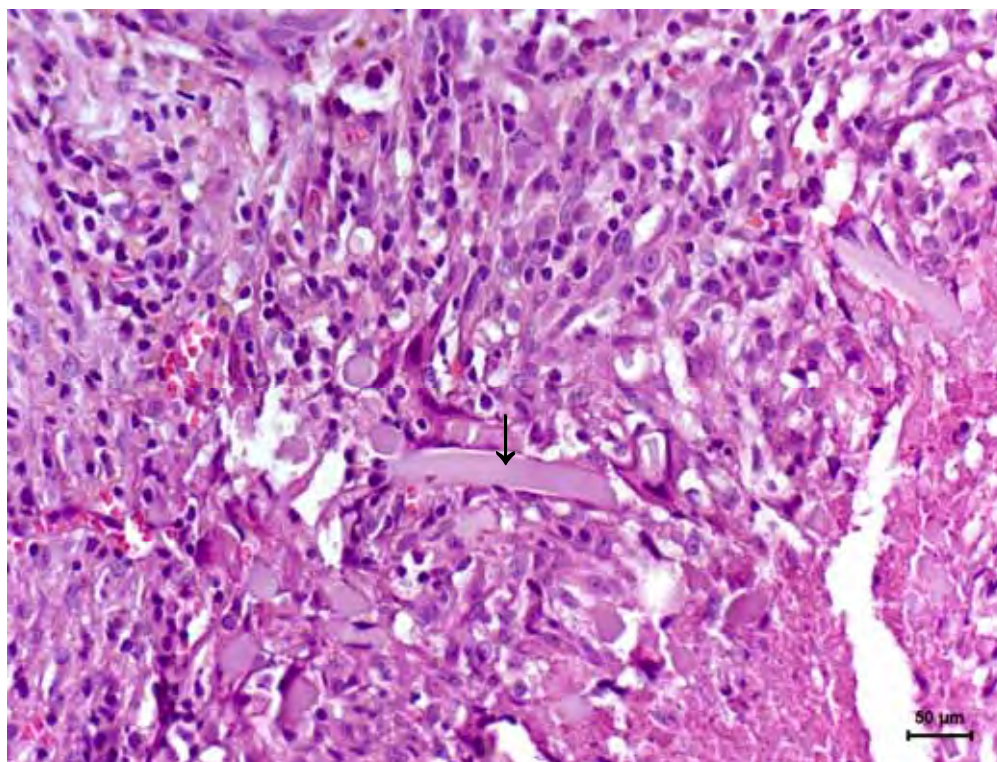


Figura 20: Fotomicrografia de região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar a presença de fragmentos de membrana sendo fagocitados por macrófagos (seta) (HE, 32x).

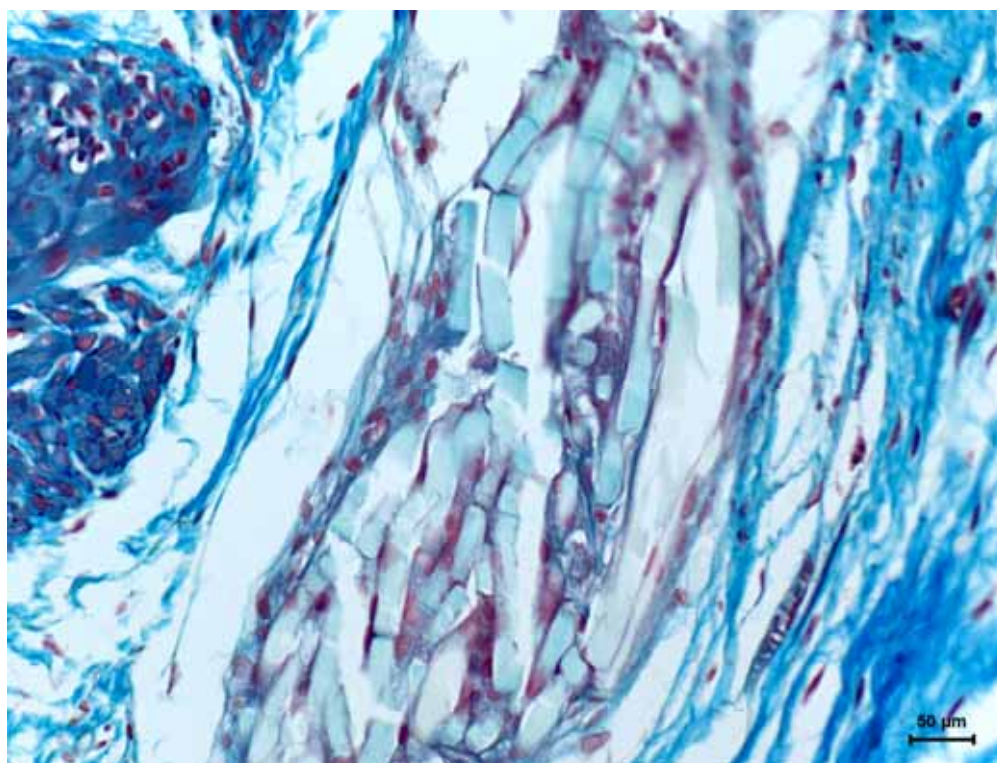


Figura 21: Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS acelular (GC). Notar ao centro a presença de fragmentos longitudinais de aspecto fibrilar e hialinizado, corados em azul (Masson, 32x).

De modo similar, a análise histológica das amostras centrais do GT apresentou variações quanto aos critérios analisados. Entretanto, em todos os animais foi verificada a presença das quatro túnicas individualizadas e com arquitetura típica. Observou-se diferença significativa entre o GC e GT, considerando-se a presença de arquitetura histológica típica na região da cistoplastia ( $p < 0,01$ ).

Na túnica mucosa, foi observado revestimento urotelial pouco heterogêneo com urotélio espesso em quase toda a sua totalidade e por vezes entremeado com áreas focais de hiperplasia urotelial. Pequenas áreas focais de ausência do urotélio, contudo, também foram verificadas em dois cães (2 e 4).

Subjacente às áreas de hiperplasia urotelial, similar ao observado nos animais do GC, foram identificados raros ninhos de Brunn em todos os animais do GT (Figura 23) ( $p = 0,17$ ).

Adicionalmente, na túnica submucosa foram observadas áreas constituídas predominantemente por fibroblastos e discreta quantidade de tecido conjuntivo colagenoso, cuja natureza foi confirmada pelo método de Tricrômico de Masson.

Entremeados ao estroma conjuntivo foram observados focos de hemorragia aguda, vasos sanguíneos de pequeno calibre e infiltrado inflamatório com predomínio de células polimorfonucleares (animais 1, 3 e 5) ou mononucleares (animais 2 e 4). Na amostra do animal 1, o processo inflamatório foi classificado como exacerbado. Não foram evidenciados, contudo, neutrófilos degenerados ou a presença de estruturas bacterianas.

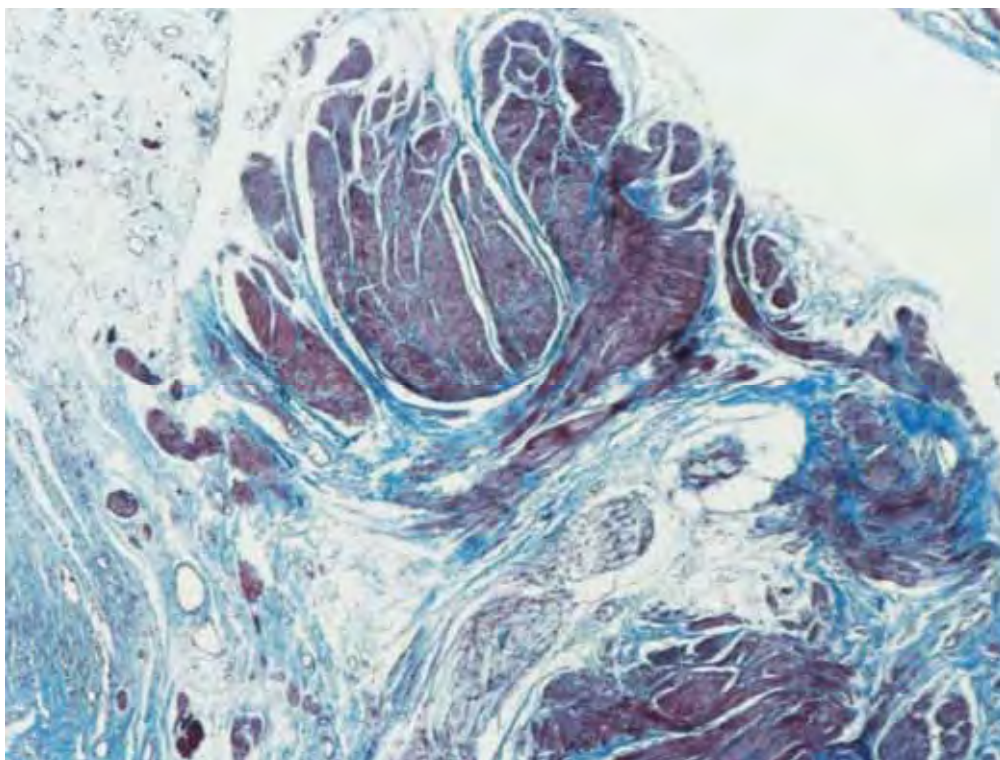


Figura 22: Fotomicrografia da região central de lesão vesical reparada com a SIS acelular (GC). Notar ausência da arquitetura vesical típica e presença de fibras musculares coradas em vermelho, dispostas em feixes de diversos calibres. (Masson, 4x).

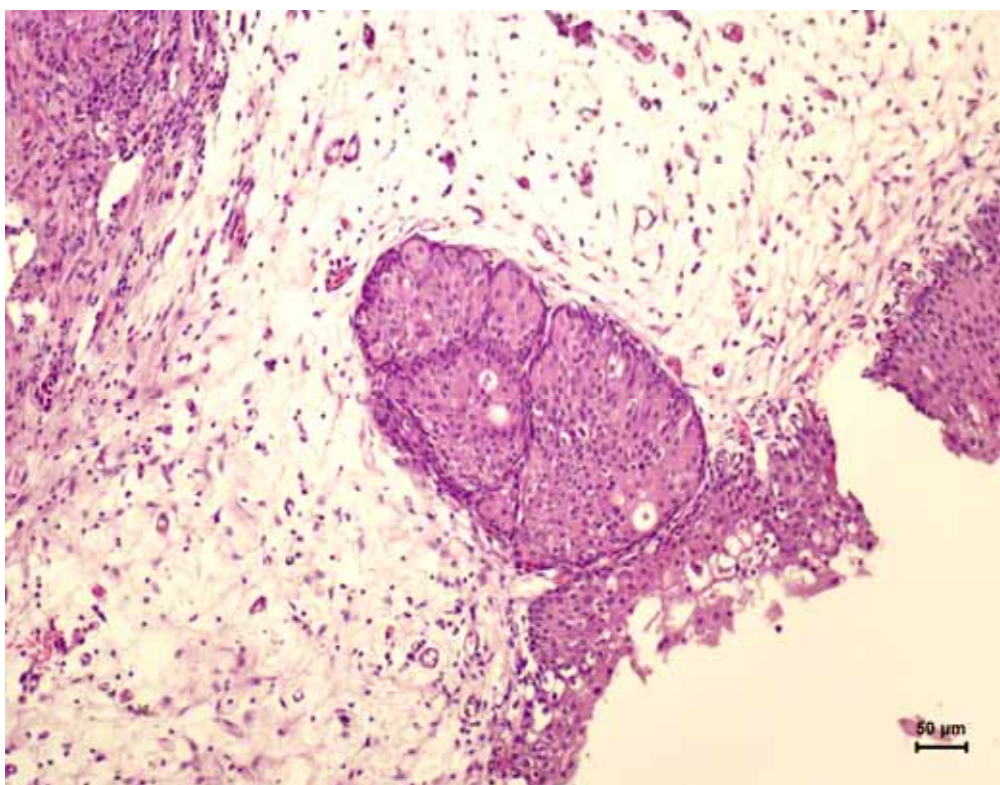


Figura 23: Fotomicrografia da região central da cistoplastia tratada com a SIS semeada com CMLH (GT). Notar ao centro ninho de Brunn subjacente a área focal de hiperplasia urotelial. (HE, 12,5x).

Na amostra correspondente ao animal 4 foi ainda visualizada na túnica submucosa fragmentos residuais da membrana circundados por inúmeros macrófagos epitelióides com atividade fagocitária tipo corpo estranho. Tais fragmentos também foram observados no tecido conjuntivo intersticial da túnica muscular do mesmo animal e na amostra do animal 1.

À túnica muscular foram verificadas arquitetura e organização típicas, caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular média e longitudinal interna (Figura 24) (p=0,17).

A túnica serosa apresentou arquitetura típica com presença de revestimento mesotelial em todos os cães.

#### 5.6.2. Análise histológica das amostras de transição

Os cortes histológicos das áreas de transição compreendiam a SIS, acelular (GC) ou semeada com CMLH (GT), e o tecido vesical adjacente. A distinção exata entre a membrana implantada e a bexiga original, no entanto, não foi possível com base nos achados histológicos.

No GC, as túnicas mucosa, submucosa, muscular e serosa foram identificadas em todos os cães.

Na túnica mucosa, verificaram-se áreas de revestimento urotelial bastante heterogêneas, variando desde a presença de uma a duas camadas de células uroteliais até a ausência completa de urotélio em determinadas áreas ou a presença de hiperplasia urotelial focal em outras.

Na submucosa, foi observada presença de inúmeros capilares sustentados por um estroma de tecido conjuntivo frouxo, circundados por células inflamatórias com predomínio de mononucleares (animais 3, 4 e 5) ou polimorfonucleares (animais 1 e 2).

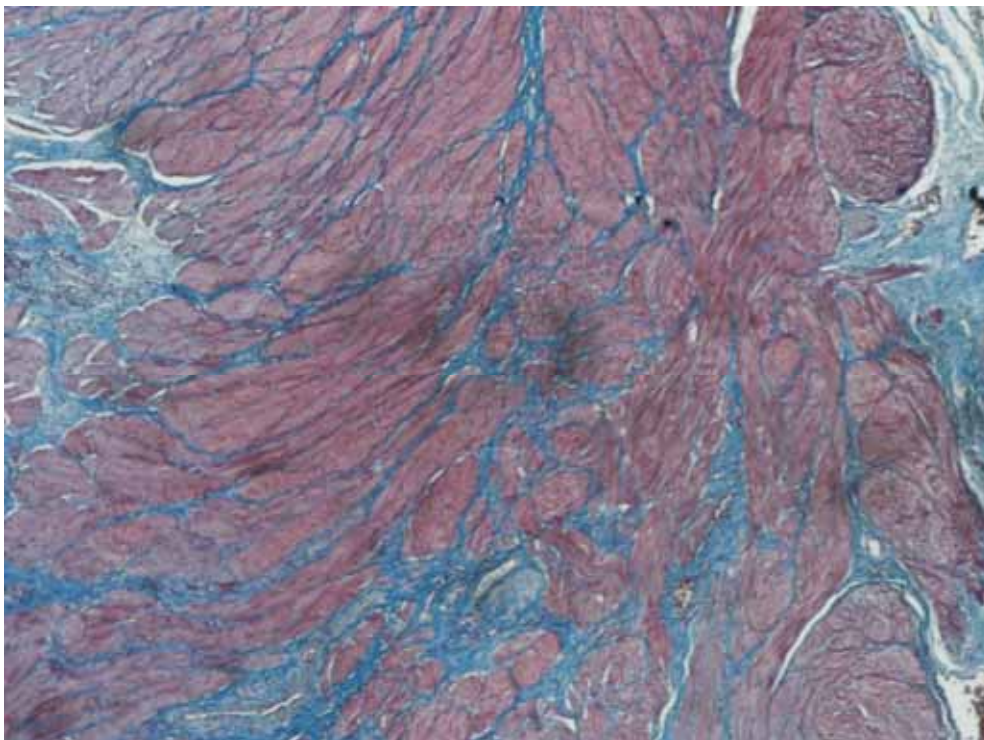


Figura 24: Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS semeada com CMLH (GT). Notar os inúmeros fascículos musculares corados em vermelho (Masson, 12,5x).

Adicionalmente, em determinadas áreas da túnica submucosa foram identificados focos de hemorragia aguda, edema e discreta quantidade de macrófagos ativos, por vezes demonstrando figuras de fagocitose ao redor de fragmentos residuais de membrana (animais 1 e 5). A natureza de tais fragmentos foi novamente confirmada pelo método de Tricrômio de Masson.

Na túnica muscular foram verificadas arquitetura e organização típicas – caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular média e longitudinal interna – somente no cão 5. Nos demais, foram observados feixes musculares de diferentes calibres, distribuídos aleatoriamente e sem a estruturação histológica típica (Figura 25).

Na camada serosa foi constatada estruturação histológica típica, porém sem revestimento mesotelial.

Paralelo ao descrito anteriormente, nas amostras de transição dos animais do Grupo Tratado (GT) foram constatadas variações quanto aos critérios analisados. Em todas as amostras, porém, foi verificada a presença das quatro túnicas com arquitetura típica.

Na túnica mucosa foram observadas áreas de revestimento urotelial homogêneo com prevalência de poucas camadas de células em praticamente toda a extensão do urotélio; portanto, verificou-se a ausência de áreas de hiperplasia do urotélio e cistos de Brunn. Áreas focais de desnudamento do mesmo, no entanto, foram verificadas no cão 2.

Comparando-se o GC e GT, notou-se que o revestimento urotelial completo, na região de transição foi superior no GT ( $p=0,05$ ); entretanto, a hiperplasia urotelial foi superior no GC ( $p<0,01$ ).

À túnica submucosa foi verificada grande quantidade de capilares de pequeno

calibre, congestos e sustentados por um estroma de tecido conjuntivo frouxo. Adjacentes a esses vasos, identificaram-se ainda focos de hemorragia aguda, edema e infiltrado inflamatório, constituído predominantemente por células polimorfonucleares (animais 1, 3 e 5) ou mononucleares (animais 2 e 4).

No cão 1, contudo, o processo inflamatório foi classificado como exacerbado. Novamente não foram evidenciados neutrófilos degenerados ou a presença de estruturas bacterianas.

Na túnica muscular foram verificadas arquitetura e organização típicas, caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular média e longitudinal interna (Figura 26).

A presença de estratificação típica da túnica muscular, na região de transição, foi superior no GT em relação do GC ( $p=0,05$ ).

Adicionalmente, no tecido conjuntivo que permeava as fibras musculares na amostra referente ao cão 2, foram visualizados fragmentos residuais da membrana, circundados por inúmeros macrófagos epitelióides com atividade fagocitária tipo corpo estranho.

Na camada serosa, foi verificada arquitetura típica com ausência de revestimento mesotelial apenas nos animais 1 e 2.

As principais alterações histológicas, observadas nas regiões central e transicional, estão elencadas na Tabela 11.

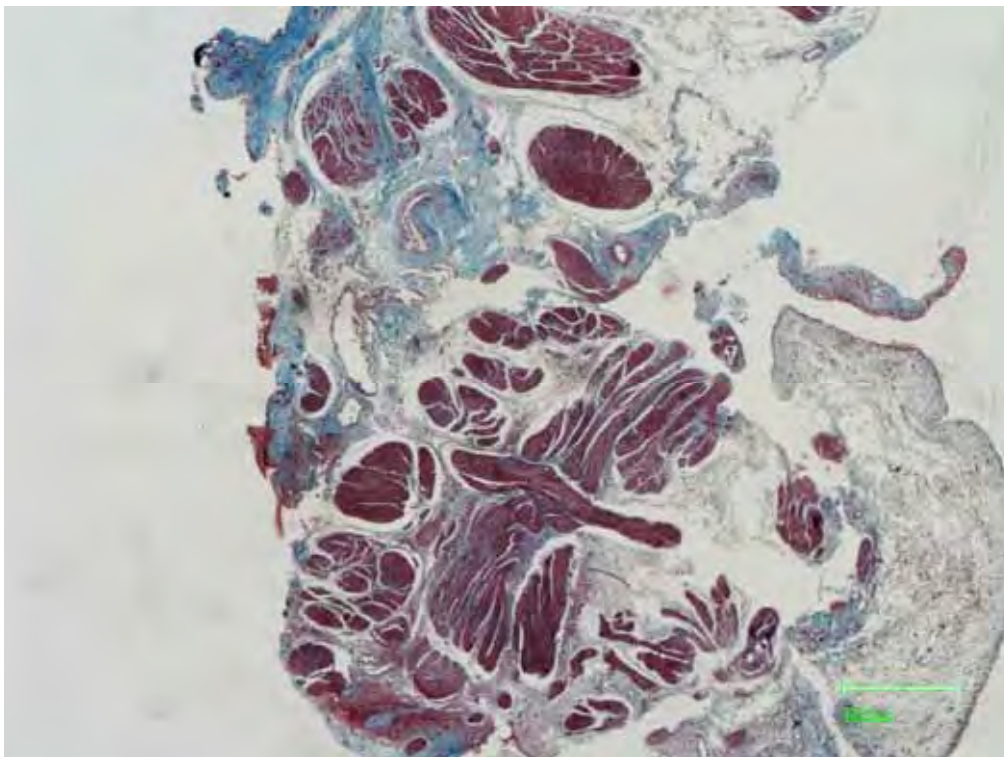


Figura 25: Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS acelular e a bexiga original (GC). Notar os feixes musculares de diferentes calibres, distribuídos de forma aleatória (Masson, 2x).

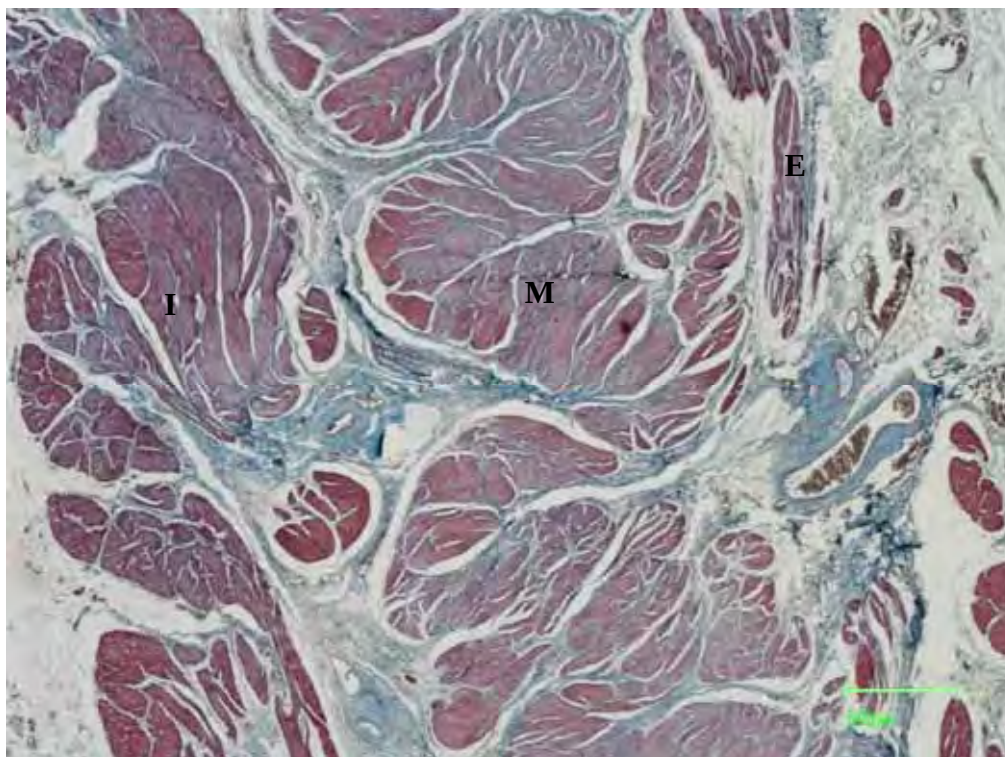


Figura 26: Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS semeada com CMLH e a bexiga original (GT). Notar a disposição típica das camadas longitudinal externa (E), circular média (M) e longitudinal interna (I) da túnica muscular (Masson, 2x).

**Tabela 11.** Principais alterações histológicas observadas nas amostras centrais e de transição dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT) após 60 dias da cistoplastia.

| Critérios                                | Área Central |      |     |      |       | Área Periférica |      |     |      |               |
|------------------------------------------|--------------|------|-----|------|-------|-----------------|------|-----|------|---------------|
|                                          | GC           |      | GT  |      | p*    | GC              |      | GT  |      | p*            |
|                                          | N            | %    | N   | %    |       | N               | %    | N   | %    |               |
| Arquitetura histológica normal           | 0/5          | 0%   | 5/5 | 100% | <0,01 | 5/5             | 100% | 5/5 | 100% | 1,00          |
| Revestimento urotelial completo          | 0/4          | 0%   | 3/5 | 60%  | 0,44  | 0/5             | 0%   | 4/5 | 80%  | <b>0,05</b>   |
| Hiperplasia urotelial                    | 3/4          | 75%  | 5/5 | 100% | 0,44  | 5/5             | 100% | 0/5 | 0%   | < <b>0,01</b> |
| Cistos de Brunn                          | 2/4          | 50%  | 5/5 | 100% | 0,17  | 0/5             | 0%   | 0/5 | 0%   | 1,00          |
| Estratificação típica da túnica muscular | 1/3          | 33%  | 5/5 | 100% | 0,29  | 1/5             | 20%  | 5/5 | 100% | <b>0,05</b>   |
| Inflamação aguda                         | 2/5          | 40%  | 3/5 | 60%  | 1,00  | 2/5             | 40%  | 3/5 | 60%  | 1,00          |
| Inflamação crônica                       | 5/5          | 100% | 5/5 | 100% | 1,00  | 5/5             | 100% | 5/5 | 100% | 1,00          |
| Resquícios da membrana                   | 3/5          | 60%  | 2/5 | 40%  | 1,00  | 2/5             | 40%  | 1/5 | 20%  | 1,00          |

\*Teste Exato de Fisher

### 5.7. Análise quantitativa do processo inflamatório

Na região central da cistoplatia, verificou-se discreto infiltrado inflamatório em três animais do GC e três do GT; moderado em um animal do GC e um do GT; e acentuado em um animal do GC e um do GT.

Na região de transição observou-se discreto infiltrado inflamatório em três animais do GC e quatro animais do GT; moderado em um do GC; e acentuado em um animal do GC e um animal do GT.

Com base na qualificação geral do infiltrado, dois animais do GC e três do GT apresentaram processo inflamatório agudo, caracterizado pelo predomínio de células inflamatórias polimorfonucleares.

Complementar ao dado supramencionado, três animais do GC e dois do GT apresentaram processo inflamatório crônico, caracterizado pelo predomínio de células inflamatórias mononucleares.

Não houve diferença entre o GC e GT quanto ao infiltrado de células polimorfonucleares tanto na região central ( $p=0,55$ ) quanto na de transição ( $p=0,42$ ). Da mesma forma, não houve diferença entre o GC e GT quanto à quantidade de células mononucleares na região central da cistoplastia ( $p=0,69$ ); No entanto, a presença de células mononucleares na região de transição foi maior no GC em relação ao GT ( $p=0,016$ ).

Com relação à presença de macrófagos, especificamente na região central da cistoplastia, verificou-se maior quantidade no GT em relação ao GC ( $p=0,03$ ). Na região de transição, entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos ( $p=1,00$ ) (Figuras 27 e 28).

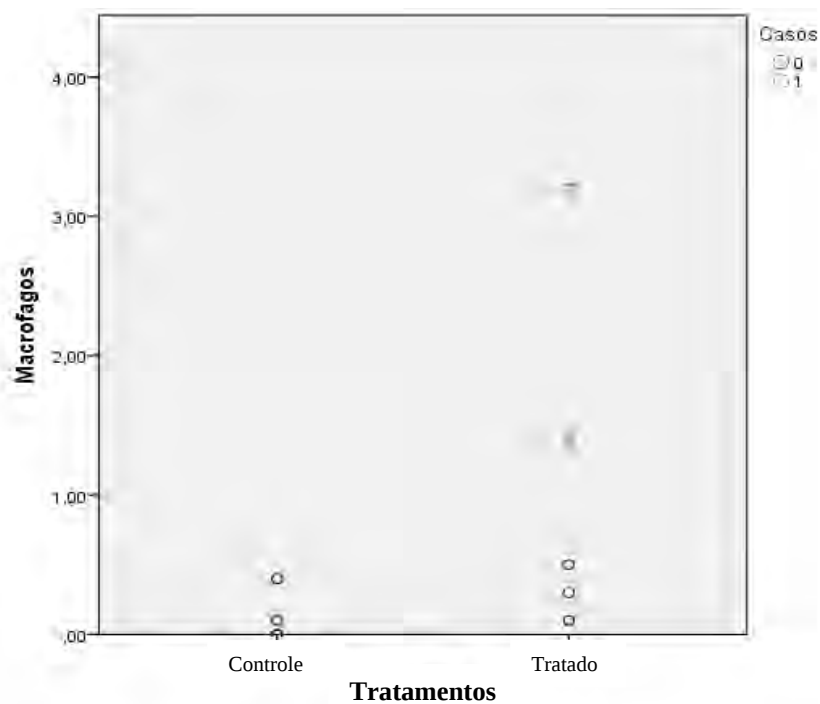


Figura 27. Dispersão das amostras centrais dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à quantidade de macrófagos

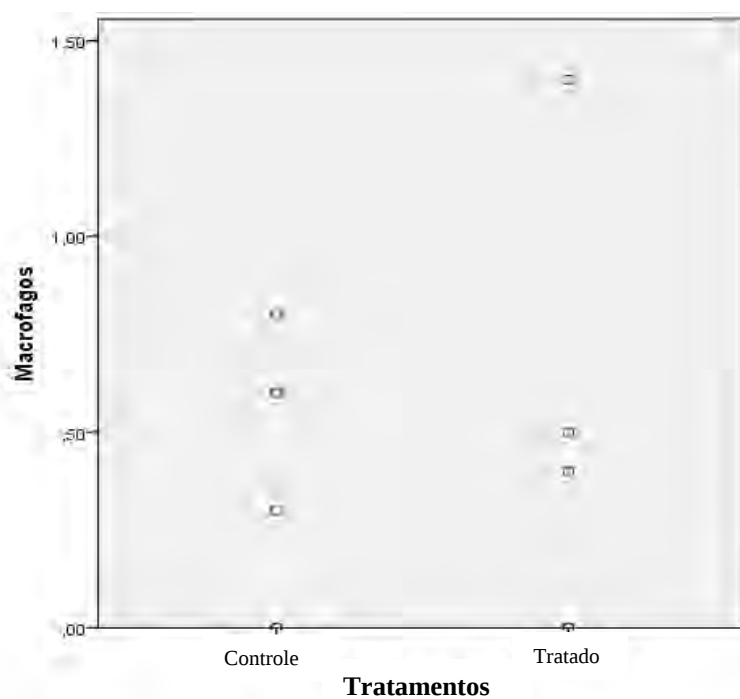


Figura 28. Dispersão das amostras periféricas dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à quantidade de macrófagos

O número de vasos foi similar entre os grupos, tanto na região central da cistoplastia ( $p=0,31$ ), quanto na de transição ( $p=0,22$ ).

Quanto ao número de fibroblastos também não foi notada diferença entre o GC e GT, nas regiões central da cistoplastia ( $p=0,22$ ) e de transição ( $p=0,54$ ).

## **5.8. Análise histopatológica digital quantitativa**

### **5.8.1. Análise quantitativa das fibras colágenas e musculares**

A organização e distribuição das fibras musculares não foram levadas em consideração na quantificação do tecido muscular, sendo apenas contabilizado o número total de pixels referentes às fibras musculares, coradas em tons de vermelho claro e escuro. De modo semelhante, para a quantificação do tecido colagenoso foi contabilizado apenas o número de pixels referentes às fibras colágenas coradas em tons de azul claro e escuro.

Nas Tabelas 12 e 13, estão apresentadas a porcentagem média dos tecidos muscular e colagenoso nas regiões central e de transição dos cães do GC e GT. Os respectivos gráficos de dispersão estão apresentados nas Figuras 29, 30, 31 e 32.

Em decorrência dos resultados anteriores, a relação entre o tecido muscular e colagenoso foi maior nos animais do GT quando comparados aos do GC, tanto na região central da cistoplastia ( $p=0,025$ ) quanto na de transição ( $p=0,016$ ).

**Tabela 12.** Distribuição da quantidade de tecido muscular das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT)

| <b>Região</b>    | <b>Controle</b> |              | <b>Tratado</b> |              | <b>Valor p</b> |
|------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|                  | <b>N</b>        | <b>Média</b> | <b>N</b>       | <b>Média</b> |                |
| <b>Central</b>   | 5/5             | 0,30 ± 0,20  | 5/5            | 0,56 ± 0,07  | 0,04           |
| <b>Transição</b> | 5/5             | 0,54 ± 0,04  | 5/5            | 0,68 ± 0,07  | 0,07           |

**Tabela 13.** Distribuição da quantidade de tecido colagenoso das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT)

| <b>Região</b>    | <b>Controle</b> |              | <b>Tratado</b> |              | <b>Valor p</b> |
|------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|                  | <b>N</b>        | <b>Média</b> | <b>N</b>       | <b>Média</b> |                |
| <b>Central</b>   | 5/5             | 0,70 ± 0,20  | 5/5            | 0,44 ± 0,07  | 0,04           |
| <b>Transição</b> | 5/5             | 0,46 ± 0,04  | 5/5            | 0,32 ± 0,07  | 0,07           |

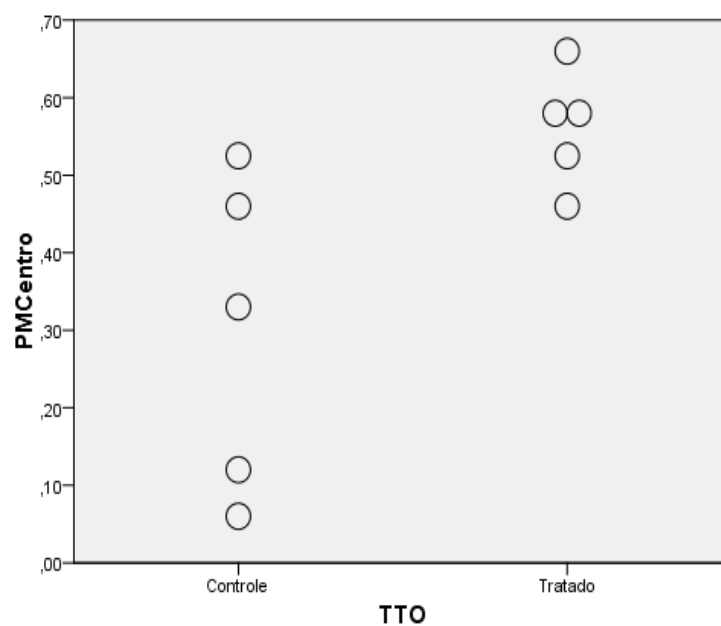


Figura 29. Dispersão das amostras na região central dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras musculares. PMCentro: Porcentagem de músculo na região central; TTO: Tratamentos.

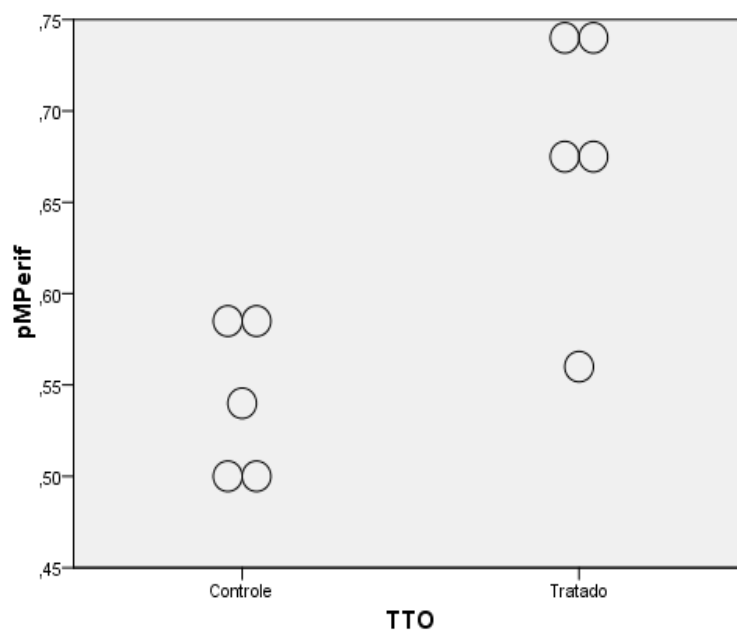


Figura 30. Dispersão das amostras na região de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras musculares. PMPerif: Porcentagem de músculo na região de transição (periférica); TTO: Tratamentos.

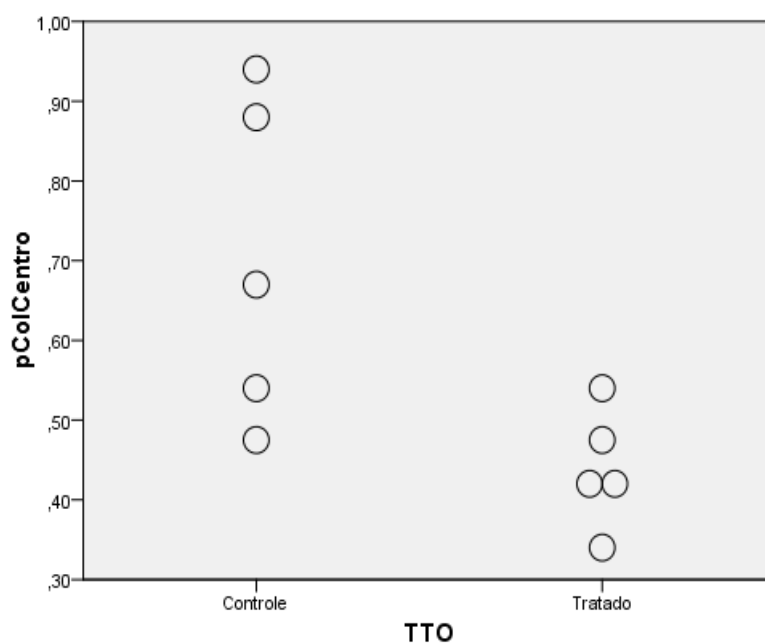


Figura 31. Dispersão das amostras na região central dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras colágenas. pColCentro: Porcentagem de colágeno na região central; TTO: Tratamentos.

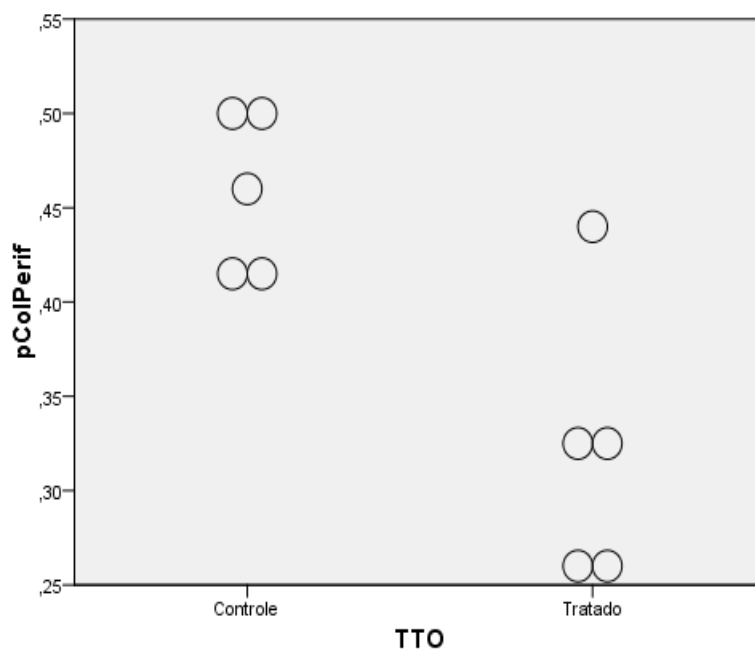


Figura 32. Dispersão das amostras na região de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado quanto à porcentagem de fibras colágenas. pColPerif: Porcentagem de colágeno na região de transição (periferia); TTO: Tratamentos.

### 5.8.2. Quantificação da espessura da túnica muscular

A espessura da túnica muscular na região central do GC não foi mensurada devido à disposição de suas fibras em feixes de diferentes calibres, distribuídos aleatoriamente ao longo do corte histológico. A túnica muscular na região central do GT, entretanto, apresentou estratificação típica que permitiu a mensuração de sua espessura. A espessura média da túnica muscular nas amostras centrais do GT foi de 2679,55  $\mu\text{m}$ .

Já na região de transição, a mensuração foi realizada tanto no GC como no GT devido à presença de estratificação histológica típica da túnica muscular em ambos os grupos. Sendo assim, a espessura média da túnica muscular na região de transição do GC foi de 2809,86  $\mu\text{m}$  e do GT de 3366,21  $\mu\text{m}$ . Não houve diferença quanto à espessura da túnica muscular na região de transição dos animais de ambos os grupos avaliados ( $p=0,42$ ).

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1. Cultivo celular**

A SIS assume destaque dentre diversos tipos de enxertos devido a sua capacidade de reparação da bexiga e outros tecidos do trato urinário (YIANG e GUOMIN, 2008); este fator influenciou sua escolha para uso no presente estudo.

Segundo Kropp et al. (1996) e Atala (2000), a neobexiga formada a partir da SIS, entretanto, difere histologicamente quanto a organização e quantidade das fibras musculares lisas, dispostas de maneira desorganizada e em menor número. Além disso, O'sullivan e Barrett (1993) descreveram que a bexiga tornar-se-ia permanentemente contraída quando reparada apenas com biomateriais, sendo a utilização conjunta de células musculares uma alternativa para minimizar essa ocorrência. Segundo, Kimuli et al. (2004), as capacidades de contração e relaxamento normais da bexiga dependem da camada muscular normal. Assim sendo, foi primordial a padronização da cultura celular que se mostrou exequível e sem complicações durante as várias etapas associadas, como a identificação das CMLH, de suma importância para a concretização do estudo. A identificação das células foi realizada inicialmente por meio de análise morfológica. De acordo com Freshney (2005), a observação da morfologia celular é o método mais simples e direto de identificação, além de permitir a avaliação simultânea da integridade física das células.

A morfologia das CMLH empregadas neste estudo apresentavam as características similares às descrita por Vasconcelos e Carvalho (2005). Segundo os autores, as células musculares lisas são grandes e apresentam mais frequentemente aspecto fusiforme. O formato do núcleo, situado na região central, depende do estado de contração, sendo normalmente alongado e de contorno irregular durante o repouso.

Além disso, destacam-se pequenas vesículas dispostas ao longo das células, intercaladas com áreas densas que ancoram o citoesqueleto. Tais estruturas seriam caracterizadas por invaginações na superfície da membrana plasmática, denominadas cavéolas.

O aspecto fusiforme das CMLH, entretanto, pode com frequência assemelhar-se ao dos fibroblastos, contaminantes comuns em cultivos celulares e que podem contribuir na formação de tecidos cicatriciais e na diminuição da função contrátil da bexiga (Sharma et al., 2009). Segundo Moraes e Joazeiro (2005), os fibroblastos apresentam perfis alongados ou fusiformes com pequeno número de prolongamentos citoplasmáticos. O núcleo é volumoso e elíptico, e vesículas citoplasmáticas podem ser visualizadas de acordo com a atividade funcional.

Em razão da similiaridade entre as CML da bexiga e fibroblastos, foi realizada imunocitoquímica pelo método LSAB. De acordo com Freshney (2005), a caracterização celular por imunocitoquímica, baseada na identificação de marcadores antigênicos, consiste em ferramenta útil para a autenticação da origem celular em cultivos primários; diferenciação de possíveis linhagens celulares contaminantes; e determinação de transformação celular, seja esta associada a processo fisiológico ou neoplásico.

A marcação positiva para  $\alpha$ -actina de músculo liso, verificada no citoplasma das células cultivadas neste estudo, possibilitou confirmar a origem muscular das mesmas e distingui-las de possíveis fibroblastos contaminantes. A  $\alpha$ -actina é uma proteína muscular constituinte dos filamentos contráteis, expressa em diferentes níveis de diferenciação das células da musculatura lisa da bexiga e de outros órgãos viscerais (WICE e GLASER, 1987; VASCONCELOS e CARVALHO, 2005).

Por outro lado, CML da bexiga também podem expressar epítomos de superfície próprios de fibroblastos e células endoteliais ao sofrerem processo de

“desdiferenciação” (SHARMA et al., 2009). De acordo com Wice e Glaser (1987), a reversibilidade do processo de diferenciação das células musculares pode ocorrer em condições específicas, como a alta concentração de soro no meio de cultura. O meio de cultura utilizado no presente estudo, contudo, não possuía quantidade excessiva de soro fetal bovino.

Adicionalmente, as células musculares que iniciam o processo de “desdiferenciação” tornam-se menos quiescentes e interrompem a síntese de proteínas contráteis (WICE e GLASER, 1987). Assim como descrito nos resultados, tais alterações não foram verificadas no presente estudo durante as avaliações microscópicas em microscópio invertido e à imunocitoquímica.

A perspectiva futura, portanto, é que além da validação do cultivo celular por imunofenotipagem, seja realizada a análise genômica das células cultivadas, obtidas por meio de microdissecção tecidual a laser e outras tecnologias (FRESHNEY, 2005; SHARMA et al., 2009).

Apesar do exposto, a obtenção das células pelo método convencional de cultivo e a caracterização fenotípica exclusivamente para  $\alpha$ -actina de músculo liso não comprometeram os resultados verificados neste estudo.

Ainda com relação ao cultivo celular, os animais que vieram a óbito (doadores 1 e 2) proporcionaram maior quantidade de CMLH quando comparados aos animais do GC. Isso se deve ao fato da disponibilidade de tecido ser maior na primeira situação, pois a bexiga foi removida em quase sua totalidade, logo depois de constatado o óbito.

No caso dos animais do GC, no entanto, as células foram obtidas a partir de pequenos fragmentos da bexiga, durante a realização da cistoplastia.

Assim sendo, os tecidos cadavéricos de animais previamente selecionados constituem uma alternativa satisfatória para a obtenção de células homólogas da

bexiga, pois além da aparente vantagem quanto à disponibilidade tecidual, as células homólogas possuem as mesmas características das células autólogas, incluindo a sua capacidade de auto-replicação (ALVEZ et al., 2009).

Embora as células autólogas constituam a primeira opção em terapias celulares, a quantidade de células obtidas geralmente é muito limitada, em especial considerando se a idade do paciente for avançada ou o procedimento de coleta colocar em risco a vida do paciente (ALVEZ et al., 2009). Outra desvantagem apontada por Zhang et al. (2005) e mais recentemente Yinan e Guomin (2008), consiste na possibilidade de coleta e cultura de células neoplásicas em pacientes oncológicos. Segundo os autores supramencionados, portanto, o uso de células homólogas, obtidas a partir de cadáveres, seria uma alternativa viável frente às células autólogas. O uso das células homólogas, sem dúvidas, para a aplicação prática em medicina veterinária é muito vantajoso.

A ausência de alterações compatíveis com rejeição hiperaguda ou aguda neste estudo também corrobora com a utilização das CMLH na reparação de lesões envolvendo a bexiga. De acordo com Wakitani et al. (2008), as células homólogas quando expandidas *in vitro* possuem potencial imunogênico bastante reduzido e podem ser utilizadas com segurança no reparo de lesões em diferentes tecidos.

Do mesmo modo, Iamaguti et al. (2010), avaliando a utilização de condrócitos homólogos no reparo de lesões osteocondrais em cães, descrevem que as células homólogas quando cultivadas *in vitro* diminuem sua expressão antigênica. De acordo com Lavasani et al. (2007), em diversos estudos avaliando a utilização de miócitos primários no reparo de lesões musculares, as células que permaneceram por maior tempo em cultivo e conseqüentemente sofreram maior número de passagens, perderam uma série de antígenos e transformaram-se *in vitro* em células musculares precursoras com maior capacidade de regeneração da musculatura *in vivo*.

Neste estudo, as células empregadas sofreram em média três passagens antes de serem semeadas sobre a SIS. Acredita-se, portanto, que o tempo de cultivo celular e as passagens realizadas devem ter contribuído para a diminuição da expressão antigênica das CMLH da bexiga.

Foi observada ainda adequada interação *in vitro* entre as CMLH e a SIS. Segundo Zhang et al. (2005), isso se deve à presença de proteínas estruturais e funcionais em sua composição, como colágeno, fatores de crescimento, citocinas, glicoproteínas e proteoglicanos que promovem a migração e interação intercelulares (VOYTIK-HARBIN et al., 1996; YAMADA et al., 2003; GRECA et al., 2004). Em função da sua opacidade, contudo, a SIS apresentou no presente estudo uma desvantagem enquanto arcabouço celular *in vitro*, caracterizada pela impossibilidade de visualização das células semeadas no centro da membrana durante as avaliações microscópicas com microscópio invertido.

Tal desafio, entretanto, foi superado pela avaliação histopatológica pelo método de Tricrômico de Masson, possibilitando dessa forma identificar os núcleos celulares entremeados a fibras colágenas coradas ora em azul ora em vermelho. De acordo com Ginn et al. (2007), o método de Masson é útil na diferenciação de fibras colágenas, normalmente coradas em azul. Entretanto, fibras colágenas alteradas também podem ser coradas em vermelho e estão associadas a processos degenerativos.

Portanto, as fibras colágenas coradas em vermelho, observadas no estudo, podem estar relacionadas à degradação a qual foram submetidas durante o processamento histológico. Na membrana implantada, porém, não foram observadas alterações durante o período de incubação e/ou processamento similar que pudessem influenciar nos resultados obtidos.

## 6.2. Avaliação clínica e laboratorial

Nas avaliações clínicas, o aumento dos linfonodos inguinais foi observado temporariamente logo após o procedimento cirúrgico e foi decorrente do trauma tecidual cirúrgico. Segundo Getty (2008), os linfonodos inguinais são responsáveis pela drenagem da área abdominal incisada.

De modo similar, atribui-se a perda de peso corpóreo ao trauma e estresse cirúrgicos. Segundo Fossum et al. (2008), a perda de peso pode ocorrer no período pós-operatório devido à demanda aumentada por proteínas e calorias para a reparação tecidual, dentre outros fatores não observados no experimento em questão, como anorexia, má absorção e sepse.

Apatia e sensibilidade abdominal decorrentes do procedimento cirúrgico foram igualmente observadas no pós-operatório imediato. Contudo, acredita-se que a implantação da membrana não resultou em maior sensibilidade abdominal em relação à cirurgia vesical convencional, procedimento comumente realizado na rotina cirúrgica veterinária. Esta alteração não persistiu por tempo prolongado devido à instituição de adequado protocolo analgésico.

Alterações miccionais, como polaciúria e hematúria, em geral, foram verificadas logo após o ato operatório em razão do trauma tecidual e inflamação da bexiga, mas também pela própria presença da membrana. Segundo Zhang et al. (2006) e Know et al. (2008), a implantação da SIS ou outras membranas biodegradáveis acarretaria na diminuição das capacidades de distensão vesical e armazenamento de urina, resultando consequentemente em polaciúria.

Já a observação de polaciúria e hematúria nos animais do GC em momentos posteriores (M7 e M30) deve-se a infecção do trato urinário, confirmada por meio dos

exames de urina tipos I e II, e exame ultrassonográfico abdominal. Segundo Nelson e Couto (2010), polaciúria e hematúria micro ou macroscópica frequentemente são decorrentes de infecção do trato urinário. A hematúria microscópica foi confirmada pelo exame de urina tipo I e será discutida mais adiante.

Nos parâmetros hematológicos, foi verificada ao hemograma intensa eosinofilia no M60 em ambos os grupos avaliados. A eosinofilia está comumente relacionada a processos alérgicos, parasitoses, neoplasias e outros distúrbios imunomediados específicos (BUSH, 2004; CONWAY et al., 2011).

Entretanto, apesar de rara, o aumento do número de eosinófilos circulantes também pode estar associado à rejeição aguda após neurocirurgias utilizando enxertos colágenos derivados de tecidos bovinos e transplantes cardíacos em humanos (FOY et al., 2008; NAROTAM et al., 2009; CONWAY et al., 2011).

A eosinofilia observada no presente estudo, contudo, provavelmente não está relacionada à rejeição ocasionada pela membrana e/ou células semeadas, uma vez que não se observou quantidade expressiva de eosinófilos infiltrados na submucosa das amostras obtidas após biópsia. Ao contrário, Conway et al. (2011), observaram às secções histológicas do miocárdio processo inflamatório difuso com exacerbada quantidade de eosinófilos em um paciente com eosinofilia após transplante cardíaco. O mesmo foi verificado por Narotam et al. (2009) durante avaliação histológica do enxerto derivado de tecido bovino, utilizado no reparo da dura-máter em um paciente após craniotomia da fossa posterior.

Adicionalmente, os animais deste estudo não manifestaram outras alterações clínicas significativas que corroborassem com a hipótese de eosinofilia secundária a rejeição. Já Foy et al. (2008) descrevem a ocorrência de eritema difuso e hipertemia em um paciente com eosinofilia, submetido a reparo da dura-máter com enxerto colágeno

derivado de tecido bovino. De acordo com os autores, as alterações clínicas cederam após a remoção do enxerto.

Por outro lado, Kim et al. (2008) afirmam que a eosinofilia pode apresentar valor prognóstico benéfico em pacientes com distúrbios linfoproliferativos submetidos a transplante de células precursoras não diferenciadas (stem cells). Segundo os autores, pacientes com eosinofilia tardia apresentaram maior sobrevida quando comparados aqueles com número normal de eosinófilos circulantes no mesmo período. Isso seria devido, provavelmente, à ativação da via Th2, responsável pela liberação de citocinas eosinofílicas, e diminuição da ativação da via Th1, responsável pela ativação de linfócitos (KIM et al., 2008). De acordo com Conway et al. (2011), são os linfócitos T e não os eosinófilos que normalmente estão envolvidos com os mecanismos de rejeição celular aguda.

Não há, porém, consenso na literatura quanto à participação dos eosinófilos nos processos de rejeição aguda, bem como quanto à existência ou não de associação entre a eosinofilia e o risco de desenvolvimento de rejeição (KIM et al., 2008; CONWAY et al., 2011).

Assim sendo, não foi possível inferir com exatidão a causa da eosinofilia neste estudo. Apesar de não identificados parasitas ao exame coproparasitológico e de realizado periodicamente o controle de ectoparasitas, os animais estavam expostos frequentemente a desafios externos dessa natureza. Acredita-se, portanto, que isso possa ter influenciado nos resultados obtidos. A observação dos animais por um período maior, além da adoção de um ambiente com controle mais rigoroso, especialmente se consideradas outras espécies animais para experimentação, consistem em alternativas para a elucidação dessa alteração.

Em relação às anormalidades ao exame de urina tipo I, foi verificada ao longo do período de avaliação densidade urinária por vezes com valores acima ou abaixo dos referenciais. Acredita-se que a presença de sedimento urinário, confirmada pelo exame ultrassonográfico abdominal, pode ter contribuído para o aumento da densidade urinária nesses animais. Adicionalmente, segundo Bush (2004), valores elevados podem resultar de desidratação grave, perfusão renal inadequada, hemorragia e choque. Os animais que apresentaram desidratação pós-operatória foram adequadamente tratados até que os valores laboratoriais retornassem à normalidade. As demais causas não foram observadas no presente estudo.

Já de acordo com Brown (2003), valores baixos estão associados à doença renal aguda ou crônica, obstrução parcial do trato urinário, diversas endocrinopatias e polidipsia primária. Os animais do presente estudo não apresentaram polidipsia primária, porém foram submetidos em determinadas situações à maior indução de ingestão de água para realização do exame ultrassonográfico abdominal, durante o qual foi realizada cistocentese para coleta de urina.

Além disso, os valores baixos podem ser justificados pelo fato dos animais com função renal normal poderem exibir redução temporária na capacidade de concentração urinária no período pós-operatório devido à anestesia ou administração de agentes antiinflamatórios não-esteróides (BROWN, 2003).

As demais causas descritas não foram verificadas. Ao ser constatada a alteração, todos os animais foram desprovidos de água por um período equivalente à oito horas, apresentando então aumento da densidade urinária.

Ainda quanto às anormalidades ao exame de urina tipo I, os animais do GC apresentaram aumento do pH médio aos 30 dias de pós-operatório, atribuído à ocorrência de cistite. Segundo Bush (2004), o pH urinário alcalino decorre de infecção

do trato urinário envolvendo bactérias produtoras de urease que degradam a uréia e transformam-na em amônia, cujo pH é alto. Não foram observadas outras condições alcalinizantes, como êmese, retenção urinária ou dieta pobre em proteínas e rica em vegetais.

Além da alcalinização da urina, animais com infecção do trato urinário apresentam frequentemente bacteriúria, hematúria, piúria, cristalúria e aumento da concentração protéica urinária (NELSON e COUTO, 2010). De acordo com Bailiff et al. (2008), a severidade da bacteriúria, hematúria e piúria no sedimento urinário está fortemente correlacionada com cultura positiva. Nestes cães do estudo, tais achados laboratoriais foram igualmente observados ao longo do período de avaliação nos animais do GC com cultura positiva.

Kwon et al. (2008) também verificaram bacteriúria, hematúria e piúria após implantação de membrana biológica em cães submetidos à cistectomia subtotal. Segundo os mesmos, a ocorrência de cistite foi atribuída à permanência de sonda uretral por uma semana após a cistoplastia. Do mesmo modo, Probst et al. (2000) relataram a ocorrência de cistite em cinco dos sete cães mantidos sondados após a implantação de membrana colágena para a reparação da bexiga. Tal conduta, apesar de alguns resultados similares, não foi realizada neste estudo.

Sendo assim, a alta ocorrência de cistite poderia estar relacionada a diversos fatores inerentes ao próprio animal, ao procedimento cirúrgico ou até mesmo à membrana utilizada.

Seguin et al. (2003) sugerem que cadelas castradas apresentam maior risco de infecção do trato urinário devido às diferenças anatômicas e fisiológicas existentes entre machos e fêmeas. Segundo os autores, o comprimento da uretra e as secreções prostáticas bactericidas nos caninos machos diminuem a colonização e ascensão de

bactérias da uretra proximal e média para a bexiga (GINN et al., 2007; NELSON e COUTO, 2010).

Tal hipótese é sustentada pelo fato do agente bacteriano envolvido ser do gênero *Staphylococcus spp*, constituinte da microbiota normal do trato genital inferior e que em situações de baixa resistência imunológica e/ou devido a alterações do micro ambiente local, pode facilmente ascender pela uretra de menor comprimento e desprovida de mecanismos de proteção, colonizando a urina e determinando quadros patológicos (AVILA, 2008). Os animais do presente estudo não apresentaram alterações condizentes com baixa resistência imunológica.

De fato, Kropp et al. (1996), avaliando 19 cães machos submetidos a cistoplastia utilizando a SIS acelular, não verificaram cistite em nenhum dos animais durante um a 15 meses de pós-operatório.

Os animais do GT, entretanto, apesar de fêmeas e castradas, também não apresentaram cistite durante o período de avaliação.

O estresse cirúrgico também poderia justificar a elevada ocorrência de cistite, uma vez que altas concentrações de cortisol endógeno levariam a uma diminuição do efeito quimiotático de leucócitos para o lúmen vesical, deixando a urina e bexiga vulneráveis (Bailiff et al., 2008). Segundo de Langue et al. (2004), altas concentrações de cortisol endógeno em gatos com hipertireoidismo resultaram em maior ocorrência de infecção do trato urinário. O mesmo foi verificado por Torres et al. (2005), avaliando a associação entre infecção do trato urinário e a administração de glicocorticóides por tempo prolongado em 127 cães com afecções pruriginosas.

Ainda com relação ao procedimento cirúrgico, Nelson e Couto (2010) afirmam que lesões extensas da mucosa vesical envolvendo os vasos intramurais poderiam resultar em infecção do trato urinário pela redução do influxo de leucócitos e outros

fatores antimicrobianos para o lúmen da bexiga. No presente estudo, entretanto, os grandes vasos intramurais foram preservados durante a cistoplastia.

Adicionalmente, as baixas densidades urinárias poderiam predispor a infecção do trato urinário devido à diminuição da concentração de substâncias com propriedades bacteriostáticas, presentes normalmente na urina concentrada (BAILIFF et al., 2008). Todos os animais do GC com baixa densidade urinária apresentaram cistite em algum momento do período de avaliação. Os animais do GT com baixa densidade urinária, entretanto, não apresentaram cistite no mesmo período.

Os animais do GC com cistite apresentaram ainda cristalúria no período pós-operatório. Segundo Zhang et al. (2006), os resquícios da SIS poderiam atuar como núcleos para a agregação de cristais dissolvidos na urina e formação de urólitos que, por sua vez, poderiam predispor o desenvolvimento de infecção do trato urinário (BARTGES e LANE, 2003). Bailiff et al. (2008), avaliando gatos com doença renal crônica, verificaram uma forte associação entre urolitíase e a presença de infecção bacteriana do trato urinário.

Os animais do GT, entretanto, apresentaram cristalúria sem a presença concomitante de cistite e/ou urolitíase. Isso se deve ao fato da cristalúria ocorrer com frequência mesmo em animais normais, sendo o número de cristais dependente da concentração da urina e de seu pH. Além disso, os sais em solução normalmente precipitam conforme a urina coletada esfria e particularmente quando é refrigerada (BUSH, 2004).

A cristalúria isolada, portanto, não seria a causa primária da cistite verificada nos animais do GC, sendo apenas um fator promotor atrelado à utilização da membrana acelular, além de uma consequência à alteração do pH urinário secundário a presença de bactérias.

Ainda quanto às anormalidades verificadas ao exame de urina tipo I, o aumento da concentração protéica urinária pode ser justificado pela hematúria e/ou inflamação do trato urinário. Segundo Bush (2004) e Grauer (2007), inflamação, especialmente quando associada à infecção ou hematúria originária de qualquer porção do trato urinário podem resultar em proteinúria. Não foram verificadas outras causas potenciais, como lesão renal, hemoglobinemia, hiperproteinemia ou mioglobinemia.

Dessa forma, por exclusão, pode-se sugerir que os animais do GT não apresentaram cistite quando comparados aos do GC em razão da utilização das CMLH sobre a SIS, pois essas possivelmente impediram a incrustação da membrana por cristais e debris celulares, dissolvidos em maior quantidade na urina pelo próprio trauma cirúrgico (ATALA, 2000). Adicionalmente, a SIS semeada com CMLH resultou, conforme será discutido mais adiante, em maior deposição de fibras musculares em detrimento à fibras colágenas. Dessa forma, acredita-se que a maior quantidade de fibras colágenas nas bexigas neoformadas com a SIS acelular resultaria em menor capacidade contrátil das mesmas, resultando consequentemente em maior quantidade de urina residual (YOO et al., 1998).

Portanto, a presença de cristais depositados sobre a SIS acelular e a maior quantidade de urina residual, somados à conformação anatômica da uretra e à diminuição de fatores bacteriostáticos, poderiam ter predisposto a infecção do trato urinário nos animais do GC.

### **6.3. Avaliação ultrassonográfica abdominal**

Assim como relatado na Medicina por Hertzberg et al. (1987), o qual avaliou 47 pacientes submetidos à enterocistoplastia, o exame ultrassonográfico abdominal,

realizado aos 30 e 60 dias de pós-operatório, permitiu a detecção de alterações decorrentes do processo de reparação tecidual da bexiga e do procedimento cirúrgico.

Quanto às alterações visibilizadas, os animais dos grupos Controle e Tratado apresentaram áreas de irregularidades e espessamento da parede vesical ao redor da membrana implantada no M30. Acredita-se que tais alterações sejam decorrentes da resposta inflamatória associada ao processo de reparação tecidual, bem como da presença de cistite (animais do GC). De acordo com Finn-Bodner (1995), cães com cistite ou outras condições inflamatórias da bexiga podem apresentar irregularidades e espessamento focal ou difuso da parede vesical, cuja aparência retornaria ao normal tão logo a inflamação fosse interrompida.

Teixeira et al. (2007), avaliando a viabilidade do alo-transplante de bexiga em cães, também relataram a ocorrência de espessamento e maior ecogenicidade da parede vesical aos 30 dias de pós-operatório. Os autores, entretanto, não descrevem a ocorrência de cistite, apesar dos animais terem sido submetidos à terapia imunossupressora com ciclosporina.

No M60, a parede vesical dos animais de ambos os grupos continuava espessada, sendo seu valor, porém, reduzido e mais próximo do normal. Tal fato corrobora com a manutenção da resposta inflamatória de menor intensidade nesse momento da avaliação. Acredita-se, portanto, que a parede vesical tenderia à normalidade caso o tempo de avaliação pós-operatória fosse prolongado.

Probst et al. (2000), avaliando sete cães submetidos a cistoplastia com matriz extracelular homóloga da bexiga, relataram o retorno à normalidade da espessura da parede vesical depois de sete meses da intervenção cirúrgica. Segundo os mesmos, após esse período, a parede da bexiga apresentou aspecto morfológico similar ao verificado no exame ultrassonográfico pré-operatório.

Concomitantemente às áreas irregulares e de espessamento, foi visibilizado aos 30 dias de pós-operatório, em um animal do GC, uma estrutura hipoeecogênica e cística aderida à membrana, compatível com pseudomassa. Tal estrutura poderia ser um coágulo decorrente do acúmulo de sangue pela cistite, já que não foi possível visibilizá-la novamente aos 60 dias de pós-operatório. A aparência ultrassonográfica dos coágulos depende do seu tamanho e cronicidade, mas em geral os aderidos à parede vesical possuem aspecto interno rendilhado, similar a tecido (FINN-BODNER, 1995). Pólipos murais, abscessos ou neoplasias são considerados diagnósticos diferenciais, porém, nesses casos a evolução tenderia a ser progressiva (HERTZBERG et al., 1987; FINN-BODNER, 1995). Além disso, essas estruturas normalmente apresentam vascularização, passível de identificação pelo eco-doppler, fato não observado no presente estudo.

Adicionalmente, quatro animais do GC apresentaram sedimento urinário aos 30 dias de pós-operatório, caracterizado por pontos ecogênicos flutuantes no interior da bexiga. Segundo Green (1996), pequenos pontos ecogênicos são visibilizados em pacientes com cistite bacteriana aguda devido à presença de sangue, pus e/ou debris celulares na urina. Hertzberg et al. (1987) também relataram a ocorrência de sedimento urinário em pacientes sem infecção do trato urinário, secundária a hematúria exacerbada ou a presença de muco.

Assim sendo, o exame ultrassonográfico abdominal, associado às alterações clínicas e laboratoriais, possibilitou o diagnóstico de cistite bacteriana nos animais do GC no M30.

Entretanto, a presença de sedimento urinário foi verificada também aos 60 dias de pós-operatório em dois animais do GC sem alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com cistite ou hematúria. Acredita-se que nesses casos outra condição,

como urolitíase, estivesse relacionada com a manutenção do processo inflamatório e consequentemente a visibilização de sedimento urinário. De fato, em três animais do GC foram visibilizados urólitos, enquanto que nenhum do GT apresentou a alteração.

Zhang et al. (2006) avaliando a implantação da SIS na reparação da bexiga de cães submetidos à cistectomia subtotal, também não relataram a presença concomitante de urolitíase e infecção do trato urinário, atribuindo a ocorrência da primeira à incompleta reabsorção do enxerto. Segundo os autores, os resquícios da SIS atuariam como ninhos para a agregação de cristais e formação de urólitos. Os urólitos por sua vez levariam a irritação e lesão da parede vesical e perpetuação da inflamação (NELSON e COUTO, 2010).

Dessa maneira, sugere-se que não foram visibilizados sedimento urinário e urolitíase ao exame ultrassonográfico dos animais do GT devido a um possível efeito protetor das células semeadas sobre a membrana. As células formariam uma barreira protetora impedindo que os cristais dissolvidos na urina possam se precipitar entre as fibras colágenas da membrana (ATALA, 2000; ZHANG et al., 2006).

Por fim, em um animal do GC foi visibilizada compartimentalização no M60. Acredita-se que isso se deva à incompleta e deficiente reabsorção da membrana, a qual estava projetada em direção ao lúmen vesical. Hertzberg et al. (1987) referem a ocorrência de compartimentalização devido a formação de aderência em um paciente submetido a múltiplas cirurgias e com infecção recorrente do trato urinário. O animal em questão, no entanto, foi submetido a um único procedimento e apesar de ter tido cistite bacteriana, a infecção foi debelada sem complicações após instituída terapia clínica adequada.

Probst et al. (2000), contudo, não verificou alterações no formato da bexiga após sete meses da implantação da SIS acelular, o que salienta a possibilidade de

transitoriedade para a alteração verificada no presente estudo. Ainda de acordo com Hertzberg et al. (1987), essa alteração ultrassonográfica deve ser cuidadosamente avaliada em diferentes planos, pois projeções da parede vesical são comuns devido à compressão intestinal.

Apesar de muitos autores indicarem a realização de uretrocistografia para melhor avaliação do formato da bexiga, essa não foi realizada nesse caso e nos demais animais do estudo devido à possibilidade de ocorrência de cistite estéril pela própria presença do contraste iodado (BIRCHARD, SHERDING, 2006), o que poderia resultar em um micro-ambiente inflamatório que possivelmente interferiria com o processo de reparação tecidual. Além disso, pretendeu-se diminuir a possibilidade de contaminação da urina/ membrana implantada com agentes microbianos externos durante a sondagem vesical para infusão do contraste.

Assim, corroborando ao descrito por Gallatti e Iwasaki (2004), o exame ultrassonográfico abdominal mostrou-se útil na identificação das alterações supramencionadas; permite avaliar o formato, localização e anatomia interna da bexiga, além de detectar com maior frequência urólitos e espessamento de parede. O pronto reconhecimento dessas alterações é de suma importância para que sejam suprimidos erros na interpretação diagnóstica e consequentemente no estabelecimento do prognóstico de pacientes sabidamente ou não submetidos à cistoplastia (HERTZBERG et al., 1987).

#### **6.4. Avaliação macroscópica e análise da composição dos urólitos**

A lesão da bexiga foi reparada satisfatoriamente e a membrana incorporada em ambos os grupos avaliados, não sendo possível identificar macroscopicamente os

limites do tecido neoformado. Abraham et al. (2000), avaliando a SIS na reparação de defeitos abdominais em coelhos, também relataram boa incorporação dessa pelo tecido original adjacente. De acordo com Kim et al. (2008), é esperado que a SIS integre-se com o tecido ao seu redor devido a existência de proteínas estruturais e outras moléculas sinalizadoras similares às aquelas existentes no tecido nativo.

Dessa forma, foi importante a colocação de suturas com fio de náilon próximo às margens da membrana. Kropp et al. (1996) e Zhang et al. (2006), avaliando a incorporação da SIS em cães submetidos à cistoplastia, também descrevem a utilização de suturas previamente colocadas para o auxílio na identificação do tecido de reparação formado após a implantação do enxerto.

Adicionalmente, o epíplon/gordura periuretral aderiram-se à face externa da bexiga em alguns animais deste estudo, mesmo não sendo realizada manobra de aproximação e/ou fixação. Em analogia ao descrito por Law et al. (1988), avaliando a adesão do epíplon em materiais prostéticos, tal fato seria atribuído à reparação lenta da membrana e ausência de túnica serosa.

A aderência do epíplon à bexiga, entretanto, é benéfica e pode interferir no processo de reparação. Segundo Know et al. (2008), avaliando a reparação da bexiga de cães com membrana de ácido poliglicólico acelular e com células autólogas, o epíplon pode promover maior aporte vascular ao enxerto. Além disso, o epíplon possui agregados de células inflamatórias, importantes nos processos de defesa peritoneal e que acelerariam o processo de degradação do enxerto (KIRBY, 2003).

Assim, apesar de inicialmente indesejado a aderência do epíplon à bexiga a fim de não interferir nos resultados do experimento, sua ocorrência pode ter contribuído satisfatoriamente para os resultados encontrados em ambos os grupos do presente estudo.

Apesar da boa qualidade do tecido de reparação na face externa da bexiga, a face intraluminal dos animais do GC foi caracterizada por vezes pela presença de tecido de reparação opaco, irregular, erodido e/ou com urólitos aderidos à sua superfície. Tais achados também foram verificados por Zhang et al. (2006), avaliando a SIS acelular *versus* semeada com células autólogas na reparação da bexiga de cães submetidos a exérese de aproximadamente 90% do tecido vesical. Entretanto, em estudos similares, avaliando a SIS acelular na reparação da bexiga de cães submetidos à exérese de 35% a 70% da parede vesical, não foram verificadas essas alterações macroscópicas (KROPP et al., 1996; KROPP e CHENG, 2000; KNOW et al., 2008).

No que se refere à diferença relatada pelos autores, acredita-se que a extensão e localização da porção removida da bexiga poderiam estar relacionadas (O'SULLIVAN e BARRETT, 1993). Zhang et al. (2006) inferem que a pequena quantidade de tecido remanescente após cistectomia subtotal pode ter contribuído para a qualidade inadequada do tecido de reparação, não observável no estudos nos quais a porção removida da bexiga foi menor (KROPP et al., 1996; KROPP e CHENG, 2000; KNOW et al., 2008). Ainda de acordo com Zhang et al. (2006), a má qualidade do tecido de reparação pode ser decorrente da ausência de apoio estrutural adequado para evitar o colapso do enxerto.

Associado a isso, Zhang et al. (2006) atribuem a incorporação deficiente do enxerto à inabilidade do mesmo em promover adequado aporte vascular e consequentemente a manutenção da viabilidade das células transplantadas e nativas. De fato, Know et al. (2008) não relatam a ocorrência de sinais de necrose e isquemia à avaliação macroscópica de bexigas cujo tecido de reparação foi considerado de boa qualidade e sem alterações.

Neste estudo, contudo, não foram removidas quantidades excessivas da parede

vesical ou visualizadas macroscopicamente áreas de necrose. Além disso, conforme abordado a seguir, foi observada à histologia, pela técnica de H/E, grande quantidade de vasos no tecido neoformado, bem como ausência de sinais de isquemia e necrose.

Dessa forma, acredita-se que a ausência de aporte vascular adequado não esteja relacionada aos resultados verificados neste estudo, em especial à avaliação macroscópica do tecido de reparação dos animais do GC.

Adicionalmente, Zhang et al. (2006) e mais recentemente Liu et al. (2009) descrevem que a alta porosidade da SIS possibilitaria a adesão de células, incluindo células endoteliais, resultando consequentemente na formação de neovasos. Segundo Ali e Mooney (2007), materiais com macroporos em sua estrutura possibilitam maior penetração celular e favorecem o contato célula-célula, necessários para a reparação tecidual.

A qualidade inferior do tecido de reparação nos animais do GC, em comparação aos do GT, portanto, poderia estar relacionada ao leito desnudo da SIS que predisporia a precipitação e agregação de sais dissolvidos na urina. A presença desses sais, conforme já discutido, resultaria em maior processo inflamatório e formação de urólitos (ATALA, 2000). Segundo Know et al. (2008), o processo inflamatório resultaria em maior influxo de fibroblastos e na deposição de tecido colagenoso com consequente formação de tecido de reparação de qualidade inferior e extensas áreas de fibrose.

A hipótese supramencionada é ainda reforçada pela identificação de diversos materiais na composição dos urólitos provenientes de dois animais do GC. Sugerindo que tais materiais possam ser resquícios da membrana que teriam atuado como ninhos durante a formação dos urólitos. Zhang et al. (2006) também verificaram a presença de fibras colágenas na composição dos urólitos encontrados nos animais submetidos a cistectomia seguida de reparação com a SIS celular.

Os demais urólitos obtidos no presente estudo foram constituídos de oxalato de cálcio e estruvita. Os urólitos de cálcio são comumente associados à hipercalcúria secundária a lesão renal, hiperparatireoidismo e linfoma, ou ao aumento da ingestão de oxalato dietético por dieta rica em vegetais. Já os urólitos de estruvita ocorrem principalmente em fêmeas e estão comumente associados à infecção do trato urinário (GINN et al., 2007; NELSON e COUTO, 2010).

Quanto à formação dos urólitos de oxalato de cálcio, os animais do presente estudo não possuíam alterações compatíveis com as afecções descritas acima, não sendo identificada, contudo, um fator desencadeador para o seu desenvolvimento. O animal com urólito de estruvita apresentou cistite durante o período de avaliação.

#### **6.5. Análise histopatológica descritiva e do processo inflamatório**

As irregularidades macroscópicas da superfície intraluminal da bexiga, especialmente das amostras provenientes dos animais do GC, foram caracterizadas à histologia como áreas de desnudamento focal ou difuso do urotélio.

Kwon et al. (2008), entretanto, verificaram a presença de revestimento urotelial normal seis meses após cistoplastia utilizando enxerto biodegradável omentalizado em cães. O mesmo foi observado por outros autores em estudos avaliando o tecido neoformado à histologia após 10 semanas a 15 meses da cistectomia e reparação com enxerto acelular ou celular (KROPP et al., 1996; ZHANG et al., 2005). Acredita-se, portanto, que o maior intervalo entre a cirurgia e a avaliação histológica poderia justificar a divergência dos resultados.

Durante a reparação tecidual da bexiga, as células uroteliais migram das adjacências do tecido original para as áreas centrais do enxerto. Esse processo ocorre

em duas a quatro semanas após a cistoplastia e é caracterizado inicialmente pela formação de uma única camada de células que posteriormente diferenciam-se, tornando o urotélio neoformado indistinguível do original (KROPP e CHENG, 2000). Assim, as áreas de desnudamento do urotélio seriam regiões ainda não repovoadas pelas células nativas, muito provavelmente não estariam presentes caso a avaliação histológica fosse realizada em momentos posteriores.

Nesse contexto, ressalta-se que os animais do GT apresentaram menor quantidade de falhas de revestimento urotelial quando comparados aos animais do GC devido ao fato das células musculares serem importantes para a manutenção da integridade estrutural e organização celular do enxerto (ATALA, 2000; EBERLI et al., 2009). De acordo com Atala (2000), enxertos que não são semeados com células musculares apresentam falha de reepitelização, pois apesar do epitélio possuir uma alta capacidade regenerativa, as células musculares por mecanismos ainda não conhecidos modulam a proliferação celular.

Simultaneamente às falhas de revestimento, foram visualizadas determinadas áreas compatíveis com hiperplasia urotelial típica, representadas por células hiperplásicas por vezes vacuolizadas e ninhos de Brunn (MEULTEN, 2002). Tais achados também foram descritos por Eberli et al. (2009), avaliando a reparação da bexiga de ratos com ácido poliglicólico semeado com células uroepiteliais e musculares. De acordo com os autores, foi verificada à histologia, após quatro semanas da cistoplastia, áreas de hiperplasia, caracterizadas pela presença de várias camadas de células uroepiteliais.

Segundo Jones et al. (2000), a hiperplasia é o aumento absoluto do número de células, em resposta a demandas funcionais ou outros estímulos, como inflamação crônica. O urotélio é especialmente sensível a esses estímulos e pode proliferar não

apenas em direção ao lúmen, mas também para baixo, resultando em grupos de células hiperplásicas, isoladas na submucosa e conhecidas como ninhos de Brunn (GINN et al., 2007).

Salienta-se que os animais do GC apresentaram áreas de hiperplasia urotelial mais proeminentes que os animais do GT, sobretudo se consideradas as amostras das regiões de transição, provavelmente pelo fato das células uroepiteliais destas estarem submetidas ainda a estímulos para repovoar o leito do enxerto desnudo. Além disso, as células musculares, conforme mencionado anteriormente, podem ter contribuído na organização das células uroepiteliais durante a migração da periferia ao centro do enxerto semeado, resultando conseqüentemente em um processo de reparação mais avançado.

Ainda com relação à avaliação histológica, foram observados em ambos os grupos, tanto nas amostras centrais quanto nas de transição, grande quantidade de capilares sanguíneos e focos de hemorragia aguda. Abraham et al. (2000) e Liu et al. (2009) também relataram a presença de pequenos vasos, partindo da periferia da lesão em direção ao centro da membrana após um mês da sua implantação. Os vasos recém-formados da membrana, entretanto, apresentariam imperfeições diminutas, o que associado ao processo inflamatório, ocasionaria a transudação de líquido e liberação de hemácias (JONES et al., 2000). Em ambos os grupos deste estudo, foram observadas inflamação aguda e/ou crônica.

A inflamação aguda, verificada em ambos os grupos, caracteriza-se dentre outras alterações pelo influxo predominantemente de células polimorfonucleares ao local da lesão. Tais células são particularmente importantes na defesa do hospedeiro contra infecções bacterianas e fúngicas, bem como na fase inicial do processo inflamatório em afecções não infecciosas (RINGLER, 1997). De fato, em dois animais do GC foram

verificadas estruturas bacterianas aderidas ao urotélio de morfologia cocóide e coloração Gram positiva.

Nos demais cães, entretanto, o processo inflamatório é atribuído à segunda situação mencionada, uma vez que foi visualizado discreto a moderado infiltrado de células polimorfonucleares. Tal infiltrado estava constituído basicamente por células participantes do processo de reparação tecidual, ainda não completamente concluído no momento da avaliação histológica (BADYLAK, 2004). De acordo com Hosgood (2007), as células polimorfonucleares são as primeiras a migrarem para a ferida cirúrgica logo após a lesão. Essas células são responsáveis pela liberação de radicais superóxido que degradam macromoléculas da matriz extracelular desnaturada e células danificadas.

Em cirurgias convencionais da bexiga, a reparação ocorre por volta de 14 a 21 dias (WALDRON, 2003). Após esse período, o influxo de células polimorfonucleares tenderia a diminuir gradativamente até a quantidade mínima residual de células inflamatórias, normalmente encontrada no tecido vesical (RINGLER, 1997; HOSGOOD, 2007). Neste estudo, contudo, a extensão da lesão pode ter contribuído para o prolongamento da fase de reparação tecidual e consequentemente a manutenção do processo inflamatório.

De forma similar, os resquícios da membrana presentes em ambos os grupos, também devem ter contribuído para a perpetuação do processo inflamatório, visto ser os neutrófilos os responsáveis pela liberação de citocinas quimiotáticas que promovem o recrutamento de monócitos circulantes para a ferida cirúrgica (RINGLER, 1997; HOSGOOD, 2007). Os monócitos, ao penetrarem a ferida tornam-se macrófagos que por sua vez participariam ativamente no processo de fagocitose dos resquícios da membrana, conforme visualizado no presente estudo.

Acredita-se, portanto, que a quantidade de polimorfonucleares tenderia a valores normais após a fase inicial de acomodação da SIS e caso a avaliação histológica fosse realizada em momentos posteriores.

Adicionalmente, os resquícios da membrana também estariam relacionados à presença de inflamação crônica, verificada em ambos os grupos deste estudo. A inflamação crônica caracteriza-se dentre outras alterações pelo influxo predominantemente de células mononucleares ao local da lesão, em particular os monócitos e linfócitos (RINGLER, 1997; HOSGOOD, 2007).

Conforme descrito, os monócitos no tecido se diferenciam em macrófagos, os quais participam do processo de fagocitose, removendo materiais ou organismos exógenos, restos teciduais necróticos e células senis (RINGLER, 1997; ALI e MOONEY, 2007). A identificação de macrófagos no estudo, fagocitando por vezes resquícios da membrana, é condizente com o processo de degradação da SIS. Segundo Ali e Mooney (2007), a reação do tipo corpo estranho é iniciada por meio do reconhecimento pelo sistema imunológico de proteínas desnaturadas solúveis ou provenientes do próprio sangue, seguido do influxo de plaquetas e macrófagos que se aderem à superfície do enxerto. As proteínas da SIS, entretanto, não são passíveis de deflagrarem a reação por si só. Isso ocorre porque as fibras colágenas da SIS não se difundem livremente. Ao contrário, são as proteínas solúveis ou sanguíneas que são absorvidas pela SIS, tornando-a bioativada (ALI e MOONEY, 2007).

Além disso, a SIS não deflagraria por si só a atenção dos macrófagos devido ao processo de descelularização que garante a destruição dos componentes nucleares e produtos da membrana plasmática existentes na submucosa intestinal suína *in natura*, potencialmente imunogênicos por serem de origem heteróloga (DAVIS et al., 2010).

As células fagocíticas, portanto, reconheceriam a SIS após serem recrutadas por

meio de diferentes estímulos, participando apenas do processo de acomodação e não de rejeição (BADYLAK, 2004; DAVIS et al., 2010). Segundo estudos, outras células inflamatórias estariam mais intimamente relacionadas aos mecanismos de rejeição imunológica do que os macrófagos, conforme previamente mencionado, como é o caso dos linfócitos (BADYLAK, 2004; ALI e MOONEY, 2007; PLATT, 2007; DAVIS et al., 2010).

Adicionalmente, muito além da função de fagocitose do material exógeno, os macrófagos liberam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que promovem a migração e ativação de outras células, como linfócitos e fibroblastos, bem como estimulam o crescimento de novos vasos (RINGLER, 1997; HOSGOOD, 2007; ALI e MOONEY, 2007). Os fibroblastos por sua vez são especialmente importantes para o processo de reparação tecidual, pois sintetizam colágeno, componente fundamental do tecido cicatricial (RINGLER, 1997; HOSGOOD, 2007).

De acordo com Atala (2000), enxertos desnudos possuem maior quantidade de tecido colagenoso em resposta ao contato prolongado com a urina, e conseqüentemente maior reação inflamatória. Know et al. (2008), avaliando polímeros sintéticos biodegradáveis na reconstrução de bexiga em cães, também verificaram que os enxertos acelulares induziram acentuada reação do tipo corpo estranho quando comparados aos implantados com células.

De fato, os animais do GC apresentaram maior quantidade de tecido colagenoso em relação aos animais do GT. No entanto, os animais do GT, apesar de não apresentarem acentuada deposição de colágeno, apresentaram maior quantidade de macrófagos nas amostras centrais. Isso pode ser relacionado à característica de sobrevivência por períodos relativamente prolongados dos macrófagos, apresentando reciclagem de uma a duas semanas (RINGLER, 1997). Segundo Record et al. (2001), a

degradação e eliminação da SIS inicia-se após 28 dias da sua implantação e pode perdurar por até 90 a 120 dias.

Os macrófagos na região central dos animais dos animais do GT, portanto, estariam a mais tempo degradando a membrana, visto os resquícios da SIS serem identificados em menor quantidade na comparação aos do GC. A presença das células musculares implantadas poderia inclusive ter contribuído de alguma maneira com a organização do leito central do enxerto, facilitando a migração dos macrófagos para a área.

Frente ao exposto, não foram observados indícios da associação das CMLH com o maior influxo de macrófagos para o leito central do enxerto celular, pois assim como previamente mencionado, não são esses os principais envolvidos com os mecanismos de rejeição imunológica. Adicionalmente não foram verificadas células musculares em meio a reações granulomatosas e/ou sendo fagocitadas por macrófagos.

Em se tratando de rejeição imunológica, a rejeição aguda é a mais importante e afeta enxertos acelulares e celulares (PLATT, 2007). Ainda segundo Platt (2007), a rejeição aguda é desencadeada pelo reconhecimento de proteínas exógenas do enxerto e/ou antígenos celulares, e promovida pela ativação de vias imunológicas específicas.

De acordo com diversos estudos, a via imunológica do linfócito T-helper tipo 1 (Th1) é a responsável pelos mecanismos de rejeição aguda. A ativação dessa via resulta na produção de citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), interferon gamma (IFN) e fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ), que estimulam o sistema complemento e a diferenciação das células CD8<sup>+</sup> em um fenótipo citotóxico (ABBAS et al., 1996; PLATT, 2007; DAVIS et al., 2010).

Contudo, a rejeição aguda parece ter um impacto limitado na utilização de determinados enxertos biodegradáveis acelulares ou celulares, como a SIS e outras

matrizes colágenas (PLATT, 2007; DAVIS et al., 2010). Isso se deve, principalmente pela natureza avascular desses materiais e ao fato dos vasos sanguíneos neoformados sobre o enxerto serem constituídos por células do próprio indivíduo (CARVALHO e PLATT, 2001; DAVIS et al., 2010).

Dessa forma, os anticorpos do indivíduo transplantado – específicos para antígenos presentes no enxerto e nas células semeadas sobre esse – não se ligariam ao endotélio vascular, evitando a ativação do sistema complemento e outras vias imunológicas, e consequentemente uma rejeição hiperaguda ou aguda (CARVALHO e PLATT, 2001; ALI e MOONEY, 2007; PLATT, 2007).

Tal observação também foi descrita por Iamaguti et al. (2010), avaliando condrócitos homólogos no reparo de lesões osteocondrais em cães. Segundo os autores, apesar da forte expressão antigênica dos condrócitos homólogos, as lesões osteocondrais seriam sítios imunoprivilegiados e menos passíveis de rejeição, uma vez que o tecido cartilaginoso é avascular (HEDGER, 2007).

Portanto, a neovascularização da SIS a partir da migração das células do próprio indivíduo, oriundas do tecido nativo da bexiga, deve ter contribuído para a ausência de rejeição hiperaguda ou aguda neste estudo.

Já os mecanismos que envolvem a rejeição crônica são um pouco mais complexos e envolvem mecanismos imunológicos e não imunológicos que diferem de acordo com o tipo e o local do enxerto. O termo rejeição crônica é empregado quando a função do enxerto se deteriora, existindo evidências histológicas de hipertrofia e fibrose (PLATT, 2007). A etiologia da rejeição crônica, no entanto, não é bem elucidada, mas também está relacionada com os linfócitos T e suas vias imunológicas (KAUFMAN et al., 1990; PLATT, 2007).

No presente estudo, portanto, apesar do potencial imunogênico das SIS e CMLH, não foram evidenciados sinais clínicos, laboratoriais ou histológicos compatíveis com rejeição hiperaguda, aguda ou crônica. Ressalta-se também que na maioria dos animais dos grupos Controle e Tratado, o infiltrado inflamatório foi caracterizado por discreta a moderada quantidade de células mononucleares, e não se evidenciaram sinais de isquemia ou necrose.

O real papel das células inflamatórias, entretanto, merece especial atenção no entendimento dos mecanismos de reparação tecidual da bexiga e de acomodação imunológica da SIS acelular e semeada com CMLH. Nesse sentido, faz-se oportuno a imunofenotipagem das células inflamatórias, particularmente dos linfócitos, a qual será realizada em um momento seguinte.

#### **6.6. Análise descritiva e quantitativa das fibras colágenas e musculares**

Os animais do GT apresentaram estratificação típica da túnica muscular com maior frequência quando comparados aos do GC, tanto nas regiões centrais quanto nas de transição. Tal achado histológico foi caracterizado pela presença de feixes musculares mais pronunciados e organizados no GT, em oposição aos pequenos e esparsos feixes musculares entremeados a grande quantidade de tecido colagenoso no GC.

O mesmo foi verificado por Yoo et al. (1998), avaliando a submucosa alogênica da bexiga acelular *versus* semeada com células uroepiteliais e musculares na reparação

vesical em cães. Segundo os mesmos, a túnica muscular foi mais proeminente no enxerto celular.

Zhang et al. (2005), avaliando a reparação da bexiga com a SIS acelular (grupo 1) *versus* semeada ora com células uroepiteliais e musculares (grupo 2) ora com células estromais da medula óssea (grupo 3), ainda destacam a proliferação de células musculares com a formação de feixes organizados apenas nas adjacências do enxerto em ambos os grupos celulares.

De modo similar, as regiões de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado, neste estudo, apresentaram maior quantidade de tecido muscular quando comparadas às regiões centrais. Segundo Kropp e Cheng (2000), tal observação é esperada pelo fato das células musculares lisas vesicais migrarem em direção ao centro do enxerto a partir do tecido nativo da bexiga, localizado adjacente às margens do mesmo. Somente ao redor de duas semanas após a sua implantação, é que as células musculares começariam a se multiplicar e organizar em feixes densos e paralelos à superfície mucosa.

Zhang et al. (2006), avaliando a SIS acelular e celular na reparação de bexigas em cães após cistectomia subtotal, também verificaram estratificação típica da túnica muscular no grupo celular. De acordo com os autores, os resultados insatisfatórios do grupo acelular são decorrentes da revascularização deficiente do enxerto e inflamação aguda. Ainda segundo os autores, as células inflamatórias seriam responsáveis pela liberação de citocinas e outras moléculas bioativas que determinariam maior deposição de fibras colágenas, dificultando o repovoamento do enxerto pelas células musculares (ALI e MOONEY, 2007).

A resposta inflamatória exacerbada pode ainda acelerar a degradação do biomaterial implantado, dificultando a adesão das células e reconstrução tecidual, e

consequentemente resultando na sua contratura (CHAIKOF, 1999; ALI e MOONEY, 2007). Além disso, as citocinas liberadas pelas células inflamatórias podem afetar a diferenciação e o metabolismo celular, incluindo das células musculares, bem como inibir a capacidade dos biomateriais de atuarem ativamente em determinados tipos celulares. Vale lembrar que esses biomateriais assim como a SIS possuem inúmeras proteínas estruturais que atuam no processo de migração e adesão celular que, no caso de uma inflamação exacerbada, perderiam a sua função.

Segundo Atala (2000), a reação inflamatória é mais agressiva em matrizes extracelulares desprovidas de revestimento celular devido ao contato direto da matriz com a urina. Dessa forma, a cobertura celular adequada atuaria impermeabilizando o enxerto e assim limitando os efeitos tóxicos da urina, diminuindo consequentemente a resposta inflamatória (ATALA, 2000; ZHANG et al., 2005). De acordo com Zhang et al. (2005), tal função protetora é atribuída apenas às células implantadas na face intraluminal do enxerto.

No presente estudo, entretanto, as CMLH da bexiga foram semeadas na face extraluminal do enxerto, fato que corroboraria com a hipótese de que as células musculares participam do processo de organização e migração de outras células, como as células uroepiteliais. Acredita-se, portanto, que as células musculares, mesmo semeadas sobre a face extraluminal, tenham contribuído para a formação de um adequado revestimento urotelial que por sua vez atuou como barreira impermeável à urina. De fato, conforme constatado à avaliação histológica, os animais do GT apresentaram mais frequentemente revestimento urotelial completo quando comparados aos do GC.

De modo complementar, o processo inflamatório pode justificar a intensa deposição de tecido colagenoso, em particular nas regiões centrais dos animais do GC.

Know et al. (2008), avaliando a reparação da bexiga com enxerto de ácido poliglicólico acelular e celular, também descrevem maior quantidade de tecido colagenoso nos animais do grupo acelular frente aos do grupo celular. Segundo os mesmos, as porcentagens médias dos pixels do histograma referente ao colágeno nas bexigas normais e nos grupos celular e acelular foram respectivamente,  $37,8\% \pm 2,4\%$ ;  $45,3\% \pm 6,5\%$ ; e  $70,9\% \pm 4,8\%$ .

Kropp et al. (1996), avaliando apenas a SIS acelular na reparação da bexiga e comparando-a com bexigas normais, também descrevem resultados semelhantes. Segundo os autores, a quantidade de tecido colagenoso foi de  $62\% \pm 4\%$  para as amostras do grupo acelular e  $41\% \pm 4\%$  para as de bexiga normal.

Os resultados apresentados estão de acordo com os descrito nas regiões centrais do presente estudo. Os autores do trabalho supramencionados, no entanto, não fazem distinção entre as regiões centrais e periféricas do enxerto.

Adicionalmente, a quantidade de tecido colagenoso na a região central dos animais do GC, neste estudo, tanto é maior que não foi possível a comparação da espessura média da túnica muscular com as amostras provenientes dos animais do GT. Sendo assim, a análise da espessura média, entre os grupos, foi realizada apenas nas regiões periféricas e revelou em consoante aos demais achados, maior espessura da túnica muscular no GT.

Os resultados verificados no presente estudo, por fim, diferem dos relatados por O'sullivan e Barrett (1993) de que enxertos semeados com células musculares, apesar de teoricamente exequíveis, não apresentam resultados satisfatórios nos estudos *in vivo*. De acordo com os autores, isso estaria atrelado a condições desfavoráveis *in vitro*, bem como suporte nutricional inadequado durante a fase de incorporação do enxerto pelo tecido nativo. Complicações dessa ordem, contudo, não foram verificadas neste estudo e

de modo contrário, a implantação das CMLH interferiu positivamente nos resultados *in vivo* obtidos.

## 7. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos, nas condições experimentais do presente estudo, permite concluir que:

- O método de cultivo das células musculares lisas da bexiga é exequível, bem como sua semeadura sobre a SIS.
- As respostas clínica e laboratorial são similares em ambos os tratamentos instituídos.
- Na avaliação ultrassonográfica abdominal, a presença de sedimento urinário é superior nos animais tratados com a SIS acelular quando comparados aos tratados com a SIS semeada com células musculares lisas vesicais.
- Na macroscopia, a SIS apresenta adequada integração ao tecido vesical em ambos os grupos; entretanto, a presença de urólitos é superior no grupo sem implante celular quando comparado ao grupo com implante de células.
- Nos cães com implante de células musculares lisas vesicais, quando comparados aos com implante acelular, verifica-se arquitetura histológica típica na região da cistoplastia, caracterizada pela presença das túnicas melhor individualizadas e organizadas.
- A SIS associada ao implante de células musculares lisas homólogas promove processo de reparação tecidual com maior porcentagem de fibras musculares lisas em detrimento de fibras colágenas.
- O método de análise digital é eficaz na quantificação dos tecidos muscular e colagenoso da bexiga, bem como no estabelecimento da relação entre eles.
- O número de vasos, fibroblastos e de células inflamatórias não difere entre os grupos avaliados.

- A SIS acelular ou semeadas com células musculares lisas vesicais não induz alterações clínicas, laboratoriais ou histológicas compatíveis com rejeição hiperaguda, aguda e crônica.

## 8. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v. 383, n. 789, 1996.

ABÍLIO, E. J. *Ileocistoplastia em cães – estudo experimental*. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

ABRAHAM, G. A.; MURRAY, J.; BILLIAR, K.; SULLIVAN, S. J. Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 51, n. 3, p. 442-452, 2000.

ADER, P. L.; HOBSON, H. P. Hypospadias: a review of the veterinary literature and a report of three cases in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v. 14, p. 721-727, 1978.

AGUT, A.; FERNANDEZ DEL PALACIO, M. J.; LAREDO, F. G. et al. Unilateral agenesis associated with additional congenital abnormalities of the urinary tract in a Pekingese bitch. *J. Small Anim. Pract.*, v. 43, p. 32-35, 2002.

ALI, O. A.; MOONEY, D. J. Converging cell therapy with biomaterials. In: HALBERSTADT, C. R.; EMERICH, D. F., *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier, 2007, 591p.

---

<sup>1</sup> ABNT 2012

ALVEZ, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo em células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. R.; CASTILHO, L. R. *Tecnologia do Cultivo de Células Animais*, 1ª ed., Roca, 2009, 2p.

ANDRETTO, R.; GONZALES, J.; NETO, J. G.; MIRANDA, J. F.; ANTUNES, A. M. Experimental cystoplasty in dogs using preserved equine pericardium. *Ver. Ass. Med. Brasil.*, v. 27, n. 5, p. 153-154, 1981.

ASHKAR, L.; HELLER, E. The silastic bladder patch. *J. Urol.*, v.98, p. 679, 1967.

ATALA, A. Tissue engineering of artificial organs. *J. Endourol.*, v. 14, n. 1, p. 49-57, 2000.

ATALA, A.; BAUER, S. B.; SOKER, S.; YOO, J. J.; RETIK, A. B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.*, v. 367, p. 1241-1246, 2006.

AVILA, M.O.; Camargo, L. M.; BENETTI, A. H.; ALARCON, L. F. Microbiota da mucosa vaginal de fêmeas caninas clinicamente saudáveis atendidas no hospital veterinário da Universidade de Cuiabá, MT. *Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)*, Gramado, RS, 2008.

BADYLAK, S. F.; TULLIUS, R.; KOKINI, K.; SHELBOURNE, K. D.; KLOOTWYK, T.; VOYTIK, S. L.; KRAINE, M. R.; SIMMONS, C. The use of

xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achille's tendon repair in a dog model. *J. Biomed. Mat. Res.*, v. 29, p. 977-985, 1995.

BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 13, n. 5, p. 377-383, 2002.

BADYLAK, S. F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol.*, v. 12, p. 367-377, 2004.

BAILIFF, N. L.; WESTROPP, J. L.; NELSON, R. W.; SYKES, J. E.; OWENS, S. D.; KASS, P. H. Evaluation of urine specific gravity and urine sediment as risk factors for urinary tract infections in cats. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 37, n. 3, p. 317-322, 2008.

BARTGES, J. W.; LANES, I. F. Tratamento clínico da urolitíase. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, 3ª ed., Manole, 2003, 1661p.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. Técnicas radiográficas e ultrassonográficas. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. *Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais*, 3ª ed., Roca, 2006, 51p.

BROWN, S. A. Fisiologia do trato urinário. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, 3ª ed., Manole, 2003, 1575p.

BUSH, B. M. Urinálise. In: BUSH, B. M. *Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais*, 1ª ed., Roca, 2004, 309p.

CARVALHO, M.; PLATT, J. L. The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity*, v. 14, p. 437-446, 2001.

CHAIKOF, E. L. Engineering and material considerations in islet cell transplantation. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v. 1, p. 103-107, 1999.

CHUN, R. Canine Bladder Tumors: Beyond Piroxicam. Proceedings of the North American Veterinary Conference, v. 20, p. 7-11, Orlando, Florida, 2006.

CONWAY, J.; WILSON, G. J.; DIPCHAND, A. I. A fatal case with eosinophilia after pediatric heart transplantation. *J. Heart Lung Transpl.*, v. 30, p. 596-599, 2011.

COOK, J. L.; FOX, D. B.; KUROKI, K., et al. In vitro and in vivo comparison of five biomaterials used for orthopedic soft tissue augmentation. *Am. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 1, p. 148-156, 2008.

CUNHA JÚNIOR, A. G. *Estudo morfológico de nova mucosa intestinal formada sobre retalho homólogo de matriz celular. modelo experimental em ratos*. Dissertação de mestrado. UnB/FM, Brasília, 2006.

DANIELSSON, C.; RUAULT, S.; BASSET-DARDARE, A.; FREY, P. Modified collagen fleece, a scaffold for transplantation of human bladder smooth muscle cells. *Biomaterials*, v. 27, p. 1054-1060, 2006.

DAVIS, N. F.; McGUIRE, B. B.; CALLANAN, A.; FLOOD, H. D.; McGLOUGHLIN, T. M. Xenogenic extracellular matrices as potential biomaterials for interposition grafting in urological surgery. *J. Urol.*, v. 184, p. 2246-2253, p. 2010.

De LANGUE, M. S.; GALAC, S.; TRIP, M. R.; KOISTRA, H. S. High urinary corticoid/creatinine ratios in cats with hyperthyroidism. *J Vet Intern Med*, v. 18, p. 152-155, 2004.

DEWEY, C. W. Neurologia e Neurofarmacologia da Micção Normal e Anormal. In: DEWEY, C. W. *Neurologia de cães e gatos*, 1ª ed., Roca, 2006, 209p.

EBERLI, D.; FILHO, L. F.; ATALA, A.; YOO, J. J. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues, *Methods*, v. 47, p. 109-115, 2009.

FIGHERA, R. A.; Da SILVA, M. C.; SOUZA, T. M. Pathological aspects of 155 fatal cases of dogs victimized by motor vehicles accidents, *Ciência Rural*, v.38, n.5, p.1375-1380, 2008.

FINN-BODNER, S. T. The urinary bladder. In: CARTEE, R. E.; SELCER, B. A.; HUDSON, J. A.; FINN-BODNER, S. T.; MAHAFFEY, M. B.; JOHNSON, P. L.; MARICH, K. W. *Practical Veterinary Ultrasound*, 1<sup>st</sup> ed., Williams & Wilkins, 1995, 200p.

FIGUEIREDO, J. A. D. *Cistoplastias em cães – revisão de literatura*. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ UNESP, Botucatu, 2004.

FRESHNEY, R. I. Primary culture. In: FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 5<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, 2005, 175p.

FISHMAN, I. J.; FLORES, F. N.; SCOTT, B.; SPJUT, H. J.; MORROW, B. Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J. Urol*, v. 138, p. 1291-1294, 1987.

FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. Cirurgia da bexiga e da uretra. In: FOSSUM, T. W. *Small animal surgery*, 3rd ed., Mosby, 2008, 534p.

FOY, A. B.; GIANNINI, C.; RAFFEL, C. Allergic reaction to a bovine substitute following spinal cord untethering. *J. Neurosurgery Pediatrics*, v. 1, p. 167-169, 2008.

GALLATI, L. B.; IWASAKI, M. Comparison of ultrasonography and positive contrast cystography for detection of urinary bladder disorders in dogs. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 41, p. 40-46, 2004.

GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos. 5<sup>a</sup> ed., Sisson & Grossman, 2008.

GINN, P. E.; MENSETT, J. E. K. L.; RUKICH, P. M. Skin and appendages. In: MAXIE, M. G. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5<sup>th</sup> ed., Saunders, 2007, 588p.

GITLIN, J. S.; WU, X.; SUN, T.; RITCHEY, M. L.; SHAPIRO, E. New concepts of histological changes in experimental augmentation cystoplasty: insights into the development of neoplastic transformation at the enterovesical and gastrovesical anastomosis. *J. Urol.*, v. 162, p. 1096-1100, 1999.

GRAUER, G. F. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Vet. Clin. Small Anim.*, v. 37, p. 283-295, 2007.

GILBERT, T. W.; SELLARO, T. L.; BADYLAK, S. F. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, v. 27, p. 3675-3683, 2006.

GRECA, F. H.; SOUSA FILHO, Z. A.; SILVA, A. P. G.; LEONEL, I. S.; SOCCOL, A. T.; FERES, A. N.; LONGHI, P. The use of porcine small intestine submucosa as a graft for urinary bladder augmentation in dogs. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 19, n. 6, p. 670-676, 2004.

GREEN, R. W. Urinary Bladder. In: GREEN, R. W. *Small Animal Ultrasound*. 1<sup>st</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, 1996, 227p.

HEDGER, M. P. Immunologically privileged environments. In: HALBERSTADT, C. R.; EMERICH, D. F. *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*, Elsevier, 1<sup>st</sup> ed, p.567-590, 2007.

HENRY, C. J. Transitional Cell Carcinoma. *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association*, Sydney, Australia, 2007.

HERTZBERG, B. S.; BOWIE, J. D.; KING, L. R.; WEBSTER, G. D. Augmentation and replacement cystoplasty: sonographic findings. *Radiology*, v. 165, p. 853-865, 1987.

HOSGOOD, G. Reparo de feridas e resposta tecidual específica à lesão. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3ª ed., Manole, 2007, 1661p.

KAUFMAN, D. B.; PLATT, J. L.; RABE, F. L.; STOCK, P. G.; SUTHERLAND, D. E. R. The immunological basis of islet allograft primary non-function. *J. Experimental Med.*, v. 172, p. 291-302, 1990.

KAMBIC, H.; KAY, R.; CHEN, J.F.; MATSUSHITA, M.; HARASAKI, H.; ZILBER, S. Biodegradable pericardial implants for bladder augmentation: a 2.5 year study in dogs. *J. Urol.*, v. 148, p. 539-543, 1992.

KIM, B.; ATALA, A.; YOO, J. J. A collagen matrix derived from bladder can be used to engineer smooth muscle tissue. *World J. Urol.*, v. 26, p. 307-314, 2008.

KIMULI, M.; EARDLEY, I.; SOUTHGATE, J. In vitro assessment of decellularized porcine dermis as a matrix for urinary tract reconstruction. *BJU International*, v. 94, p. 859-866, 2004.

KIRBY, B. M. Peritônio e Cavidade Peritoneal. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3ª ed., Manole, 2003, 1661p.

KNAPP, D. W. Tumors of the Urinary System. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. *Small Animal Clinical Oncology*, 3<sup>rd</sup> ed., Saunders, 2001, 490p.

KNOW, T. G.; YOO, J. J.; ATALA, A. Local and systemic effects of a tissue engineered neobladder in a canine cystoplasty model. *J. Urol.*, v. 179, p. 2035-2041, 2008.

KOH, C. J.; DELO, M.; LEE, J. W., et al. Parthenogenesis-derived multipotent stem cells adapted for tissue engineering applications. *Methods*, v. 47, p. 90-97, 2009.

KRISJARSSON, A.; ABOL-ENEN, H.; ALM, A., et al. Long-term renal morphology and function following enterocystoplasty (refluxing or anti-reflux anastomosis): an experimental study. *BJU*, v. 78, p. 840-846, 1996.

KROPP, B.P.; RIPPY, M.K.; BADYLAK, S.F.; ADAMS, M.C., et al. Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations. *J. Urol.*, v. 155, p. 2098-2104, 1996.

KROPP, B. P.; CHENG, E. Y. Bioengineering organs using small intestinal submucosa scaffolds: in vivo tissue-engineering technology. *J. Endourol.*, v. 14, n. 1, p. 59-62, 2000.

IAMAGUTI, L. S. *Condrócitos homólogos cultivados implantados em lesões osteocondrais experimentais em cães*. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu/SP, 2010, 85p.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema urinário. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*, 6ª ed., Manole, 2000, 1131p.

JUNQUERA, L. C. D.; CARNEIRO, J. Aparelho urinário. In: JUNQUERA, L. C. D.; CARNEIRO. *Histologia Básica*, 10ª ed., Guanabara Koogan, 2008, 330p.

LAVASANI, M.; POLLETT, J.; HUARD, J. Muscle cell transplants. In: Halberstadt CR, Emerich DF, *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*, 1<sup>st</sup> ed., Elsevier, 2007, 289p.

LAW, N.; ELLIS, H. Adhesion formation and peritoneal healing on prosthetic materials. *Clin. Mater.*, v. 3, p. 95-101, 1988.

LEES, G. E. Incontinence, enuresis, dysuria and nocturia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6<sup>th</sup> ed., Saunders, 2005, 93p.

LIMA, S. V. C.; ARAÚJO, L. A.; VILAR, F. O., et al. Nonsecretory sigmoid cystoplasty: experimental and clinical results. *J. Urol.*, v. 153, n. 5, p. 1651-1654, 1995.

LIU, Y.; BHARADWAJ, S.; LEE, S.J.; ATALA, D., et al.. Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell-matrix penetration for urologic tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, p. 3865-3873, 2009.

MADARAMA S.; ITO, A.; TANAKA, R. Urinary Bladder Rhabdomyosarcoma (Botryoid Rhabdomyosarcoma) in a Labrador Retriever Dog. *J. Toxicol. Pathol.*, v. 16, p. 279-281, 2003.

MASSETTI, F. M.; MANZANO, J. P.; PAIVA, C. S., et al. Preparo intestinal para cistectomia radical. Vale a pena? *Rev. Bras. Med.*, p. 4-5, 2011.

MAMPRIM, M. J. Fígado e vesícula biliar. In: CARVALHO, C. F. *Ultrassonografia Doppler em pequenos animais*. 1ª ed., Roca, 2004, 51p.

MAUCH, T.; ALBERTINE, K. H. Urorectal septum malformation sequence: insights into pathogenesis. *Anat. Rec.*, v. 268, p. 405-410, 2002.

McFARLAND, L. Z. Topographical anatomy. In: ANDERSON, A. C. *The beagle as an experimental dog*. 1<sup>st</sup> ed., Iowa State University Press, 1970, 106p..

MEULTEN, D. J. Tumors of urinary system. In: MEULTEN, D. J. *Tumors in domestic animals*. 4<sup>th</sup> ed., Iowa State Press, 2002, 527p.

MORAES, S. G.; JOAZEIRO, P. Fibroblastos. In: CARVALHO, H. F., COLLARES-BUZATO, C. B. *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. 1ª ed., Manole, 2005, 22p.

MOORE, K. J.; PERSAUD, T. V. N. Sistema Urogenital. In: MOORE, K. J.; PERSAUD, T. V. N. *Embriologia básica*. 5ª ed., Guanabara Koogan, 2000, 253p.

MONSOUR, M. J.; MOHAMMED, R.; GORHA, S. D., et al. An assessment of a collagen/vicryl composite membrane to repair defects of the urinary bladder in rabbits. *Urol. Res.*, v. 15, n. 4, p. 235-238, 1987.

MOON, S. J.; KIM, D. H.; JO, J. K., et al. Bladder reconstruction using bovine pericardium in a case of enterovesical fistula. *Korean J. Urol.*, v. 52, p. 150-153, 2011.

NAROTAN, P. K.; QIAO, F.; NATHOO, N. Collagen matrix duraplasty for posterior fossa surgery: evaluation of surgical technique in 52 adult patients, *J. Neurosurg.*, v. 111, p. 380-386, 2009.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Infecções do trato urinário. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Fundamentos de Medicina Veterinária de pequenos animais*. 4ª ed., Guanabara Koogan, 2010, 364p.

NODEN, D.; DE LAHUNTA, A. Derivados del mesodermo intermedio: aparato urinário y glândula adrenal. In: NODEN, D.; DE LAHUNTA, A. *Embriologia de los animales domesticos*. Editorial Acribia, 2001, 341p.

O'SULLIVAN, D.; BARRETT, D. M. Urothelial substitutes: bladder. *J. Endourol.*, v. 7, n. 5, p. 423-425, 1993.

PISER, J. A.; MITCHELL, M. E.; KULB, T. B., et al. Gastrocystoplasty and colocystoplasty in canines: the metabolic consequences of acute saline and acid loading. *J. Urol.*, v. 138, p. 1009-1013, 1987.

PLATT, J. L. Immunology of cell and tissue xenotransplantation. In: HALBERSTADT, C. R.; EMERICH, D. F. *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic*, 1<sup>st</sup> ed., Elsevier, 2007, 3p.

PROBST, M.; PIECHOTA, H. J.; DAHIYA, R., et al. Homologous bladder augmentation in dog with the bladder acellular matrix graft. *BJU International*, v. 85, p. 362-371, 2000.

RECORD, R. D.; HILLEGONDS, D.; SIMMONS, C., et al. In vivo degradation of 14C-labeled small intestinal submucosa (SIS) when used for urinary bladder repair. *Biomaterials*, v. 22, p. 2653-2659, 2001.

RECHE, J. R.; HAGIWARA, M. K.,. Similarities between the feline idiopathic lower urinary tract disease and human interstitial cystitis. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 315-321, 2004.

RIGAUD, J.; Le NORMMAND, L. Augmentation enterocystoplasty. *Ann. Urol.*, v. 38, p. 298-310, 2004.

ROCHA, F. G.; WHANG, E. E. Intestinal tissue engineering: from regenerative medicine to model systems. *J. Surg. Res.*, v. 120, p. 320-325, 2004.

ROHRMANN, D.; ALBRECHT, D.; HANNAPPEL, J; et al. Alloplastic replacement of the urinary bladder. *J. Urol.*, v. 156, p. 2094-2097, 1996.

ROSSETTO, V. J. V.; BRANDÃO, C. V. S.; RANZANI, J. J. T.; PAVAN, P. T.; MAMPRIM, M. J.; AMORIM, R. L.; DONATTI, C. Radical exeresis of bladder transitional cell carcinoma in dog: survival superior to two years. *Vet. Zootec.*, v. 16, n. 2, p. 321-324, 2009.

RINGLER, D. J. Inflamação e reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*, 6ª ed., Manole, 1997, 119p.

SAITO, M.; YOSHIKAWA, Y.; OHMURA, M.; YOKOI, K.; KONDO, A. Functional restoration of rat bladder after subtotal cystectomy: in vivo cystometry and in vivo study of whole bladder. *Urol. Res.*, v. 24, p. 171-175, 1996.

SCHAUFFERT, M. D.; SIMÕES, M. L. P. B.; JULIANO, Y.; SIMÕES, M. J.; NOVO, N. F.; ORTIZ, V. Estudo histológico e histométrico das vilosidades e das células caliciformes ileais na ileocistoplastia em ratas. *Acta Cirúrgica Bras.*, v. 14, n. 3, 1999.

SCHWARZ, P. D.; EGGER, E. L.; KLAUSE, S. E. Modified “cut-patch” ileocystoplasty for urinary bladder reconstruction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.198, n. 2, p. 273-277, 1991.

SEGUIN, M. A.; VADEN, S. L.; ALTIER, C.; STONE, E.; LEVINE, J. F. Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999). *J. Vet. Intern. Med.*, v. 17, p. 622-631, 2003.

SHARMA, A. K.; DONOVAN, J. L.; HAGERTY, J. A.; SULLIVAN, R. R.; EDASSERY, S. L.; HARRINGTON, D. A.; CHENG, E. Y. Do current bladder smooth muscle cell isolation procedures result in a homogeneous cell population? Implications for bladder tissue engineering. *World J. Urol.*, v. 27, p. 687-694, 2009.

TEIXEIRA, M. W.; REZENDE, C. M. F.; SILVA JÚNIOR, V. A.; TEIXEIRA, M. J. D.; SILVA, E. C.; BARBOSA, D. G. Avaliação clínica e histopatológica de alo-transplante de bexiga em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n. 2, p. 350-357, 2007.

TORRES, S. M.; DIAZ, S. F.; NOGUEIRA, S. A.; JESSEN, C.; POLZIN, D. J.; GILBERT, S. M.; HORNE, K. L. Frequency of urinary tract infections among dogs with pruritic disorders receiving long-term glucocorticoid treatment. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 227, p. 239-243, 2005.

TUDURY, E. A.; BARAÚNA, D.; CHIORATTO, R.; SILVA, S. R. A. M.; ROEHSIG, C.; ROCHA, L. B.; ALMEIDA, A. C. M.; KEMPER, B.; MACIEL, M. J. S. Denervação dos esfíncteres uretrais via celiotomia pré-púbica, em três gatos paraplégicos. *Clín. Vet.*, n. 60, p. 54-58, 2006.

THÜROFF, J.W.; ALKEN, P.; RIEDMILLER, H. et al. The mainz pouch (mixed augmentation ileum and cecum) for bladder augmentation and continent diversion. *J. Urol.*, v.136, p.17-26, 1986.

UENO, K.; YAMANAKA, N.; KIMURA, K., ARAKAWA, S.; KAMIDONO, S.; SARA, I. Bladder reconstruction with autotransplanted ileum in the dog: better functional results than standard enterocystoplasty. *BJU International*, v. 87, p. 703-707, 2001.

VASCONCELOS, L. A. B. A.; CARVALHO, H. F. Célula muscular lisa. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. *Células: uma abordagem multidisciplinar*. 1ª ed., Manole, 2005, 68p.

VOYTIK-HARBIN, S. L.; BRIGHTMAN, A. O.; KRAINE, M. R., ET AL. Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J. Cell. Biochem.*, v. 67, p. 478-491, 1996.

WALDRON, D. R. Bexiga. In: SLATTER, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3ª ed., Manole, 2003, 1661p.

WAKITANI, S., KAWAGUCHI, A.; TOKUHARA, Y.; Takaoka, K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J. Bone Miner. Metab.*, v. 26, p. 115-122, 2008.

WALL, L. L.; WISKIND, A. K.; TAYLOR, P. A. Simple bladder filling with a cough stress test compared with subtracted cystometry for the diagnosis of urinary incontinence. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 171, p. 1472-1479, 1994.

WICE, B.; MILBRANDT, J.; GLASER, L. Control of muscle differentiation in BC3H1 Cells by Fibroblast Growth Factor and Vanadate. *J. Biol. Chem.*, v. 262, n.4, p. 1810-1817, 1987.

WOUNTERS, F.; DE BARROS, C. S. L.; WOUNTERS, A. T. B.; KOMMERS, G. D. Feline Urologic Syndrome: 13 cases. *Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 497-500, 1998.

XIONG, X.; FUKUOKA, K. G.; EBIHARA, Y.; SALM, S.; COETZEE, S.; ONTIVEROS, C.; OGAWA, M.; MOSCATELLI, D.; WILSON, E. L. Bone marrow cells are able to generate prostatic epithelial and stromal Cells. *J. Urol.*, v. 181, n. 4, Supplement, 2009.

YAMADA, K. M.; PAUKOV, R.; CUKIERMAN, E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 36, p. 959-966, 2003.

YOO, J. J.; MENG, J.; OBERPENNING, F.; ATALA, A. Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urol*, v. 51, n. 2, p. 221-225, 1998.

YIANG, Z.; GUOMIN, W. Allogeneic stem cells seeded tissue engineered bladder: A possible alternative for bladder reconstruction and treatment to bladder cancer. *Med. Hypotheses*, v. 70, p. 294-297, 2008.

YOUSSEF, D.; CHOPIN, D.; LEANDRI, J.; AUVERT, J.; LOISANCE, D.; ABBOU, C. Cystoplasty using a resorbable polyglactin prosthesis covered by a free peritoneal flap. *Ann. Urol.*, v. 22, n. 4, p. 263-267, 1988.

ZHANG, Y.; LIN, H. K.; FRIMBERGER, D.; EPSTEIN, R. B.; KROPP, B. P. Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue-engineered bladder. *BJU International*, v. 96, p. 1120-1125, 2005.

ZHANG, Y.; FRIMBERGER, D.; CHENG, E. Y.; LIN, H.; KROPP, B. P. Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. *BJU International*, v. 98, p. 1100-1105, 2006.

ZHANG, Y.; MCNEILL, E.; TIAN, H.; SOKER, S.; ANDERSSON, K.; YOO, J. J. Urine Derived Cells Are A Potential Source For Urological Tissue Reconstruction. *The J. Urol.*, v. 180, p. 2226-2233, 2008.

ZIMULI, M.; EARDLEY, I.; SOUTHGATE, J. In vitro assessment of decellularized porcine dermis as a matrix for urinary tract reconstruction. *BJU International*, v. 94, p. 869-866, 2004.

## ANEXO 1

### ANÁLISE IMAGENS HISTOLÓGICAS PELO MÉTODO DE TRICRÔMIO DE MASSON – GRUPO CONTROLE

#### A)ANIMAL X

##### AMOSTRA CENTRAL

| <b>Fotomicrografia</b> | <b>Análise Patologista 1</b> | <b>Análise Patologista 2</b> |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Imagem 1               |                              |                              |
| Imagem 2               |                              |                              |
| Imagem 3               |                              |                              |
| Imagem 4               |                              |                              |
| Imagem 5               |                              |                              |
| Imagem 6               |                              |                              |
| Imagem 7               |                              |                              |
| Imagem 8               |                              |                              |

Legenda: (0) ausente; (+) discreta quantidade de fibras musculares; (++) moderada; (+++) acentuada; (++++)  
intensa

##### AMOSTRA TRANSIÇÃO

| <b>Fotomicrografia</b> | <b>Análise Patologista 1</b> | <b>Análise Patologista 2</b> |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Imagem 1               |                              |                              |
| Imagem 2               |                              |                              |
| Imagem 3               |                              |                              |
| Imagem 4               |                              |                              |
| Imagem 5               |                              |                              |
| Imagem 6               |                              |                              |
| Imagem 7               |                              |                              |
| Imagem 8               |                              |                              |

Legenda: (0) ausente; (+) discreta quantidade de fibras musculares; (++) moderada; (+++) acentuada; (++++)  
intensa

## Trabalho a ser enviado para a Revista BMC Veterinary Research

### Submucosa intestinal suína acelular e semeada com células musculares lisas homólogas na reparação tecidual da bexiga de cães

#### Abstract

**Background:** The indications for surgical repair of the bladder include severe trauma with extensive tissue loss, neoplasms, interstitial cystitis, neurological and congenital abnormalities. Due to numerous complications associated to gastrointestinal augmented cystoplasty, this study aimed to comparatively analyze the anatomic repair of the bladder of 10 female dogs using the suine intestinal submucosa (SIS) acellular and seeded with homologous smooth muscle cells. **Results:** We assessed the possible side effects and complications of each type of graft by clinical examination, abdominal ultrasound and laboratory findings. Anatomic repair of neoformed bladder was assessed by histological staining for H/E and Masson's Trichrome, analyzed with a Nikon Photomicroscope connected to the system of image analysis ImageJ. **Conclusions:** We propose that SIS associated to homologous smooth cells can improve the quality of tissue repair, and consequently decrease the potential complications inherent to acellular SIS.

**Key-words:** tissue reconstruction; bioengineered tissue; cell therapy; SIS; bladder; dogs.

## **Introdução**

As indicações para a cirurgia reparadora da bexiga abrangem traumas com perda tecidual extensa, cistites intersticiais recorrentes, pseudotumores inflamatórios, disfunções neurológicas e anormalidades genitourinárias congênitas [1-4]. Em todas essas situações, a reconstrução da bexiga após cistectomia parcial tem sido tradicionalmente desempenhada por meio de transposição de segmentos autólogos de estômago ou intestino [1,5,6]. Entretanto, a realização de cistoplastia com o emprego de segmentos gastrointestinais pode resultar em inúmeras complicações, como infecção, urolitíase e retração do enxerto [3,4,7]. Devido a essas complicações, muitos tipos de enxerto têm sido utilizados na reparação tecidual da bexiga, aloplásticos ou biodegradáveis, com ou sem a implantação de células. Entre os diferentes materiais empregados, a submucosa intestinal suína (SIS) constitui o mais amplamente investigado e se destaca pela sua capacidade de reparação da bexiga e outros tecidos do trato urinário [8].

A neobexiga formada a partir da SIS é macroscopicamente similar a normal, porém difere histologicamente quanto a organização e quantidade das fibras musculares lisas, presentes de maneira desorganizada e em menor número nas bexigas reparadas com a SIS [9]. Uma alternativa para minimizar tal ocorrência e reparar mais fielmente a anatomia da bexiga é a implantação de células associada à bioengenharia tecidual.

O presente trabalho teve como objetivo analisar comparativamente a reparação anatômica da bexiga de cães utilizando-se a SIS acelular e semeada com células musculares lisas homólogas vesicais, bem como avaliar as possíveis complicações locais e sistêmicas, inerentes a cada um dos tipos de enxerto empregados.

## **Métodos**

### **Seleção dos animais**

Foram utilizados 10 cães, sem raça definida, fêmeas, procedentes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (parecer nº 104/2009). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sendo: Grupo Controle (GC), constituído por cinco animais submetidos à cistoplastia com enxerto de submucosa intestinal suína; e Grupo Tratado (GT), constituído por cinco animais submetidos à cistoplastia com enxerto de submucosa intestinal suína semeada com células musculares lisas homólogas (CMLH).

### **Cultivo e semeadura das células musculares lisas vesicais (CMLV)**

As células musculares lisas vesicais foram obtidas de fragmentos de bexiga provenientes dos animais do GC, coletados no momento da cistoplastia, e de outros dois cães sem raça definida que vieram a óbito no Hospital Veterinário da FMVZ/UNESP, campus de Botucatu, por motivos não infecciosos ou neoplásicos.

As células foram cultivadas em monocamada sob o fundo dos frascos de cultura com meio Ham F-12 acrescido de soro fetal bovino a 20% e penicilina/estreptomicina associada à anfotericina B a 1%, mantidos à temperatura de 36,7°C e pressão de 5% de CO<sub>2</sub>. Para confirmação do tipo celular e validação do cultivo, foi realizada técnica de imunocitoquímica pelo método LSAB. Após em média três passagens e ao atingirem aproximadamente 70% de confluência, as células foram semeadas sobre a membrana nas mesmas condições descritas acima.

## Procedimentos cirúrgicos

Para a cistoplastia dos animais de ambos os grupos, foi realizada ressecção de espessura completa, apresentando 3 cm de comprimento X 4 cm de largura, na face ventral da bexiga. Foi utilizada a SIS acelular e semeada com CMLH, respectivamente nos animais do GC e GT, suturada às bordas da parede vesical remanescente com fio de poliglactina 910 3-0. Nos cães do GT, a superfície semeada da SIS foi posicionada na face extraluminal da bexiga. Não foi realizada aproximação e/ou fixação do epíplon à bexiga. Para a identificação exata do local foram colocadas suturas com fio de náilon 3-0 ao longo da bexiga original e distantes 0,5 cm da linha de transição entre o enxerto e a mesma.

Após 60 dias do pós-operatório, todos os cães foram submetidos à biopsia de espessura completa da parede vesical, abrangendo duas regiões distintas: a) região central da cistoplastia e b) região de transição entre o tecido neoformado e vesical original adjacente. Nesse momento, foi realizada avaliação macroscópica da qualidade da reparação interna e externa da parede vesical.

## Análise histopatológica e quantitativa das fibras colágenas e musculares

As amostras foram destinadas para avaliação histopatológica e submetidas às colorações de H/E e Tricrômico de Masson.

Para a quantificação das fibras colágenas e musculares, as lâminas histológicas coradas pelo método de Tricrômico de Masson foram digitalizadas utilizando-se microscópio digital Nikon Coolscope II. Em ambos os grupos foram realizadas fotomicrografias das áreas central e de transição entre os tecidos neoformado e da

bexiga adjacente, com aumento de 5x. Cada imagem foi processada pelo “software” ImageJ, utilizando-se o plugin “K-means Clustering”. O número de “clusters” variou entre cinco a sete, de acordo com o contraste das fotomicrografias.

#### Avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica abdominal

Foi realizada avaliação clínica pós-operatória nos períodos compreendidos por 24 (M1) e 72 (M3) horas e posteriormente aos sete (M7), 30 (M30) e 60 (M60) dias. O hemograma completo e a urina tipo I (urinálise) foram realizados nos M7, M30 e M60, enquanto que os exames bioquímicos e urina tipo II (cultura aeróbica) realizados no M60.

Todos os animais foram submetidos ao exame ultrassonográfico abdominal previamente à cistoplastia e nos M30 e M60.

#### Análise estatística

Todos os testes foram realizados utilizando-se o software IBM SPSS 20, considerando-se  $p \leq 0,05$ .

### **Resultados**

#### Cultivo celular e semeadura das CMLV sobre a SIS

A contagem inicial média das CMLV dos animais do GC foi de  $1,5 \times 10^5$  células/mL, enquanto que a dos doadores 1 e 2, respectivamente,  $4,5 \times 10^5$  e  $6 \times 10^5$  células/mL. Não foi verificada diferença quanto à viabilidade celular em ambas as

situações, sendo esta de aproximadamente 95%.

As células aderiram-se ao fundo dos frascos entre o 1º e 5º dias de cultivo. Logo após sua adesão, as CMLV iniciaram o processo de divisão, assumindo morfologia poligonal achatada e alongada, com projeções celulares e estruturas intracitoplasmáticas pareadas que remetiam a miofilamentos contráteis. O número de células aumentou exponencialmente até se atingir confluência de aproximadamente 70%, quando então foram semeadas sobre a SIS. A quantidade de células semeadas foi de  $7 \times 10^5$  a  $7,5 \times 10^5$  células/mL.

A técnica de imunocitoquímica pelo método LSAB resultou na marcação positiva acastanhada para o antígeno alfa-actina de músculo liso, e consequentemente na confirmação do tipo celular e validação do cultivo.

#### Avaliação macroscópica da bexiga após implantação da SIS

O tecido de reparação na face externa de todos os animais do GC e CT, no M60, apresentou superfície brilhante, plana e lisa, contínua ao tecido vesical original.

Na face interna da bexiga, notou-se tecido de reparação com superfície brilhante em todos os cães do GT e em dois animais do GC ( $p=0,17$ ); nos outros três animais do GC, a mesma apresentava-se opaca.

Adicionalmente, verificaram-se superfícies internas planas, na região da cistoplastia, em três animais do GC e em todos do GT; de aspecto liso em dois animais do GC e em três do GT; irregular em três cães do GC (dois com áreas de depressão associada) e em dois do GT. A continuidade do tecido de reparação na superfície intraluminal com o tecido original da bexiga foi considerada adequada em dois animais do GC e em todos os do GT, e inadequada em três animais do GC ( $p=0,17$ ).

Em três animais do GC foram observados urólitos de tamanhos e formatos variáveis, aderidos à superfície interna da membrana. Tais achados não foram observados nos animais do GT. Na comparação entre grupos, houve maior formação de urólitos no GC ( $p<0,01$ ).

#### Análise histopatológica e quantitativa das fibras colágenas e musculares

Nas amostras centrais dos animais do GC, foram observadas na túnica mucosa áreas de revestimento urotelial heterogêneas, apresentando uma a duas camadas de células até a ausência completa de urotélio. Já nos animais do GT, foi observado revestimento urotelial pouco heterogêneo com urotélio espesso em quase toda a sua totalidade.

Ainda nas amostras centrais dos animais do GC, foram observadas fibras musculares em feixes desorganizados e de diferentes calibres. Adicionalmente, notou-se ausência da túnica muscular em três cães (Figura 1 A). Já nos animais do GT foram verificadas arquitetura e organização típicas, caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular média e longitudinal interna ( $p=0,17$ ) (Figura 1 B). A espessura da túnica muscular na região central do GC não foi possível de ser mensurada. A espessura média da túnica muscular nas amostras centrais do GT foi de 2679,55  $\mu\text{m}$ .

De modo similar, nas amostras de transição dos animais do GC, verificaram-se na túnica mucosa áreas de revestimento urotelial bastante heterogêneas. Já nos animais no GT, foram observadas áreas de revestimento urotelial homogêneo com prevalência de poucas camadas de células em praticamente toda a extensão do urotélio. Comparando-se o GC e GT, notou-se que o revestimento urotelial completo, na região

de transição, foi superior no GT ( $p=0,05$ ); entretanto, a hiperplasia urotelial foi superior no GC ( $p<0,01$ ).

Ainda nas amostras de transição, dos animais do GC, foram observados feixes musculares de diferentes calibres, distribuídos aleatoriamente e sem a estruturação histológica típica (Figura 1 C). Já nos animais do GT, foram verificadas arquitetura e organização típicas, caracterizada pela presença das camadas longitudinal externa, circular média e longitudinal interna (Figura 1 D). A presença de estratificação típica da túnica muscular, na região de transição, foi superior no GT em relação do GC ( $p=0,05$ ). A espessura média da túnica muscular na região de transição do GC foi de 2809,86  $\mu\text{m}$  e do GT de 3366,21  $\mu\text{m}$  ( $p=0,42$ ).

As principais alterações histológicas, observadas nas regiões central e transicional, estão elencadas na Tabela 1. Nas Tabelas 2 e 3, está apresentada a porcentagem média dos tecidos muscular e colagenoso nas regiões central e de transição dos cães do GC e GT.

#### Avaliação clínica, laboratorial e ultrassonográfica abdominal

À avaliação clínica, quatro animais do GC apresentaram polaciúria, sendo que um apresentou a alteração em dois episódios distintos. A remissão deste sinal foi verificada entre o M3 e M30. Entre os animais do GT, três apresentaram polaciúria no M1, com retorno da frequência de micção normal no M3 ( $p=1,00$ ). Adicionalmente, quatro animais do GC e cinco do GT apresentaram hematúria macroscópica no M1 com remissão do sinal clínico até o M7 ( $p=1,00$ ). Todos os demais parâmetros clínicos estavam dentro da normalidade em ambos os grupos.

Ao hemograma completo dos animais do GC e GT não foram constatadas

variações quantitativas e morfológicas das séries eritrocitária e plaquetária. Quanto à série leucocitária foi verificada intensa eosinofilia no M60 em três animais do GC (média de  $2,00 \times 10^3$  eosinófilos/uL e variação de  $1,24 \times 10^3$  a  $3 \times 10^3$  eosinófilos/uL) e um animal do GT ( $2,324 \times 10^3$  eosinófilos/uL) ( $p=0,52$ ).

Aos exames bioquímicos não foram observadas alterações durante o período de avaliação, com exceção do aumento sérico da uréia em um animal do GC (67mg/dL) no M60.

Ao exame de urina tipo I, foi constatada proteinúria em todos os animais do GC e em três do GT durante o período de avaliação, sendo que um animal de cada grupo apresentou a alteração em mais de um momento. A presença de cristais de fosfato de amônio magnésiano no sedimento urinário foi verificada em três animais do GC e em três do GT, sendo que um animal de cada grupo apresentou a alteração em mais de um momento. Quanto à mensuração de hemácias, todos os animais do GC apresentaram quantidade igual ou inferior a 5 hemácias/uL, excetuando-se um animal (nº 3) com 45-50 hemácias/uL no M30. Entre os animais do GT foi verificada hematúria microscópica no M7 em três cães ( $p=0,52$ ), sendo de 10-15 hemácias/uL no primeiro, 20-15 hemácias/uL no segundo e 75-100 hemácias/uL no terceiro. Ao contrário do observado com o animal do GC, em todos os cães do GT a grande quantidade de hemácias na urina não foi acompanhada de leucocitúria e/ou bacteriúria. A quantidade de bactérias foi mensurável nos animais 3 e 5 do GC, respectivamente no M7 e M30. Em todos os casos, foi isolado por meio do exame de urina tipo II *Staphylococcus  $\beta$  hemolítico*. Nos animais do GT não foram visualizadas ou isoladas bactérias ( $p=0,44$ ).

Ao exame ultrassonográfico, no M30, foi visibilizado sedimento urinário em quatro animais do GC. O mesmo, contudo, não foi observado em nenhum dos animais do GT ( $p=0,05$ ). No M60, foram visibilizadas irregularidades na região da membrana

implantada em quatro animais do GC e em dois animais do GT. Associadas a essas áreas irregulares foram visualizadas, em três animais do GC, estruturas hiperecogênicas de tamanhos variáveis e formadoras de sombra acústica, sugerindo-se a presença de urólitos aderidos à membrana. Tais estruturas não foram verificadas nos animais do GT (p=0,17).

## **Discussão**

A SIS assume destaque dentre diversos tipos de enxertos devido a sua capacidade de reparação da bexiga e outros tecidos do trato urinário [8]. A neobexiga formada a partir da SIS, entretanto, difere histologicamente quanto a organização e quantidade das fibras musculares lisas, dispostas de maneira desorganizada e em menor número [2,9]. Além disso, a bexiga tornar-se-ia permanentemente contraída quando reparada apenas com biomateriais, pois as capacidades de contração e relaxamento normais da bexiga dependem da camada muscular normal [1,10].

Devido a isso, foram utilizadas no presente estudo CMLH, semeadas sobre a SIS e obtidas a partir de tecidos cadavéricos, os quais possuem as mesmas características das células autólogas e potencial imunogênico bastante reduzido quando expandidas *in vitro* [11-13]. Adicionalmente, embora as células autólogas constituam a primeira opção em terapias celulares, a quantidade de células obtidas geralmente é muito limitada, em especial se considerado a idade do paciente [13]. Outra desvantagem consiste na possibilidade de coleta e cultura de células neoplásicas [8,14].

A padronização da cultura celular no presente estudo foi primordial para os resultados obtidos, dentre os quais a satisfatória reparação macroscópica da bexiga. No entanto, apesar da boa qualidade do tecido de reparação na face externa da bexiga, a

face intraluminal dos animais do GC foi caracterizada por vezes pela presença de tecido de reparação opaco, irregular, erodido e/ou com urólitos aderidos à sua superfície. A qualidade inferior do tecido de reparação nos animais do GC, em comparação aos do GT estaria relacionada ao leito desnudo da SIS que predisporia a precipitação e agregação de sais dissolvidos na urina. A presença desses sais por sua vez resultaria em maior processo inflamatório e na formação de urólitos [2]. O processo inflamatório resultaria ainda em maior influxo de fibroblastos e na deposição de tecido colagenoso com consequente formação de tecido de reparação de qualidade inferior e extensas áreas de fibrose [15].

Tais achados são condizentes com as alterações histopatológicas, caracterizadas pela maior quantidade de falhas de revestimento urotelial nas amostras provenientes dos animais do GC quando comparados aos do GT. Isso se deve ao fato das células musculares serem importantes para a manutenção da integridade estrutural e organização celular do enxerto [2,16]. Enxertos que não são semeados com células musculares apresentam falhas de epiteliação, pois apesar do epitélio possuir uma alta capacidade regenerativa, as células musculares por mecanismos ainda não conhecidos modulam a proliferação celular [2].

Adicionalmente, a revascularização insuficiente do enxerto e inflamação aguda também teriam contribuído para os resultados pouco satisfatórios à avaliação histopatológica dos animais do GC frente aos do GT. No que concerne a última, são as células inflamatórias as responsáveis pela liberação de citocinas e outras moléculas bioativas que resultariam em maior deposição de fibras colágenas, dificultando o repovoamento do enxerto pelas células musculares [17,18].

Dessa forma, a cobertura celular atuaria impermeabilizando o enxerto e assim limitando os efeitos tóxicos da urina sobre o mesmo, diminuindo consequentemente a

resposta inflamatória [2,14]. De acordo com Zhang et al. (2005), entretanto, tal função protetora é atribuída apenas às células implantadas na face intraluminal do enxerto. No presente estudo, entretanto, as CMLH da bexiga foram semeadas na face extraluminal do enxerto, fato que corroboraria com a hipótese de que as células musculares participam do processo de organização e migração de outras células, como as células uroepiteliais.

Cria-se, portanto, um ciclo no qual as células musculares semeadas sobre a SIS contribuem para o processo de epiteliação que por sua vez favorece a deposição de fibras musculares sobre o enxerto.

A ausência de adequada cobertura uroepitelial também justificaria as principais alterações verificadas às avaliações clínica, laboratorial e ultrassonográfica abdominal, como a presença de cistite e urolíase. Conforme mencionado anteriormente, a presença de cristais e debris celulares, dissolvidos em maior quantidade na urina pelo próprio trauma cirúrgico, aliados à conformação anatômica da uretra nas fêmeas, poderia resultar na incrustação da SIS, o que por conseguinte resultaria em infecção do trato urinário e urolíase [2,20]. As CMLH formariam uma barreira protetora impedindo que os cristais dissolvidos na urina possam se precipitar entre as fibras colágenas da membrana, contribuindo consequentemente para a ausência de cistite e urolíase nos animais do GT [2,21].

Além disso, a maior quantidade de fibras colágenas nas bexigas neoformadas com a SIS acelular resultaria em menor capacidade contrátil das mesmas, resultando consequentemente em maior quantidade de urina residual, o que também poderia ter predisposto a infecção do trato urinário nos animais do GC [22].

## Conclusão

O implante de células musculares lisas vesicais, quando comparados ao implante acelular, resulta em arquitetura histológica típica na região da cistoplastia, caracterizada pela presença das túnicas melhor individualizadas e organizadas.

A SIS associada ao implante de células musculares lisas homólogas promove processo de reparação tecidual com maior porcentagem de fibras musculares lisas em detrimento de fibras colágenas.

A SIS acelular ou semeadas com células musculares lisas vesicais não induz alterações clínicas, laboratoriais ou histológicas compatíveis com rejeição.

## Referências

1. O'Sullivan D, Barrett DM. **Urothelial substitutes: bladder.** *J Endourol* 1993, 7:423-425.
2. Atala A. **Tissue engineering of artificial organs.** *J Endourol* 2000, 14:49-57.
3. Kropp BP, Cheng EY. **Bioengineering organs using small intestinal submucosa scaffolds: in vivo tissue-engineering technology.** *J Endourol* 2000, 14:59-62.
4. Danielsson C, Ruault S, Basset-Dardare A, Frey P. **Modified collagen fleece, a scaffold for transplantation of human bladder smooth muscle cells.** *Biomaterials* 2006, 27:1054-1060.
5. Schaufert MD, Simões MLPB, Juliano Y, Simões MJ, Novo NF, Ortiz V. **Histologic and histometric study of the villous and of the ileal goblet cells, on the ileocystoplasty in female rats.** *Acta Cirúrgica Bras* 1999, 14:0-0 (online).
6. Rigaud J, Le Normmand L. **Augmentation enterocystoplasty.** *Ann Urol* 2004,

38:298-310.

7. Gitlin JS, Wu X, Sun T, Ritchey ML, Shapiro E. **New concepts of histological changes in experimental augmentation cystoplasty: insights into the development of neoplastic transformation at the enterovesical and gastrovesical anastomosis.** *J Urol* 1999, **162**:1096-1100.

8. Yiang Z, Guomin W. **Allogeneic stem cells seeded tissue engineered bladder: A possible alternative for bladder reconstruction and treatment to bladder cancer.** *Med Hypotheses* 2008, **70**:294-297.

9. Kropp BP, Rippy MK, Badylak SF, Adams MC, et al. **Regenerative urinary bladder augmentation using small intestinal submucosa: urodynamic and histopathologic assessment in long-term canine bladder augmentations.** *J Urol* 1996, **155**:2098-2104.

10. Kimuli M, Eardley I, Southgate J. **In vitro assessment of decellularized porcine dermis as a matrix for urinary tract reconstruction.** *BJU* 2004, **94**:859-866.

11. Lavasani M, Pollett J, Huard J. **Muscle cell transplants.** In: *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic.* 1<sup>st</sup> edition. Edited by: Halberstadt CR, Emerich DF. Academic Press; 2007:289-302.

12. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. **Present status of and future direction for articular cartilage repair.** *J Bone Miner Metab* 2008, **26**:115-122.

13. Alvez PMM, Carrondo MJT, Cruz PE. **Introdução à tecnologia de cultivo em células animais.** In: *Tecnologia do Cultivo de Células Animais.* 1st edition. Edited by: Moraes AM, Augusto EFR, Castilho LR. São Paulo: Roca, 2009:2.

14. Zhang Y, Lin HK, Frimberger D, Epstein RB, Kropp BP. **Growth of bone marrow stromal cells on small intestinal submucosa: an alternative cell source for tissue-engineered bladder.** *BJU* 2005, **96**:1120-1125.

15. Know TG, Yoo JJ, Atala A. **Local and systemic effects of a tissue engineered neobladder in a canine cystoplasty model.** *J Urol* 2008, **179**:2035-2041.
16. Eberli D, Filho LF, Atala A, Yoo JJ. **Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues.** *Methods* 2009, **47**:109-115.
17. Chaikof EL. **Engineering and material considerations in islet cell transplantation.** *Annu Rev Biomed Eng* 1999, **1**:103-107.
18. Ali OA, Mooney DJ. **Converging cell therapy with biomaterials.** In: *Cellular Transplantation: From Laboratory to Clinic.* 1st edition. Edited by: Halberstadt CR, Emerich DF. Academic Press, 2007:591-609.
19. Foy AB, Giannini C, Raffel C. **Allergic reaction to a bovine substitute following spinal cord untethering.** *J Neurosurgery Pediatrics* 2008, **1**:167-169.
20. Seguin MA, Vaden SL, Altier C, Stone E, Levine JF. **Persistent urinary tract infections and reinfections in 100 dogs (1989-1999).** *J Vet Intern Med* 2003, **17**:622-631.
21. Zhang Y, Frimberger D, Cheng EY, Lin H, Kropp BP. **Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model.** *BJU* 2006, **98**:1100-1105.
22. Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. **Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells.** *Urol* 1998, **51**:221-225.

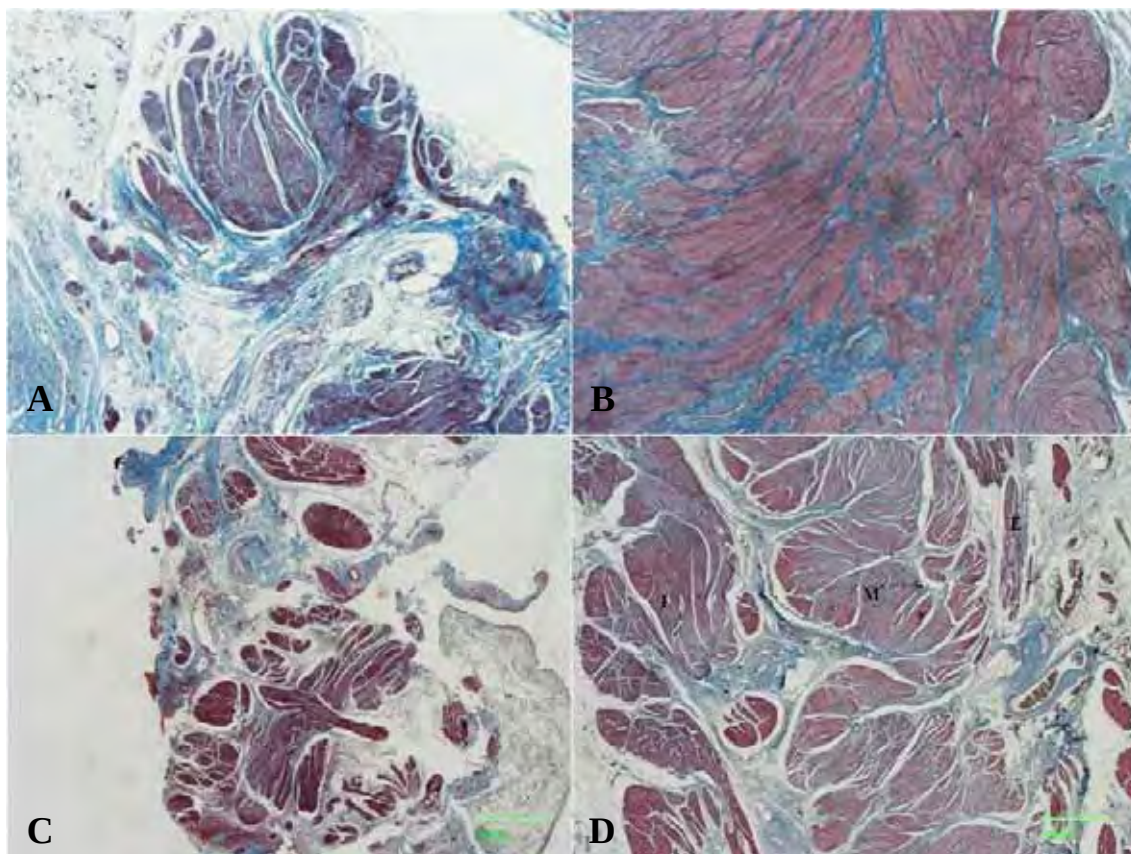


Figura 1: **A)** Fotomicrografia da região central de lesão vesical reparada com a SIS acelular (GC). Notar ausência da arquitetura vesical típica e presença de fibras musculares coradas em vermelho, dispostas em feixes de diversos calibres. (Masson, 4x). **B)** Fotomicrografia da região central da cistoplastia reparada com a SIS semeada com CMLH (GT). Notar os inúmeros fascículos musculares corados em vermelho (Masson, 12,5x). **C)** Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS acelular e a bexiga original (GC). Notar os feixes musculares de diferentes calibres, distribuídos de forma aleatória (Masson, 2x). **D)** Fotomicrografia de fragmento de transição entre a SIS semeada com CMLH e a bexiga original (GT). Notar a disposição típica das camadas longitudinal externa (E), circular média (M) e longitudinal interna (I) da túnica muscular (Masson, 2x).

**Tabela 1.** Principais alterações histológicas observadas nas amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle (GC) e Tratado (GT) após 60 dias da cistoplastia

| Critérios                                | Área Central |     |     |      | Área Periférica |      |     |      |
|------------------------------------------|--------------|-----|-----|------|-----------------|------|-----|------|
|                                          | GC           | GT  | N   | %    | GC              | GT   | N   | %    |
| Arquitetura histológica normal           | 0/5          | 5/5 | 5/5 | 100% | 5/5             | 100% | 5/5 | 100% |
| Revestimento urotelial completo          | 0/4          | 3/5 | 3/5 | 60%  | 0/5             | 0%   | 4/5 | 80%  |
| Hiperplasia urotelial                    | 3/4          | 5/5 | 5/5 | 100% | 5/5             | 100% | 0/5 | 0%   |
| Cistos de Brunn                          | 2/4          | 5/5 | 5/5 | 100% | 0/5             | 0%   | 0/5 | 0%   |
| Estratificação típica da túnica muscular | 1/3          | 5/5 | 5/5 | 100% | 1/5             | 20%  | 5/5 | 100% |
| Inflamação aguda                         | 2/5          | 3/5 | 3/5 | 60%  | 2/5             | 40%  | 3/5 | 60%  |
| Inflamação crônica                       | 5/5          | 5/5 | 5/5 | 100% | 5/5             | 100% | 5/5 | 100% |
| Resquícios da membrana                   | 3/5          | 2/5 | 2/5 | 40%  | 2/5             | 40%  | 1/5 | 20%  |

\*Teste Exato de Fisher

**Tabela 2.** Distribuição da quantidade de tecido muscular das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado

| <b>Região</b>    | <b>Controle</b> |              | <b>Tratado</b> |              | <b>Valor p</b> |
|------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|                  | <b>N</b>        | <b>Média</b> | <b>N</b>       | <b>Média</b> |                |
| <b>Central</b>   | 5/5             | 0,30 ± 0,20  | 5/5            | 0,56 ± 0,07  | 0,04           |
| <b>Transição</b> | 5/5             | 0,54 ± 0,04  | 5/5            | 0,68 ± 0,07  | 0,07           |

**Tabela 3.** Distribuição da quantidade de tecido colagenoso das amostras centrais e de transição dos animais dos grupos Controle e Tratado

| <b>Região</b>    | <b>Controle</b> |              | <b>Tratado</b> |              | <b>Valor p</b> |
|------------------|-----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
|                  | <b>N</b>        | <b>Média</b> | <b>N</b>       | <b>Média</b> |                |
| <b>Central</b>   | 5/5             | 0,70 ± 0,20  | 5/5            | 0,44 ± 0,07  | 0,04           |
| <b>Transição</b> | 5/5             | 0,46 ± 0,04  | 5/5            | 0,32 ± 0,07  | 0,07           |