



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Tadeu Ravazi Piovesana

**ENGENHARIA DE TECIDOS EM BEXIGA URINÁRIA:
MODELO EM COELHOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento em Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2020**

Tadeu Ravazi Piovesana

**ENGENHARIA DE TECIDOS EM BEXIGA URINÁRIA:
MODELO EM COELHOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Bertanha
Coorientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Piovesana, Tadeu Ravazi.

Engenharia de tecidos em bexiga urinária : modelo em coelhos / Tadeu Ravazi Piovesana. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Matheus Bertanha

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 90400003

1. Bexiga - Doenças. 2. Células-tronco. 3. Transplante de Células-Tronco.

Palavras-chave: Bexiga urinária; Células-tronco; Doenças da bexiga urinária.

Tadeu Ravazi Piovesana

Engenharia de Tecidos em Bexiga Urinária: Modelo em Coelhos

Dissertação; apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia Médica.

Orientador: Matheus Bertanha

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Matheus Bertanha

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho

Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Profa. Dra. Helga Caputo Nunes

Departamento: Lab. de Hemoglobina e Genoma/Hemocentro - UNICAMP

Botucatu, 27 de Fevereiro de 2020

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, que seja para sua honra e Glória

“Ad maiorem Dei gloriam”

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus a minha força maior.

A todos os animais que possibilitaram o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, por acreditarem em mim, me incentivarem, darem apoio e pela educação que me deram. Sem essa não estaria aqui e não seria quem eu sou.

A minha esposa, Ana Marta, por sempre me incentivar, ser meu esteio, conselheira, companheira e amiga.

Ao meu orientador, Dr. Matheus Bertanha que, com seus conselhos, cuidados e dedicação me sustentou com seus ensinamentos nessa jornada.

A Profa. Dra Elenice Deffune, pela oportunidade que me deu de levar esse sonho a frente.

A Lenize e Ana Livia, alunas do Dr. Matheus, que me auxiliaram incansavelmente nesse projeto e que sem elas nada disso seria possível.

Ao Diego, veterinário da UNIPEX, pelo auxílio e apoio com os experimentos.

A todos os funcionários da UNIPEX pelo apoio.

Epígrafe

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém
Tem gente que machuca os outros
Tem gente que não sabe amar
Mas eu sei que um dia a gente aprende
Se você quiser alguém em quem confiar
Confie em si mesmo
Quem acredita sempre alcança!”
(Renato Russo)

Resumo

Introdução: Diversas doenças congênitas ou adquiridas promovem alterações anatômicas ou funcionais, dificultando ou impossibilitando a função de reservatório da bexiga, ou até mesmo necessitando sua remoção cirúrgica. Quando as terapias conservadoras não são eficazes, algumas técnicas cirúrgicas podem ser empregadas para o aumento ou reconstrução da bexiga e por fim, o desvio urinário pode ser a única alternativa terapêutica. No entanto, todas as técnicas cirúrgicas atuais podem levar a complicações. A substituição de tecidos da bexiga por equivalentes criados em laboratório poderia melhorar o resultado da cirurgia reconstrutiva. **Objetivos:** Propor um modelo de remendo de bexiga urinária produzido com uso de veias descelularizadas e semeadas com células-tronco mesenquimais em modelo animal em coelhos. **Material e Métodos:** Foram constituídos dois grupos de 5 coelhos fêmeas não prenhas. Os dois grupos de animais foram submetidos a anestesia inalatória e foi realizada uma cirurgia para retirada de um fragmento de 1 cm² de bexiga para implantação do produto de teste. Grupo 1: Controle – foi implantado um segmento de 1cm² de veia cava de coelho descelularizada com pontos contínuos de Vicryl 7.0; Grupo 2: Experimento – foi implantado um segmento de veia cava descelularizada semeada com células tronco autólogas, também fixado por pontos cirúrgicos de Vicryl 7.0 com pontos contínuos. Para o grupo 2, foram coletadas células-tronco mesenquimais autólogas derivadas de tecido adiposo que foram cultivadas e expandidas e aplicadas em um arcabouço de veia descelularizada e mantidos por uma semana em cultura para uso *in vivo*. Os animais dos dois grupos foram mantidos em biotério por 21 dias e depois submetidos a eutanásia para avaliação histomorfológica do implante. **Resultados Parciais:** Os arcabouços de veia cava de coelho descelularizada foram capazes de manter a integridade da bexiga urinária no período de 21 dias do experimento. Em ambos os grupos observamos um intenso infiltrado de células inflamatórias no local dos enxertos. O grupo experimento que recebeu o arcabouço com células-tronco mesenquimais autólogas apresentou um processo regenerativo superior ao grupo controle, observado principalmente pela reepitelização urotelial e maturidade do povoamento da mucosa e submucosa por fibroblastos. Desta forma o enxerto com células tronco parece promover uma substituição mais adequada na região estudada.

Palavras chave: Bexiga Urinária, Doenças da Bexiga Urinária, Células-tronco, Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos.

Abstract

Background: Several congenital or acquired diseases promote anatomical or functional changes, making it difficult or impossible for the bladder reservoir function, or even requiring its surgical removal. When conservative therapies are ineffective, some surgical techniques may be used to increase or reconstruct the bladder, and ultimately, urinary diversion may be the only therapeutic alternative. However, all current surgical techniques can lead to complications. Replacement of bladder tissues with laboratory-created equivalents could improve the outcome of reconstructive surgery. Recent research involving stem cells and cell engineering points to a promising future based on regenerative and tissue replacement therapy. **Objectives:** To propose a model of urinary bladder patch produced with the use of decellularized veins and seeded with mesenchymal stem cells in an animal model in rabbits. To evaluate the biointegration of the graft implanted in the urinary bladder of rabbits after 21 days by histomorphological study of the explant. **Methods:** Two groups of 5 non-pregnant female rabbits were formed. Both groups of animals underwent inhalation anesthesia and surgery was performed to remove a 1 cm² bladder fragment for implantation of the test product. Group 1: Control - a 1cm² segment of decellularized rabbit vena cava with continuous Vicryl 7.0 stitches was implanted; Group 2: Experiment - a decellularized vena cava segment seeded with autologous stem cells was implanted, also fixed by Vicryl 7.0 surgical stitches with continuous stitches. For group 2, autologous mesenchymal stem cells derived from adipose tissue were collected and cultured and expanded and applied to a decellularized vein framework and maintained for one week in culture for *in vivo* use. The animals from both groups were kept in a *vivarium* for 21 days and then euthanized for histomorphological evaluation of the implant. **Partial Results:** Decellularized rabbit vena cava scaffolds were able to maintain urinary bladder integrity over the 21-day period of the experiment. In both groups we observed an intense infiltration of inflammatory cells at the graft site. The experimental group that received the framework with autologous mesenchymal stem cells presented a regenerative process superior to the control group, observed mainly by urothelial reepithelization and maturation of the mucosa and submucosa settlement by fibroblasts. Thus, stem cell grafting seems to promote a more adequate replacement in the studied region.

Key words: Urinary Bladder, Urinary Bladder Diseases, Stem Cells, Cell and Tissue Transplantation Based Therapy, Urothelium.

Lista de Figuras

Figura 1 – Fluxograma da Pesquisa -----	21
Figura 2 – Processo de obtenção dos arcabouços de veia cava de coelho-----	28
Figura 3 – Fotomicrografia de cultura de células-tronc em frasco de cultura-----	28
Figura 4 – Caracterização imunofenotípica das células-tronco-----	29
Figura 5 – Histogramas da caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de coelhos para CD44, CD90, CD45 e CD11b-----	29
Figura 6 – A diferenciação em tri-linhagem e perfil multipotente das células-tronco-----	30
Figura 7 – Exemplo de anestesia geral dos animais da pesquisa-----	31
Figura 8 – Implante do exerto de veia cava na bexiga do coelho com mesma técnica em ambos os grupos-----	32
Figura 9 – Aspecto macroscópico da bexiga e do segmento implantado após 21 dias ao ser retirada do animal para estudo-----	33
Figura 10 – Histologia da bexiga-----	34
Figura 11 – Fotomicrografia de lâmina em HE para o segmento do enxerto de bexiga no grupo controle após 21 dias-----	35
Figura 12 - Histologia do segmento do enxerto de bexiga no grupo experimento após 21 dias do enxerto-----	36
Figura 13 – Tecido inflamatório e reparação tecidual com a presença de células transitórias-----	36
Figura 14 – Histologia do enxerto de veia cava recelularizada com células-tronco mesenquimais evidenciando a presença de fibroblastos jovens-----	37
Figura 15 – Reepitelização tecidual, células gigantes, neovascularização, neutrófilos na volta do fio em lâmina do grupo experimento-----	37
Figura 16. Fotomicrográfias em HE. A,B e C – grupo controle evidenciando urotelização (seta), aumento 20x, 50x e 100x respectivamente; D, E e F – grupo experimento evidenciando urotelização (seta), aumento 20x, 50x e 100x respectivamente. -----	39
Figura 17 – Aspécto da bexiga “in natura” na microscopia eletrônica com magnificação de 100x evidenciando as vilosidades da mucosa vesical-----	40
Figura 18 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos de enxerto nos grupos controle e experimento-----	41

Lista de tabelas

Tabela 1. Escore da urotelização do arcabouço-----	27
Tabela 2: Análise escore da urotelização do arcabouço-----	38

Índice

<i>Resumo</i>	9
<i>Abstract</i>	10
<i>Lista de Figuras</i>	11
<i>Lista de tabelas</i>	12
<i>1. Introdução</i>	15
<i>1.1 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo</i>	15
<i>1.1.1 Engenharia Celular em Bexiga Urinária</i>	16
<i>1.1.2 Descelularização da veia</i>	17
<i>1.1.3 Urotélio</i>	18
<i>1.1.4 Cirurgia Urológica em Bexiga Urinária</i>	19
<i>2. Justificativa</i>	19
<i>3. Objetivos</i>	20
<i>3.1. Objetivo Geral</i>	20
<i>3.2. Objetivos Específicos</i>	20
<i>4. Material e Métodos</i>	20
<i>4.1 Etapa Zero – Obtenção dos Animais</i>	22
<i>4.2 Procedimentos Éticos</i>	22
<i>4.3 Etapa 1 – Obtenção de veias para arcabouço</i>	22
<i>4.4 Etapa 2 – Obtenção, expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo.</i>	23
<i>4.5 Etapa 3 – Aplicação de CTM em arcabouço de veia descelularizada para compor o grupo experimento.</i>	24
<i>4.6 Etapa 4 - Experimentação in vivo</i>	25
<i>4.7 Etapa 5 – Finalização do experimento</i>	26
<i>4.8 Etapa 6 – Avaliação histológica</i>	26
<i>4.9 Etapa 7 – Avaliação por Microscopia eletrônica de varredura</i>	27
<i>5. Resultados e Discussão</i>	27
<i>5.1 Etapa 1 - Obtenção de veias para arcabouço</i>	27
<i>5.2. Etapa 2 - Obtenção, expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo.</i>	28
<i>5.3. Etapa 3 – Aplicação de CTM em arcabouço de veia descelularizada para compor o grupo experimento.</i>	30
<i>5.4. Etapa 4 – Experimentação in vivo</i>	31
<i>5.5 Etapa 5 – Finalização do experimento</i>	32
<i>5.6. Etapa 6 – Avaliação Macroscópica</i>	33
<i>5.7 Etapa 7 – Avaliação histológica</i>	34

<i>5.7.1. Avaliação da urotelização do arcabouço</i>	38
<i>5.8 Etapa 8 – Avaliação por microscopia eletrônica de varredura</i>	40
<i>5.9. Considerações</i>	41
<i>6 . Conclusão</i>	42
<i>7 . Perspectivas</i>	42
<i>8 . Referências Bibliográficas</i>	42
<i>Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética</i>	46

1. Introdução

Diversas enfermidades podem acometer a bexiga urinária e comprometer sua função de armazenamento, tais como transtornos congênitos, câncer, trauma, infecção, inflamações crônicas, lesões iatrogênicas ou outras condições do sistema geniturinário podem levar a danos na bexiga.¹ Na impossibilidade de manutenção clínica desses doentes, a maioria acaba recebendo a indicação para a realização de procedimentos cirúrgicos reconstrutivos. Normalmente são utilizados tecidos autólogos não urológicos para a confecção de remendos ou de neobexigas (pele, segmentos intestinais ou de mucosa), tecidos ou substâncias heterólogas (colágeno bovino) ou mesmo materiais sintéticos (silicone, poliuretano, teflon).² Na prática clínico-cirúrgica tem-se dado preferência para a utilização de segmentos de intestino em substituição ou reparo da bexiga.³ No entanto, os tecidos gastrointestinais são projetados para absorver solutos específicos, enquanto o tecido da bexiga é projetado para a excreção desses mesmos solutos, além da constante produção de muco por esse tecido.⁴ Como resultado, várias complicações podem ocorrer, como: infecção recorrente, distúrbios metabólicos, urolitíase, perfuração, aumento da produção de muco e transformação neoplásica.⁵ Devido aos problemas encontrados com o uso de segmentos gastrointestinais e das demais técnicas atualmente disponíveis, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para se desenvolver soluções alternativas mais eficientes e duradouras. Nesse contexto enquadra-se a engenharia de tecidos⁶ com a utilização de células-tronco mesenquimais, que pretende trazer alternativas inovadoras com produtos baseados no conceito de medicina personalizada.

1.1 Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo

As células-tronco mesenquimais (CTM) estão presentes em maior ou menor quantidade em todos os tecidos do organismo após a fase embrionária, sendo mais facilmente obtidas dos tecidos onde são mais abundantes, preferindo-se utilizar em pesquisa as encontradas em sangue de cordão umbilical⁷ medula óssea⁸ e tecido adiposo.⁹

O tecido adiposo representa uma fonte de CTM com grande concentração celular, de fácil obtenção cirúrgica e praticamente isento de contraindicações para sua obtenção. A fração do estroma vascular do tecido adiposo se tornou foco de investigações após a comprovação de que ele é capaz de fornecer CTM multipotentes, apresentando assim vantagens potenciais para as aplicações na engenharia de tecidos.⁷

Contudo, a preparação das células em laboratório para a cultura não é idêntica. A maioria dos pesquisadores isolam as CTM obtidas de tecido adiposo através da metodologia descrita por Rodbel et al (1960), onde os tecidos são digeridos com colagenase e o fracionamento é feito por centrifugação. As células são colocadas em cultura e a população de CTM pode ser expandida.¹⁰

A Sociedade Internacional para Terapia Celular estabeleceu critérios para que uma célula possa ser definida como CTM: deve ser aderente ao frasco de cultura durante várias passagens, deve ser capaz de se diferenciar em cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo, deve expressar CD73, CD90 e CD105, não deve expressar c-kit, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α e os antígenos leucocitários humanos (HLA-DR).¹¹

O uso dessas células em Medicina Regenerativa implica em isolamento e expansão sem a perda da capacidade de pluripotência.¹² Muitos estudos têm isolado as CTM e tem controlado *in vitro* a sua diferenciação em diversos tecidos através de indução por fatores de crescimento específicos, com o objetivo de reparar tecidos lesionados.¹³

1.1.1. Engenharia Celular em Bexiga Urinária

O cultivo de CTM e a descoberta de técnicas que promovem a sua diferenciação tecidual apontam para novos domínios da medicina: a terapia celular e a engenharia de tecidos,¹⁴ evidenciando-se alto índice de plasticidade.¹⁵ As pesquisas com células-tronco avançam em territórios onde a medicina tradicional apresenta limitações, sendo conhecidos como fronteiras do conhecimento científico. Dessa forma, esses estudos podem contribuir em situações específicas para os portadores de doenças urológicas.

Materiais sintéticos têm sido amplamente utilizados para reconstrução urológica. Para o tratamento da incontinência urinária, próteses sintéticas de silicone têm sido utilizadas como esfíncter urinário artificial. O tratamento do refluxo vésico-ureteral pode ser realizado através de micropartículas de silicone e próteses penianas vem sendo amplamente utilizadas para o tratamento da impotência sexual masculina.¹⁶ Para o caso específico das afecções da bexiga urinária, a produção de bexigas artificiais feitas com silicone está sendo amplamente estudada. Entretanto, agentes artificiais utilizados em algumas situações tem potencial para produzir rejeição, uma vez que não são totalmente biocompatíveis.¹⁷

Para fins de medicina regenerativa, há vantagens claras na utilização de materiais biodegradáveis e degradáveis que podem funcionar como veículos de entrega de células e / ou fornecer os parâmetros estruturais necessários para a substituição de tecidos.¹⁸ Os

biomateriais na medicina regenerativa devem funcionar como matriz de suporte e atuar em consonância com as funções biológicas e mecânicas da estrutura nativa encontrada nos tecidos do corpo.¹⁹

Em estudos experimentais prévios, realizados pela nossa equipe, demonstrou-se que as veias cava de coelho podem ser descelularizadas, mantendo boa estruturação da matriz, sendo apta para servir de scaffold (arcabouço) para receber as células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTM).²⁰ Determinou-se também que o processo de descelularização da veia não acarreta toxicidade residual significativa ou perda das características essenciais da matriz extracelular.¹⁸ Diante dos avanços obtidos, apresentamos a continuidade do modelo experimental que visa aplicar esse arcabouço delicado e bem estabelecido para técnicas de desenvolvimento de engenharia de tecidos em bexiga urinária e estabelecer a viabilidade da estrutura constituída através de experimentos que serão melhor descritos a seguir em modelo *in vivo* (modelo animal).

1.1.2. Descelularização da veia

Atualmente, tem-se usado suportes biológicos derivados de tecido e órgãos descelularizados em estudos pré-clínicos com animais e em alguns casos com aplicação clínica definida.²¹ A utilização desses arcabouços apresenta vantagens biológicas; porém, é necessário que se faça um preparo rigoroso que garanta uma adequada eliminação dos componentes celulares para se evitar uma possível reação imunológica no momento de aplicação no receptor do novo tecido.²² Antígenos celulares xenogênicos e alogênicos são reconhecidos como estruturas estranhas ao hospedeiro e assim podem induzir uma resposta inflamatória ou uma rejeição imunomediada do tecido transplantado e conseqüentemente expor o indivíduo aos riscos da perda do enxerto, inclusive risco de óbito.²¹

O objetivo de qualquer protocolo de descelularização é remover todo o material celular e nuclear, preservando a integridade estrutural e propriedades mecânicas da matriz extracelular restante, sendo considerado um ambiente propício para o repovoamento celular. Além disso, durante o procedimento de descelularização, os agentes descelularizantes utilizados precisam ter um efeito residual mínimo, com a finalidade de não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo. Os protocolos mais completos para um processo de descelularização incluem uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas, que podem ser reforçadas conforme as características biomecânicas do tecido que se pretende descelularizar.¹⁸

Neste caso, como se pretende utilizar o arcabouço de veia cava inferior de coelho descelularizada que se caracteriza por ser um tecido bastante delicado; o protocolo elencado como mais seguro e eficaz será a reprodução da técnica previamente padronizada nos estudos já realizados,²³ com o uso de duodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS é um composto orgânico com propriedades surfactantes (aniônicas). Dada a sua estrutura, esta molécula possui propriedades anfífilas, sendo comumente utilizado na indústria de detergentes, com a finalidade de remover resíduos oleosos, mas também funciona como desnaturante de proteínas, além de outros usos.²⁴

1.1.3. Urotélio

O urotélio é o tecido epitelial responsável pela pavimentação de grande parte do trato urinário, incluindo a pelve renal, a bexiga urinária e partes da uretra.²⁵ O tecido urotelial é caracterizado como um epitélio pseudoestratificado de transição, uma vez que ocorre uma variabilidade morfológica em sua constituição, podendo ser binucleadas, apresentando células com morfologia de “medusa” ou células “guarda-chuva” e até formas mais próximas ao epitélio pavimentoso que é mais achatado, variando com o local/órgão de origem.²⁶

Observando a localização das células progenitoras, bem como explorando as condições que promovem a diferenciação ou auto-renovação, tem sido possível superar alguns dos obstáculos que limitam a expansão celular *in vitro*, sendo que em um passado recente o cultivo dessas células apresentava sucesso limitado. Acreditava-se que as células uroteliais tinham uma senescência natural que dificultava o cultivo celular. Vários protocolos foram desenvolvidos nas últimas duas décadas que melhoraram o crescimento e a expansão urotelial.²⁷⁻³⁰ Foi desenvolvido um sistema de coleta de células uroteliais que não utiliza nenhuma enzima ou soro e tem um grande potencial de expansão quando cultivadas por 8 semanas.²⁷

A pesquisa com células-tronco adultas continua sendo uma área de intenso estudo, pois seu potencial para terapia pode ser aplicável a uma miríade de doenças degenerativas, sendo que as células-tronco mesenquimais, também conhecidas como células progenitoras adultas multipotentes derivadas principalmente de tecidos com origem estromal como a medula óssea, tecido adiposo, sangue ou tecido placentário, entre outros, podem se diferenciar em vários tipos de tecido.¹⁶ Entretanto, estudos utilizando células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em modelos experimentais de bexiga urinária não são frequentes,

sendo que alguns autores vêm injetando este tipo celular em bexigas urinárias e no trato urinário para o tratamento de incontinência com resultados promissores

1.1.4. Cirurgia Urológica em Bexiga Urinária

A reconstrução da bexiga é realizada cirurgicamente em casos de perda total ou parcial do órgão como, por exemplo pós cistectomias por câncer de bexiga, iatrogenias, trauma ou qualquer situação que envolva perdas significativas de tecido vesical.²

Já a ampliação vesical tem sido usada principalmente para tratar pacientes com hiperatividade do detrusor neurogênico secundária a esclerose múltipla, lesões na medula espinhal e mielodisplasia.³⁴ Também é uma opção de tratamento para pacientes com bexiga hiperativa idiopática que falharam nas opções de tratamento de terceira linha. O objetivo principal da cistoplastia de aumento é criar um reservatório de armazenamento de baixa pressão para aumentar a capacidade e a conformidade da bexiga, proteger contra a deterioração do trato superior, melhorar a continência urinária e melhorar a qualidade de vida. Para isso, muitos tecidos humanos foram utilizados, incluindo peritônio, omento, enxertos seromusculares reversos do intestino, dura humana liofilizada, pele, bexiga preservada, pericárdio e placenta.^{31,32} Também foram utilizados materiais sintéticos, incluindo esponja de gelatina, Teflon, esponja de polivinil, papel revestido com resina, membrana de poli-amino, membrana de colágeno / galactina e Silastic. Essas fontes alternativas de aumento não são comumente usadas devido às suas altas taxas de complicações, incluindo formação óssea metaplásica, infecções recorrentes do trato urinário (ITU), formação de cálculos, contraturas vesicais e fibrose.^{33,34}

2. Justificativa

O desenvolvimento da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa objetiva melhorar as condições de vida dos pacientes que necessitam de substituição ou ampliação vesical como forma de tratamento e melhoria da qualidade de vida. Até o momento, muitos estudos pré clínicos e muito poucos estudos clínicos têm sido realizados com essa finalidade, mas até o momento não foram estabelecidos protocolos seguros e eficazes para este papel. Para isso é fundamental que sejam desenvolvidos estudos *in vitro*^{35,38} e que sejam avaliados usando modelos *in vivo*^{36,37}, para que o conhecimento adquirido em pesquisas básicas seja aplicado na prática clínica.

Este estudo avaliou o potencial da veia cava decelularizada como arcabouço para engenharia de tecidos em bexiga urinária, além de avaliar o potencial das CTM em promover a regeneração e a biointegração tecidual.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Propor um modelo de remendo de bexiga urinária produzido com uso de veias descelularizadas semeadas ou não com células-tronco mesenquimais em um modelo animal utilizando coelhos.

3.2. Objetivos Específicos

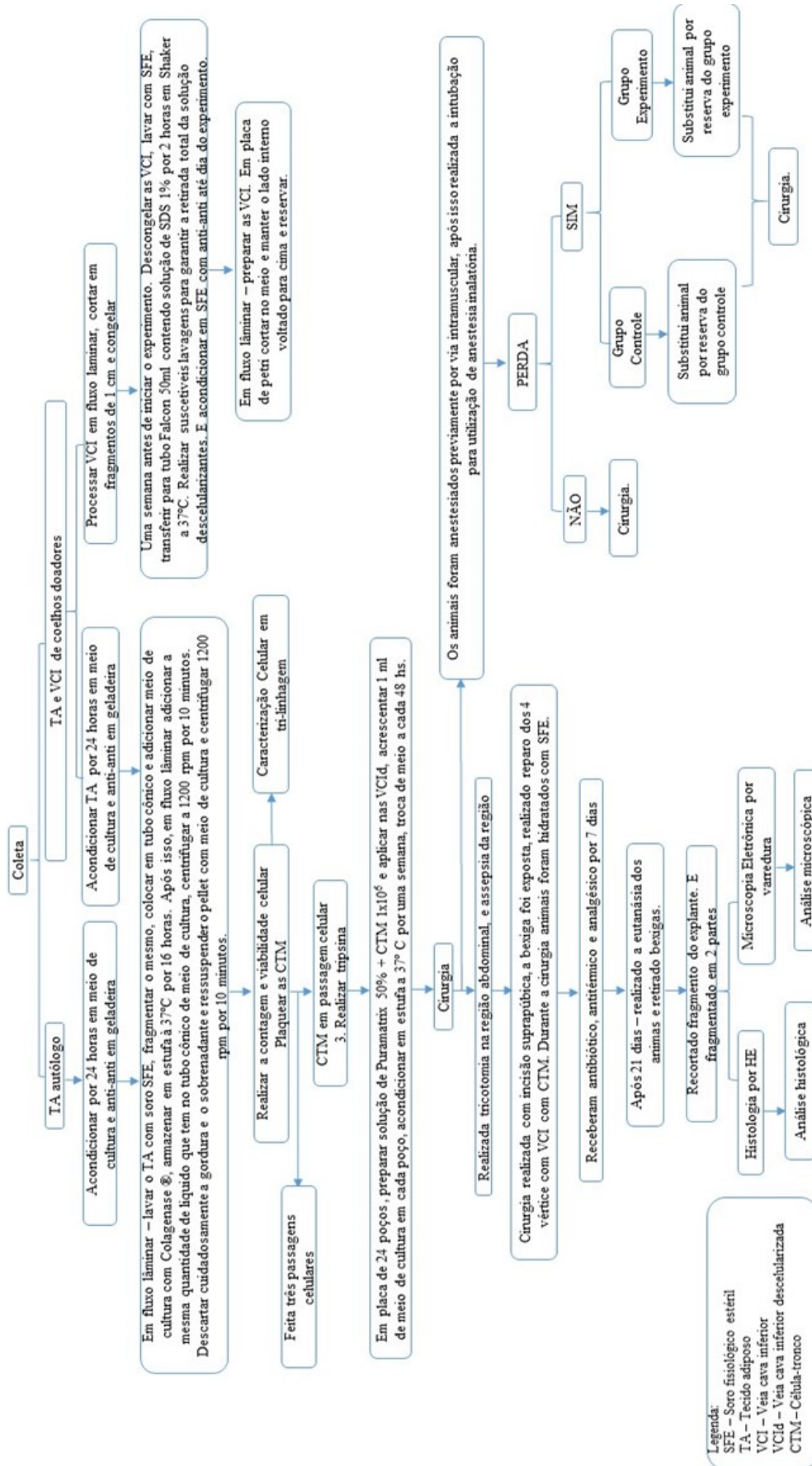
Avaliar a biointegração do enxerto implantado na bexiga urinária de coelhos através de estudo histológico do explante, após 21 dias do implante.

Realizar a análise por microscopia eletrônica de varredura dos implantes.

Quantificar a urotelização do arcabouço através de score histológico para comparação dos grupos.

4. Material e Métodos

A metodologia foi didaticamente dividida em etapas para facilitar a compreensão dos experimentos, sendo considerada a obtenção de animais a etapa zero.



4.1 Etapa Zero – Obtenção dos Animais

Foram utilizados 15 coelhos adultos, fêmeas não prenhas, da raça Nova Zelândia, linhagem Botucatu, com peso entre 2,5 e 3,5 kg, para todos os experimentos. Para qualquer manipulação cirúrgica dos animais, estes foram anestesiados por via intramuscular a associação de Ketamina (Dopalen®) 30mg/Kg de peso, cloridrato de xilazina (Anasedan®) a 2% na dose de 3 mg/kg de peso e Acepromazina (Apramazin®) a 0,2% na dose de 0,1mg/Kg de peso. Para os 10 animais que foram utilizados nos grupos experimentais foi realizada a intubação orotraqueal, ventilação mecânica e anestesia inalatória com Isoflurano (Isoforine®) 1mg/ml controlados clinicamente pelo veterinário responsável pela Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX). Após o término dos procedimentos, os animais utilizados para coleta de veias e experimentos pré-teste foram eutanasiados com injeção intravenosa em dose letal de pentobarbital 150mg/kg.

4.2 Procedimentos Éticos

O projeto foi elaborado de maneira a respeitar o acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética Local antes do início do experimento com o protocolo CEUA 1298/2019 (Anexo 1)

4.3 Etapa 1 – Obtenção de veias para arcabouço

A obtenção das veias para o banco de veias foi realizada através da coleta cirúrgica de 5 animais com peso entre 2,5 e 3,5 kg, sendo estes utilizadas para compor o banco de veias para uso posterior nos experimentos *in vivo*. Para obtenção das veias, o abdome do animal foi tricotomizado, realizada antisepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) e todo o procedimento seguiu rigorosa técnica.

As veias foram coletadas através de uma laparotomia xifopúbica e dissecação delicada da veia cava desde o seu segmento mais distal até a veia renal mais baixa. As tributárias foram isoladas e seccionadas sem ligadura para não comprometer os resultados da descclularização. Por fim, as veias foram lavadas interna e externamente com soro fisiológico 0,9% e heparina não fracionada 1000UI/100ml para retirada do máximo de sangue residual, acondicionadas em tubo cônico estéril 50ml contendo PBS e transportadas para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de

Botucatu - UNESP (LEC). Em câmara de fluxo laminar, ambiente estéril, as veias foram, então, separadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento (3 fragmentos para cada unidade de veia cava coletada) para serem submetidas à descclularização, isto é, a remoção das células e dos antígenos HLA dos doadores. O protocolo de descclularização seguiu a técnica pré-estabelecida no laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu, com doudecil sulfato de sódio (SDS) 1% em agitação contínua por 2 horas (em Shaker News Brunswick Scientific® com temperatura controlada em 37°C) sendo estabelecido intervalo máximo de 2 dias entre a coleta e a descclularização.¹⁸ Os fragmentos foram acondicionados e conservados em geladeira à 4°C em solução estéril contendo antibiótico e antifúngico.

4.4 Etapa 2 – Obtenção, expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo.

Para obtenção de tecido adiposo autólogo, foram utilizados 5 coelhos que foram mantidos vivos após a coleta para posterior implantação dos arcabouços celularizados no momento do experimento propriamente dito (de forma autóloga). Simplificadamente, a coleta foi da seguinte maneira: o animal foi submetido a anestesia conforme descrito anteriormente, a área interescapular foi submetida à tricotomia e antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I). Os procedimentos foram realizados seguindo rigorosa técnica de assepsia.

Foi realizada pequena incisão longitudinal de 2cm de comprimento, na região dorsal (interescapular) do coelho, com lâmina fria número 20 e, por dissecação, foi coletado pequeno fragmento de 2 gramas de gordura do coxim gorduroso interescapular.

Após a coleta, o tecido adiposo foi colocado em tubo cônico de 50ml com tampão HEPES e transportado para o LEC, onde foi processado. No LEC, o tecido adiposo foi submetido à digestão enzimática. Esse processo sucedeu-se de fragmentação do tecido adiposo, aplicação da enzima colagenase Invitrogen® e incubação em meio de cultura suplementado com antibióticos e antifúngico (Gibco™) durante 15 horas à 37°C, em ambiente de estufa com jaqueta de água a 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após este período, a ação da enzima foi neutralizada com adição de soro fetal bovino (SFB - Gibco™) e o conteúdo foi centrifugado a 1200rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido (contendo as CTM) foi ressuspensionado em SFB e procedida nova centrifugação. O novo *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de meio de cultura (Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM- F12) retirando-se alíquota de 30uL para contagem celular em câmara de Neubauer para a verificação da viabilidade celular e

estimar o número total de células. As células obtidas foram plaqueadas em frascos de cultura de 25 cm² de área (Nunc®). O meio de cultura utilizado para o cultivo (MC) foi DMEM-F12.

As células permaneceram em estufa à 37°C, com 5% de CO² (Thermo Class 100®). O meio de cultura foi trocado a cada 48h. O monitoramento das culturas foi realizado por vigilância periódica (3x/semana) através de microscopia invertida (microscópio Axiovert 200®, Zeiss™). A partir de o momento onde observou-se confluência superior a 80% da área da placa, foi considerado o momento de realizar o aumento do número de frascos para não inibir o crescimento celular, momento este chamado de primeira passagem. As células foram destacadas do frasco de cultura com 0,25% de tripsina/1mm (Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) (Invitrogen™), contadas em câmara de Neubauer e replaqueadas em frascos de 75cm² (Nunc™). Após a terceira passagem em tripsina, as células foram utilizadas para os procedimentos do experimento de semeadura no arcabouço. As CTM foram caracterizadas como células-tronco multipotentes por manterem as características de aderência ao plástico do frasco de cultura, multiplicação, diferenciação em trilhaagem (cartilagem, gordura e osso) conforme orientação do fabricante do kit (StemPro adipogenesis, chondrogenesis, and osteogenesis kits; Invitrogen®) e fenotipicamente com a realização de testes de expressão de marcadores positivos e negativos através de citometria de fluxo para marcadores específicos de superfície celular (CD44 e CD90 positivos e CD11b e CD45 negativos – BD biosciences™). O equipamento empregado foi um citômetro de fluxo Facscalibur BD® com auxílio de *software* específico denominado Cell Quest®. Além da citometria de fluxo, foram utilizadas as técnicas de diferenciação das CTM em 3 diferentes tecidos: cartilagem, gordura e osso, para terminar os experimentos de comprovação das características específicas de células-tronco mesenquimais multipotentes.

4.5 Etapa 3 – Aplicação de CTM em arcabouço de veia descelularizada para compor o grupo experimento.

Foi constituído de 5 amostras (n=5) para o grupo experimento, de forma randomizada.

Os arcabouços de veias descelularizadas (*scaffolds*) foram seccionados longitudinalmente e colados com Puramatrix® em poços de placa de cultura, de forma que a face luminal esteve voltada para cima. Foi então aplicada uma solução de 5µL de Puramatrix® preparada com 1x10⁶ CTM, com auxílio de micropipeta. O arcabouço contendo a solução de Puramatrix® e CTM foi submetido ao estímulo de gelificação com a adição de 10 µL de meio de cultura DMEM–F12 por 30 minutos.

Comprovada a gelificação de forma visual, os poços da placa de cultura foram completados com 1 mL de meio de cultura e mantidos em cultura em ambiente de estufa por 1 semana para posterior implantação no animal.

4.6 Etapa 4 - Experimentação *in vivo*

Foi constituído de dois grupos experimentais, a saber:

Grupo 1: Controle – foi implantado um segmento de 1cm² de veia cava de coelho descelularizada (n=5) com pontos de Vicryl 7.0, contínuos, ancorados nos quatro vértices e aproximadamente 10 pontos em cada lado do enxerto.

Grupo 2: Experimento – foi implantado um segmento de veia cava descelularizada semeada com células-tronco autólogas (n=5) (conforme descrito no item 3.5), também fixado por pontos cirúrgicos de Vicryl 7.0 com pontos contínuos, ancorados pelos vértices, aproximadamente 10 pontos em cada lado do enxerto.

Para este experimento, todos os animais foram anestesiados por via intramuscular com a associação de Ketamina (Dopalen) 30mg/Kg de peso, cloridrato de xilazina (Anasedan®) a 2% na dose de 3 mg/kg de peso e Acepromazina (Apromazin®) a 0,2% na dose de 0,1mg/Kg de peso. Em seguida os coelhos foram submetidos a intubação orotraqueal, ventilação mecânica e anestesia inalatória com Isoflurano (Isoforine®) 1ml/ml controlados clinicamente pelo veterinário responsável pela UNIPEX (Unidade de Pesquisa Experimental). Foi administrado durante o procedimento cirúrgico 250ml de solução de fisiológica 0,9%. Tricotomia abdominal foi realizada antes da cirurgia, bem como assepsia e colocação de campos cirúrgicos estéreis. Uma pequena incisão longitudinal supra-púbica de 3cm de extensão foi realizada para acesso a cavidade abdominal. A bexiga urinária foi acessada por essa incisão e submetida a um dos experimentos conforme randomização prévia dos animais.

A sutura da parede abdominal se deu em 2 planos, muscular com Vicryl 2.0 com pontos contínuos e plano da pele com fio inabsorvível de Nylon 4-0 pontos simples separados. Os animais foram então transportados para o biotério de alojamento da UNIPEX e monitorados diariamente. Receberam analgesia para dor nas primeiras 48h de pós-operatório. Uma dose de analgésicos foi ministrada ao final do procedimento para complementar o alívio da dor inicial com Cloridrato de Tramadol 5mg/kg associado a Cetoprofeno 2mg/kg de peso e foi ministrado após 12 e 24h do procedimento. Em seguida, novas doses analgésicas foram administradas nos animais que apresentaram sinais de sofrimento, orientando-se pela Rabbit Grimace Scale. Foi realizada profilaxia antimicrobiana para os animais com Enrofloxacina

10mg/kg por via subcutânea por 7 dias. Foram observados os sinais clínicos de alerta para elucidação de possíveis complicações com cada animal, além de controle de hidratação. Os animais foram mantidos em condições ideais de biotério, por 21 dias, em jaulas individuais com as seguintes dimensões: largura de 45cm; profundidade de 60cm; e altura de 40cm. A cama de maravalha foi trocada regularmente. A dieta foi composta de ração peletizada e balanceada e juntamente com água estiveram a livre demanda (*ad libitum*). Os animais foram mantidos no alojamento de coelhos da UNIPEX, que apresenta luminosidade controlada (12h luz, 12h sem luz), umidade e temperatura controlados, além de exaustão do ar.

4.7 Etapa 5 – Finalização do experimento

No 21º dia pós-operatório, os 10 animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico, utilizando-se o triplo da dose de Tiopental sódico (thiopentax®) , como preconizado pelo Manual Fiocruz – Fármacos em Animais de Laboratório- portanto 90mg/kg IV, sendo o óbito verificado pela ausência de movimento respiratório (apneia); ausência de batimentos cardíacos (assistolia), preferencialmente, por meio do uso de estetoscópio, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal ou àqueles apropriados para a espécie. A confirmação da morte foi realizada por profissional qualificado para tal fim, segundo todas as Diretrizes da prática de Eutanásia do CONCEA. Após a eutanásia, foi procedida uma incisão xifo-púbica e o tecido implantado na bexiga foi coletado cirurgicamente. Dessa forma, os espécimes foram colocados em formol tamponado 10% e conduzidos ao Laboratório de Patologia desta instituição para análise histomorfológica. Através dessas análises foi observado o comportamento do tecido produzido em comparação com o tecido nativo e sua potencial diferenciação urotélio.

4.8 Etapa 6 – Avaliação histológica

Os fragmentos obtidos dos dois grupos foram processados para confecção dos blocos parafinizados. Os mesmos foram cortados em micrótomo (5µm de espessura) para confecção de lâminas histológicas.

As lâminas foram coradas para histologia padrão com hematoxilina e eosina (HE) e submetidos ao escaneamento digital para processamento das imagens. Após o escaneamento, as fotomicrografias foram analisadas visualmente em tela de computador, sob aumento de 100 vezes, considerando-se apenas o povoamento urotelial do tecido implantado. Para isso, utilizou-se uma escala de 0 a 5, como observa-se na tabela abaixo. (Tabela 1)

Tabela 1. Escore da urotelização do arcabouço

0	Ausencia de urotelização
1	Urotelização apenas das bordas do implante
2	Urotelização de até 1/3 do implante
3	Urotelização de até 2/3 do implante
4	Urotelização semicompleta do implante
5	Urotelização completa do implante

4.9 Etapa 7 – Avaliação por Microscopia eletrônica de varredura

Um fragmento de cada grupo foi seccionado e enviado para realização de microscopia eletrônica de varredura. O material coletado foi limpo rigorosamente com pincel fino; hidratado gradualmente com água destilada; limpo com solução de formol a 37% e detergente a 1:10 e deixado imerso por 7 dias com troca da solução a cada dois dias e com movimentação do frasco periodicamente para aumentar a eficiência do processo; foi lavado com água destilada até não haver mais resíduos do detergente. Foram utilizadas 5 imersões de aproximadamente 2 segundos no equipamento de ultrassom para melhorar o processo de limpeza; substituído a água por solução de Tetróxido de Ósmio 1% e deixado por 3 horas, sempre com o cuidado de que a solução sempre fosse cristalina; por fim o material foi desidratado com solução de etanol em diluições progressivas de 10, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100% por 10 minutos. O álcool 100% foi trocado três vezes, sendo que a última com intervalo menor que uma hora até ser levado para o ponto crítico.

5. Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados seguindo o mesmo esquema didático dividido em fases apresentado anteriormente.

5.1 Etapa 1 - Obtenção de veias para arcabouço

Foram obtidas veias cavas de 5 animais para obtenção dos arcabouços. Após o processamento de descclularização, amostras controle foram enviadas para histologia simples em HE para confirmação da descclularização (Fig. 2).

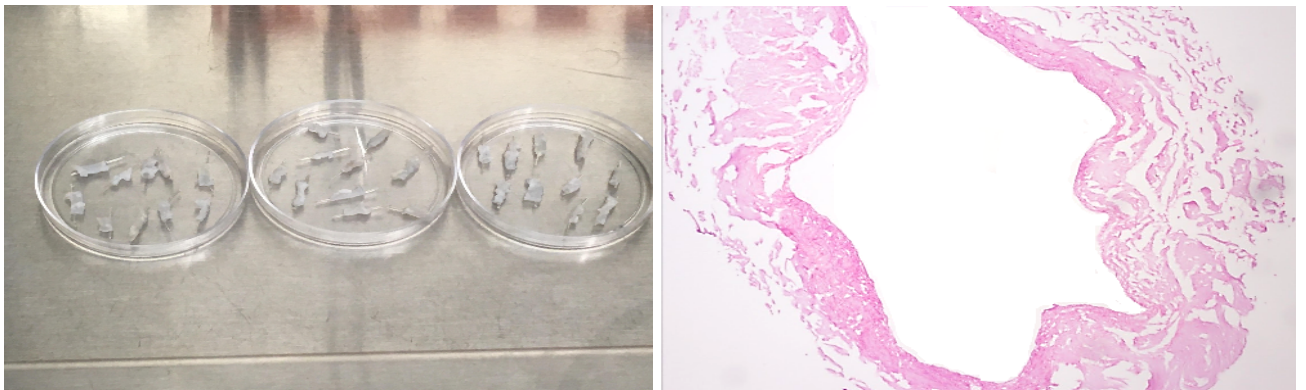


Figura 2. Processo de obtenção dos arcabouços de veia cava de coelho. A: VCI descelularizada com SDS; B: Fotomicrografia do controle de qualidade da descelularização da VCI. Fonte: Bertanha M., 2019

Conforme estudos realizados previamente, o processo de descelularização das veias cavas inferiores obtiveram a eliminação dos componentes celulares e estas não são visualizadas em HE.¹⁸

5.2. Etapa 2 - Obtenção, expansão e caracterização das CTM derivadas de tecido adiposo.

O banco de células-tronco foi constituído com a finalidade de fornecer células autólogas para os experimentos do grupo experimento. Pode-se observar o aspecto de aderência das CTM com sua morfologia clássica, em monocamada e com aspecto fibroblástico (Fig. 3)

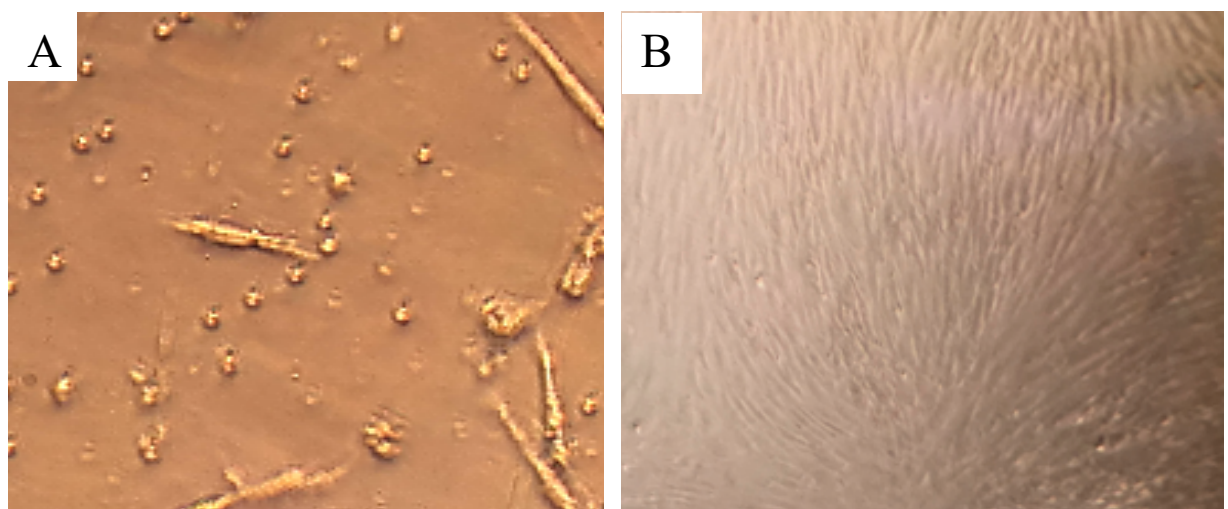


Figura 3. Fotomicrografia de cultura de células-tronco aderidas em frasco de cultura. A: Confluência < 10%; B: Confluência de 100%. Aumento em 40x. Fonte: Bertanha, M. 2019

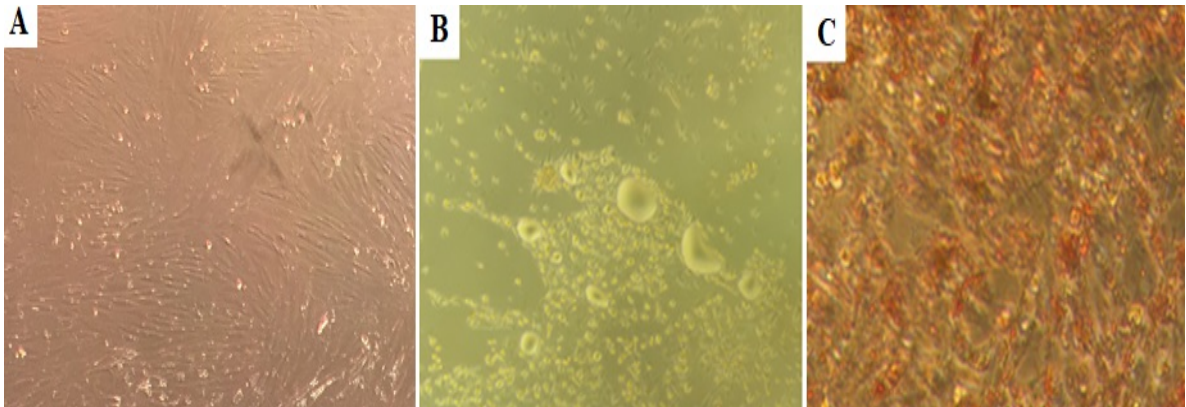


Figura 4. Em A = CTM não diferenciada e não corada; Em B = CTM diferenciada em tecido adiposo, não corada e C: Diferenciação adipogênica corada com Oil Red®. Fonte: Própria (2019)

A caracterização imunofenotípica foi realizada em todas as amostras de CTMs após 3 passagens de cultura (Fig.4)

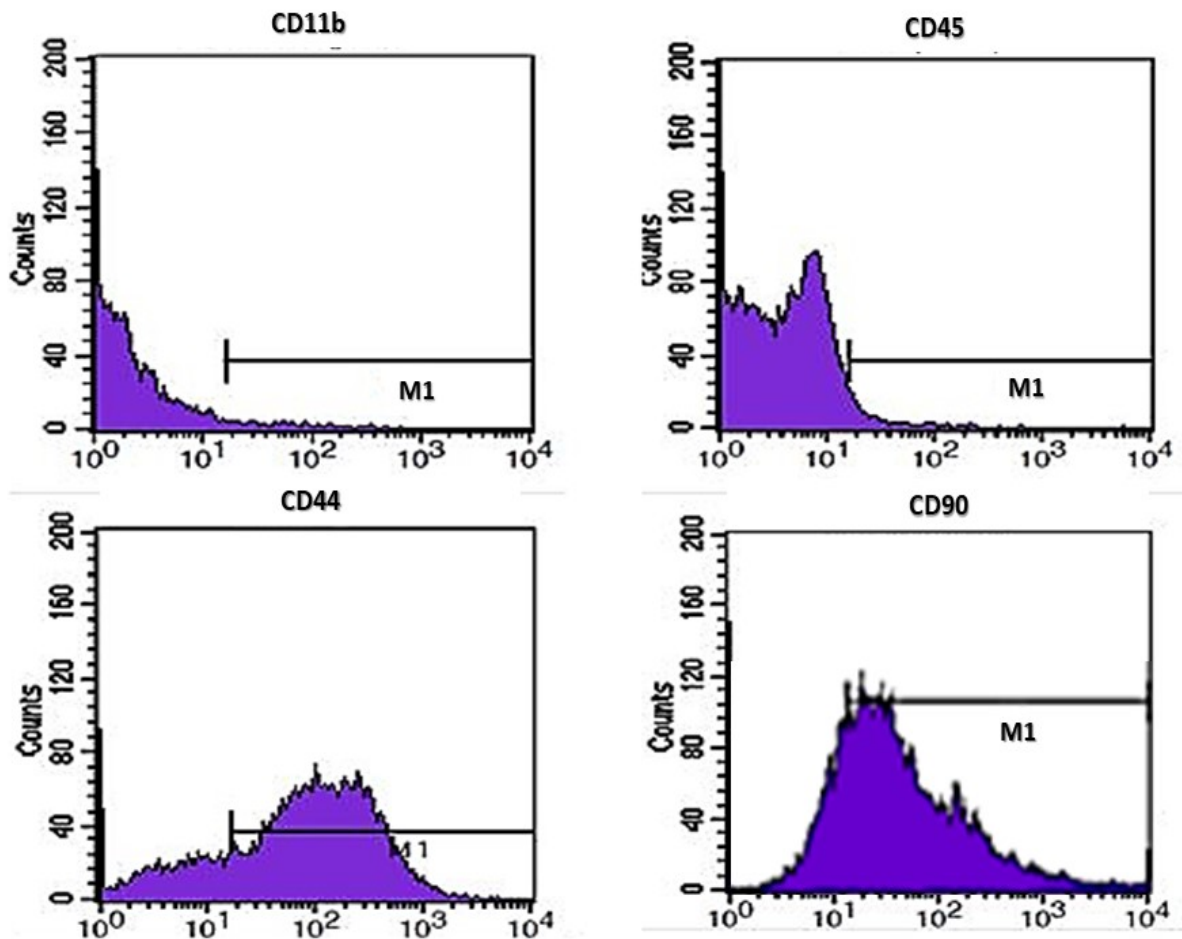


Figura 5 – Histogramas da caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de coelhos para CD11b, CD45, CD44 e CD90. Fonte Bertanha, M. 2019

Conforme estabelecido nos protocolos de cultura de células-tronco no LEC do Hemocentro do HC da FMB, as culturas obtidas foram submetidas a caracterização fenotípica

por Citometria de fluxo e positivas para CD44 (70%) e para CD90 (96%) e para os marcadores negativos, obteve-se marcação negativa para o CD45 (2%) e para o CD11b (0.8%).

A diferenciação em tri-linhagem comprovou o perfil multipotente das células-tronco. Foram utilizadas as diferenciações em osso, cartilagem e tecido adiposo com a utilização do kit Stem Pro Differentiation®, seguindo as recomendações do fabricante (Fig. 6)

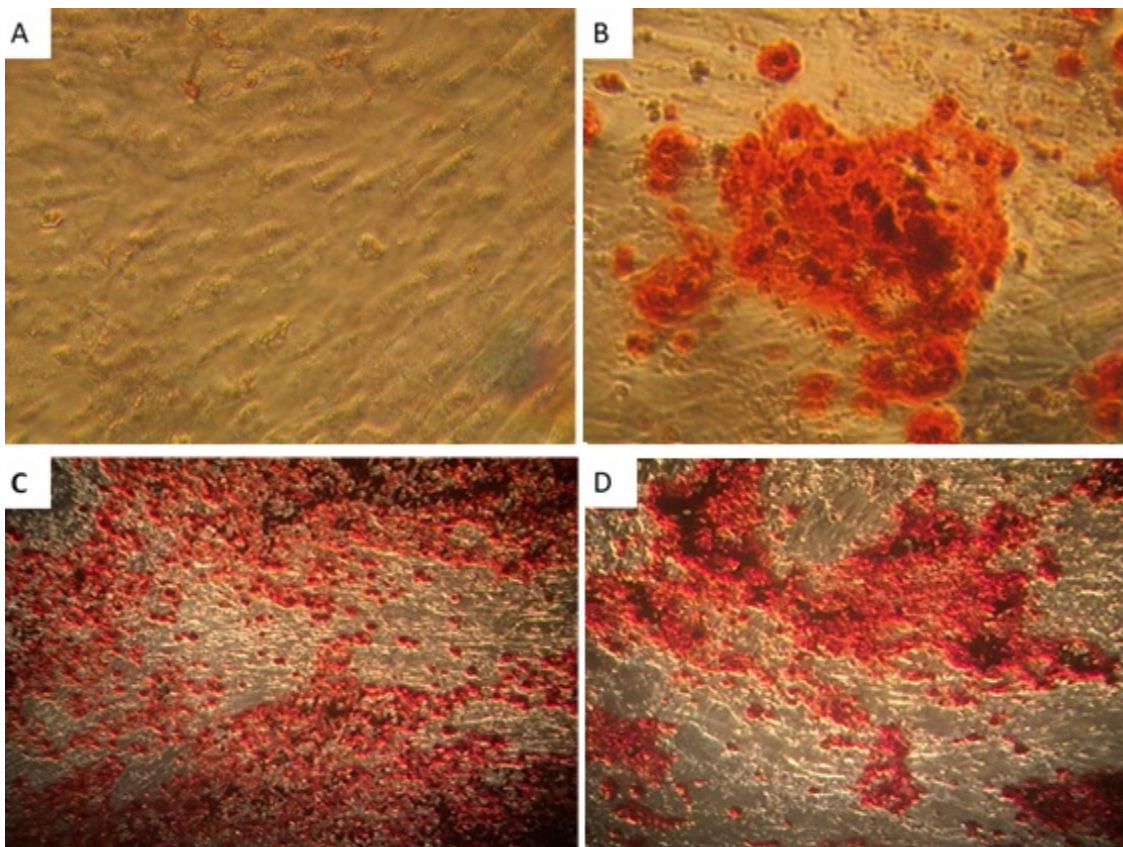


Figura 6 . A: Controle negativo (CTM não diferenciada); **B:** Diferenciação óssea, aumento 40X em trabécula. **C:** Diferenciação óssea aumento 20X e **D:** Aumento de 10X. Todas as amostras foram coradas com Alizarin Red®. Fonte: Própria (2019)

5.3. Etapa 3 – Aplicação de CTM em arcabouço de veia descelularizada para compor o grupo experimento.

Por fim, após a caracterização celular das culturas obtidas, estas foram empregadas na constituição do arcabouço de veia descelularizada com a aplicação de 1×10^6 células-tronco de tecido adiposo e mantidos em placa não aderente por 7 dias, sem intercorrências.

5.4. Etapa 4 – Experimentação *in vivo*

Os 10 animais receberam o enxerto do fragmento de veia descelularizada conforme previsto e de forma randomizada e com anestesia inalatória conforme descrito no item Materiais e Métodos (Fig. 7):

Grupo 1: Controle – foi implantado um segmento de 1cm² de veia cava de coelho descelularizada (n=5);

Grupo 2: Experimento – foi implantado um segmento de veia cava descelularizada semeada com células tronco autólogas (n=5); (Fig. 8).



Figura 7: Exemplo de anestesia geral dos animais da pesquisa Fonte: Própria (2019)

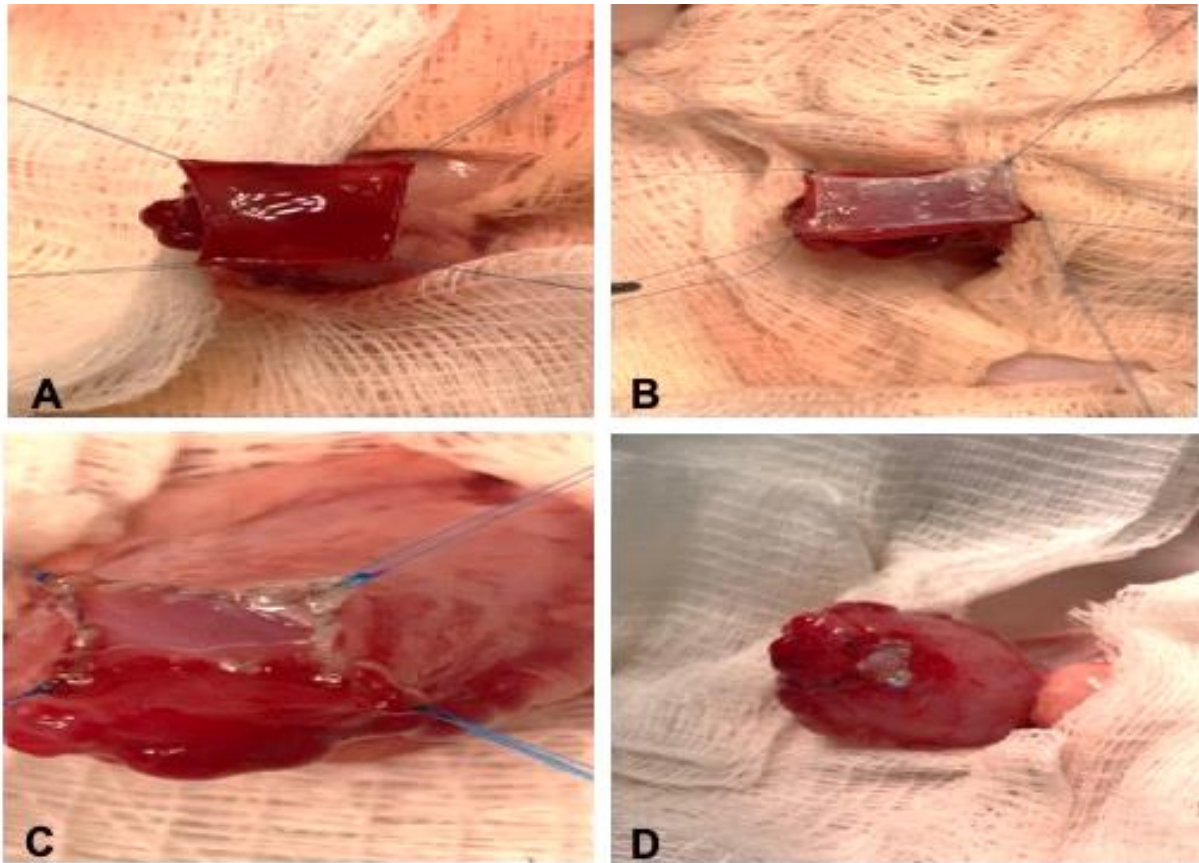


Figura 8: Implante do enxerto de veia cava na bexiga do coelho com mesma técnica em ambos os grupos. **A:** bexiga após a secção de um segmento de 1 cm², mantendo-se as bordas reparadas com pontos de ancoragem; **B:** Aspecto inicial do posicionamento do enxerto pronto para sutura; **C:** Enxerto sendo suturado na bexiga com pontos contínuos em todos os lados do enxerto; **D:** Aspecto final do enxerto implantado na bexiga. Fonte: Própria (2019)

5.5 Etapa 5 – Finalização do experimento

Após 21 dias em regime de biotério, todos os animais foram eutanasiados conforme descrito previamente e a bexiga urinária foi coletada e o fragmento implantado foi identificado, isolado e seccionada para as análises histomorfológicas (Fig. 9)

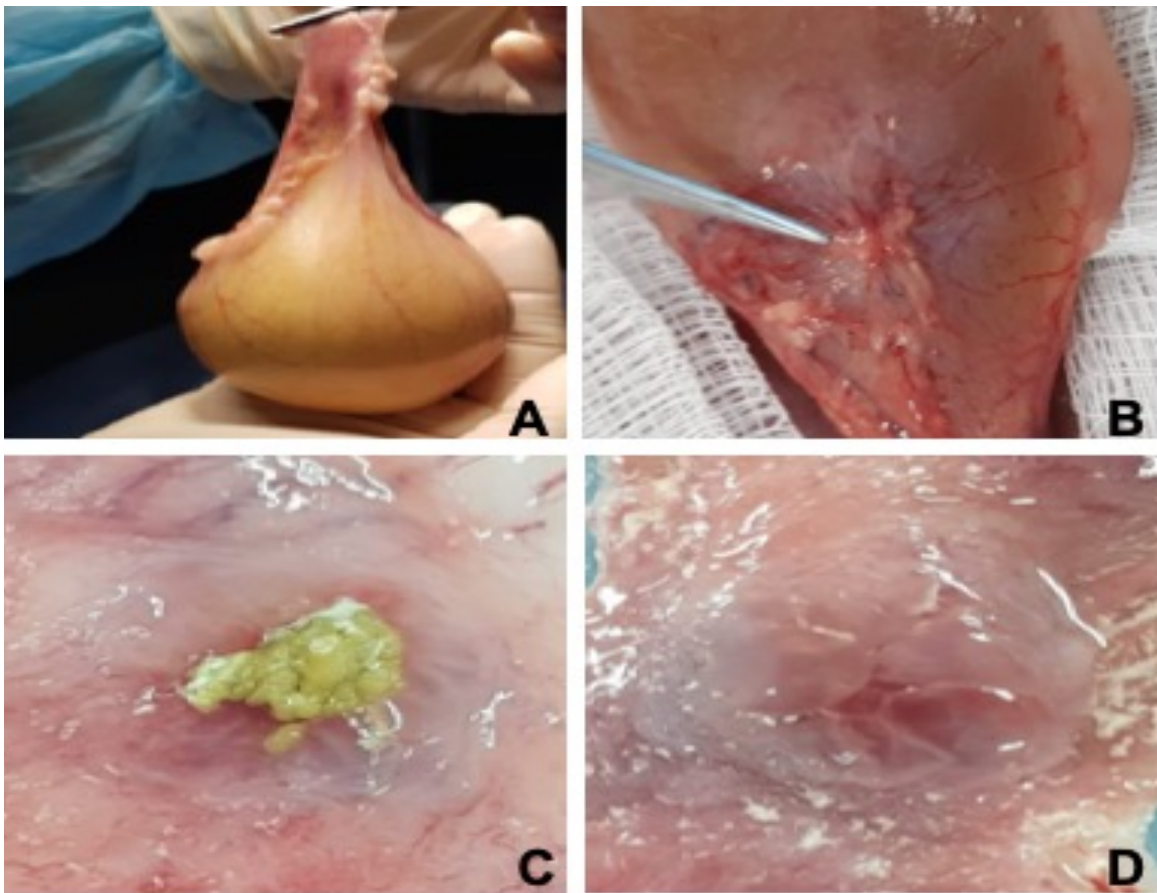


Figura 9: Aspecto macroscópico da bexiga e do segmento implantado após 21 dias ao ser retirada do animal para estudo. **A:** Bexiga inteira após retirada do animal; **B:** Aspécto fibrótico da face externa da parede vesical no local do enxerto de veia cava; **C:** Acúmulo de material cristalizado na face interna vesical no local do enxerto de veia cava; **D:** Aspécto macroscópico da face interna da bexiga na região do enxerto. Fonte: Própria (2019)

5.6. Etapa 6 – Avaliação Macroscópica

Após a finalização do experimento, a bexiga urinária explantada apresentava as seguintes características macroscópicas:

O grupo 1 (controle) apresentava boa integração tecidual em todos animais, a fibrose externa esteve presente em maior quantidade em 2 animais; internamente apresentava um tecido regenerativo (a semelhança de reação por corpo estranho) sobre o tecido implantado e também em dois animais observou-se a formação de concreções levemente aderidas à região do implante; não houve perfuração ou formação de fístulas.

Para o grupo 2 (experimento), também, observou-se que apresentava boa integração tecidual em todos animais, a fibrose externa, um pouco menos extensa, esteve presente em maior quantidade em 2 animais; internamente apresentava um tecido regenerativo (a

semelhança de reação por corpo estranho) sobre o tecido implantado e também em dois animais observou-se a formação de concreções levemente aderidas à região do implante; não houve perfuração ou formação de fístulas.

Desta forma, a análise macroscópica comparativa entre os dois grupos não apresentou diferenças significativas quanto ao processo regenerativo, inflamatório e formações de concreções.

5.7 Etapa 7 – Avaliação histológica

A bexiga normal é composta por distintas camadas celulares. A camada mais interna é o urotélio (epitélio de transição), que reveste o lúmen vesical com espessura de aproximadamente 5 a 7 células, considerado tecido de transição, que confere impermeabilidade a líquidos e íons da urina. A segunda camada é a lâmina própria da mucosa, rica em tecido conectivo frouxo. A terceira camada é composta por fibras musculares lisas e geralmente é dividida em longitudinal interna, circular média e longitudinal externa. Essas três camadas musculares normalmente se misturam e podem mudar de direção e de plano, isso otimiza a complacência e esvaziamento vesicais. Externamente está a túnica adventícia, rica em nervos e plexos autonômicos, tecido conectivo frouxo, vasos linfáticos e sanguíneos. (Fig. 10)

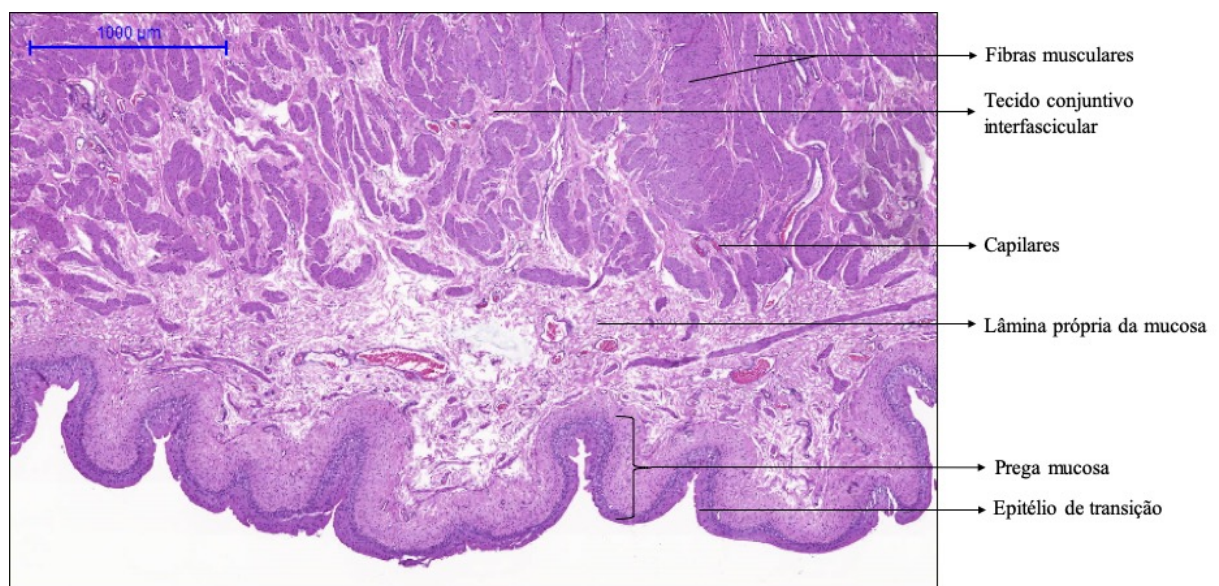


Figura 10: Histologia da bexiga (representação dos elementos das camadas histológicas da bexiga). Fonte: Própria (2019)

Para o grupo controle do experimento, observa-se a limitação do fragmento implantado pela não observação da camada muscular no centro do corte histológico (Fig. 11).

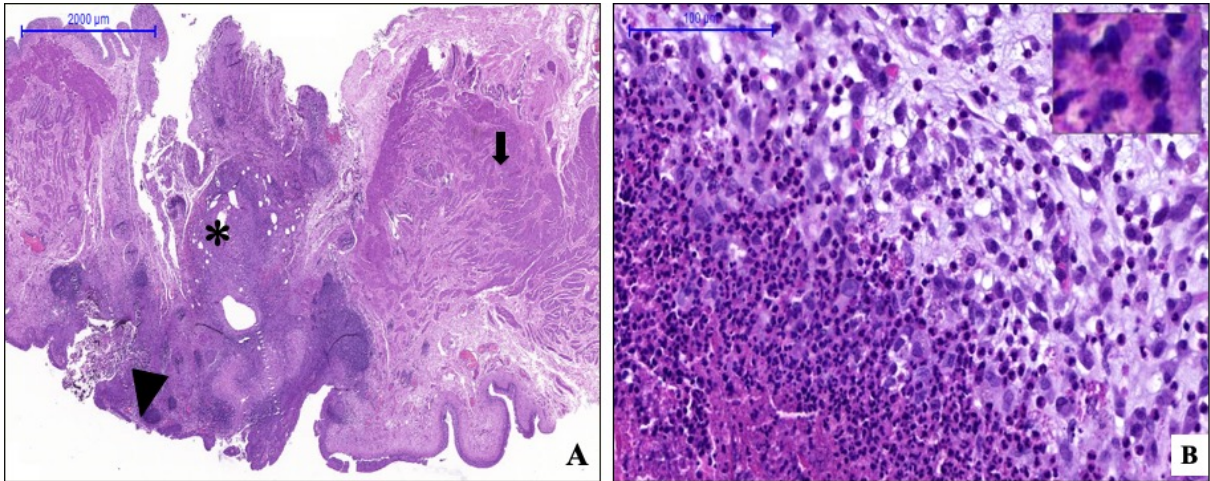


Figura 11: Fotomicrografia de lâmina em HE para o segmento do enxerto de bexiga no grupo controle após 21 dias. A: Transição do tecido normal para tecido implantado (apontada pelo asterisco). Observamos a ausência da camada muscular neste segmento; Seta: camada muscular da bexiga normal anexo ao segmento do enxerto; Ponta de Seta: limite do enxerto com o lúmen vesical (observamos ausência de células transicionais); B: infiltrado inflamatório no local do enxerto, em maior aumento (200x) no canto superior direito observa-se células inflamatórias. Fonte: Própria (2019)

Neste aspecto, observa-se neste grupo, grande infiltrado inflamatório, composto por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos caracterizados por células gigantes fagocitando os *debris* teciduais considerados estranhos, linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos. Observa-se ainda a presença de fibroblastos jovens na porção equivalente a submucosa. Na face epitelial observa-se que não ocorreu povoamento urotelial significativo.

Para o grupo experimento, também é possível observar a limitação do fragmento implantado pela não observação da camada muscular no centro do corte histológico (Fig. 12).

Neste aspecto, observa-se que a aplicação de células-tronco interferiu com todo o processo de reparação tecidual. Observa-se também grande infiltrado inflamatório, composto por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos caracterizados por células gigantes fagocitando os *debris* teciduais considerados estranhos, linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos (Fig. 13). Entretanto, observa-se a presença de fibroblastos mais maduros na porção equivalente a submucosa (Fig. 14). Na face epitelial observa-se que houve um povoamento urotelial bem significativo (Fig. 15). Nota-se ainda uma maior formação de capilares na região equivalente a transição mucosa/submucosa vesical.

Alguns fatores de crescimento celular são conhecidos e poderiam ser utilizados para obtenção de músculo liso (como BMP4), e urotélio (VEGF, FGF-7, FGF-10). Esses fatores podem ser utilizados com esta finalidade, porém, não existe um consenso bem estabelecido de

qual seria o melhor modelo para essa diferenciação celular.³⁹ A diferenciação urotelial é um processo de sinalização biomolecular complexo, que pode, através de estímulos ligeiramente diferentes, produzir urotélio com características do tecido vesical ou mesmo uretral. No modelo proposto por esse estudo pretendíamos avaliar o comportamento das CTM sobre um arcabouço de veia descelularizada sem a adição de fatores de crescimento. Certamente novos estudos *in vitro* e *in vivo* precisam ser realizados para que um protocolo de bioengenharia produza um tecido biocompatível.⁴⁰

De qualquer forma, pudemos observar que o enxerto aplicado a bexiga, em ambos os grupos, foi capaz de interagir com o tecido nativo adjacente, sendo mais evidente o repovoamento urotelial no grupo 2 (experimento), possivelmente relacionado tanto ao potencial de diferenciação das CTM quanto por sua capacidade em promover o rearranjo inflamatório e regenerativo local.

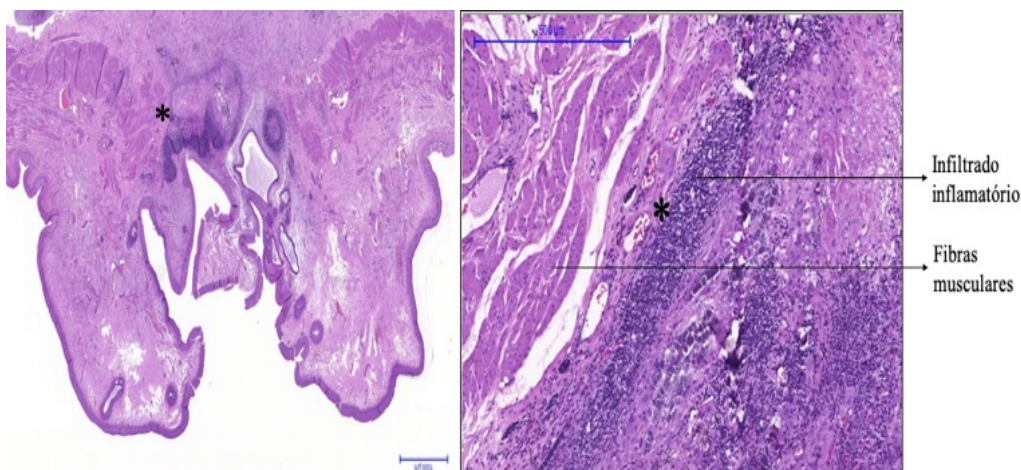


Figura 12: Histologia do segmento do enxerto de bexiga no grupo experimento após 21 dias do enxerto. *: transição do fragmento do enxerto de veia cava com o tecido vesical normal. Fonte: Própria (2019)

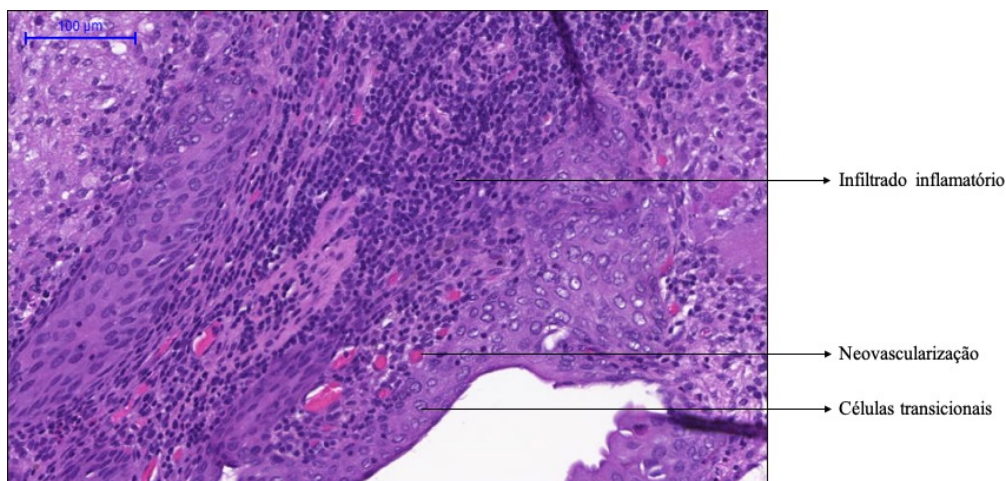


Figura 13: Tecido inflamatório e reparação tecidual com a presença de células transicionais. Fonte: Própria (2019)

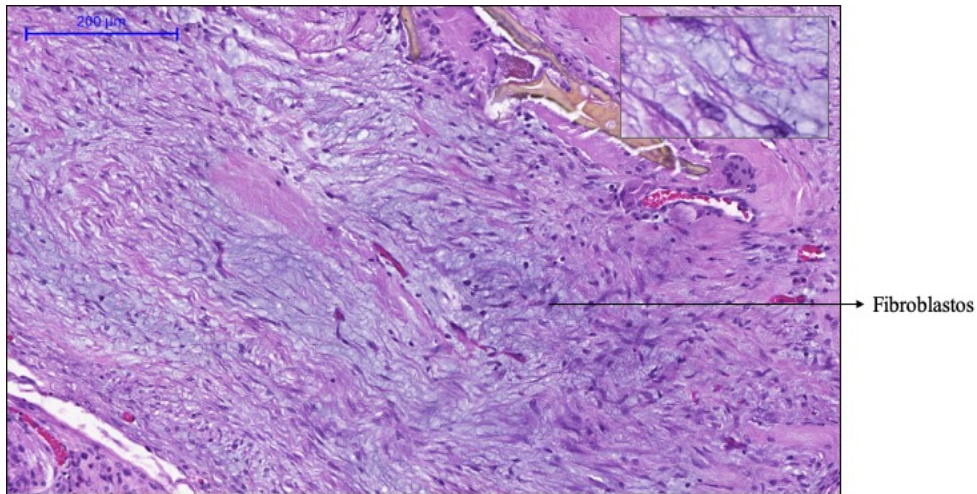


Figura 14: Histologia do enxerto de veia cava recelularizada com células-tronco mesenquimais evidenciando a presença de fibroblastos jovens. Fonte: Própria (2019)

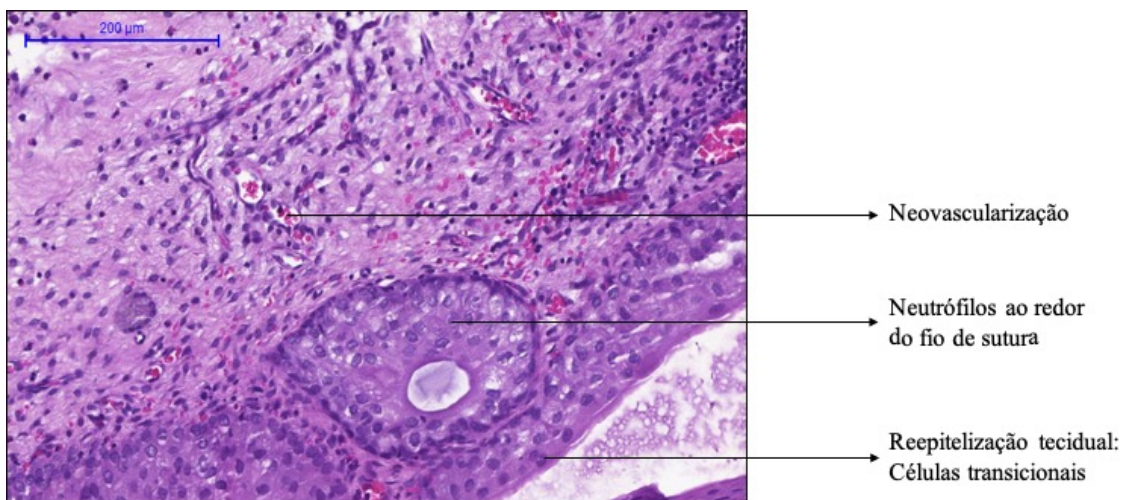


Figura 15: Reepitelização tecidual, células gigantes, neovascularização, neutrófilos na volta do fio em lâmina do grupo experimento. Fonte: Própria (2019)

5.7.1. Avaliação da urotelização do arcabouço

Após a aplicação do escore descrito na tabela 1, obtivemos os resultados descritos na tabela a seguir. (Tabela 2)

Tabela 2: Análise escore da urotelização do arcabouço

	Cortes histológicos								Mediana	p	
	1	2	3	4	5	6	7	8			
Controle											
2	-	-	-	-	0	2	-	5	5	0.11	
10	5	3	5	-	2	4	4	-			
15	5	5	5	5	4	5	5	5			
16	4	-	-	-	-	-	1	-			
19	5	-	5	-	-	5	5	4			
Experimento											
3	-	-	5	5	5	-	5	-	5		0.11
5	-	5	5	-	-	5	5	-			
7	-	-	-	-	5	5	-	-			
13	5	4	4	-	-	5	-	-			
17	5	5	5	4	5	4	5	5			
Teste estatístico para dados não paramétricos Mann-Whitney											

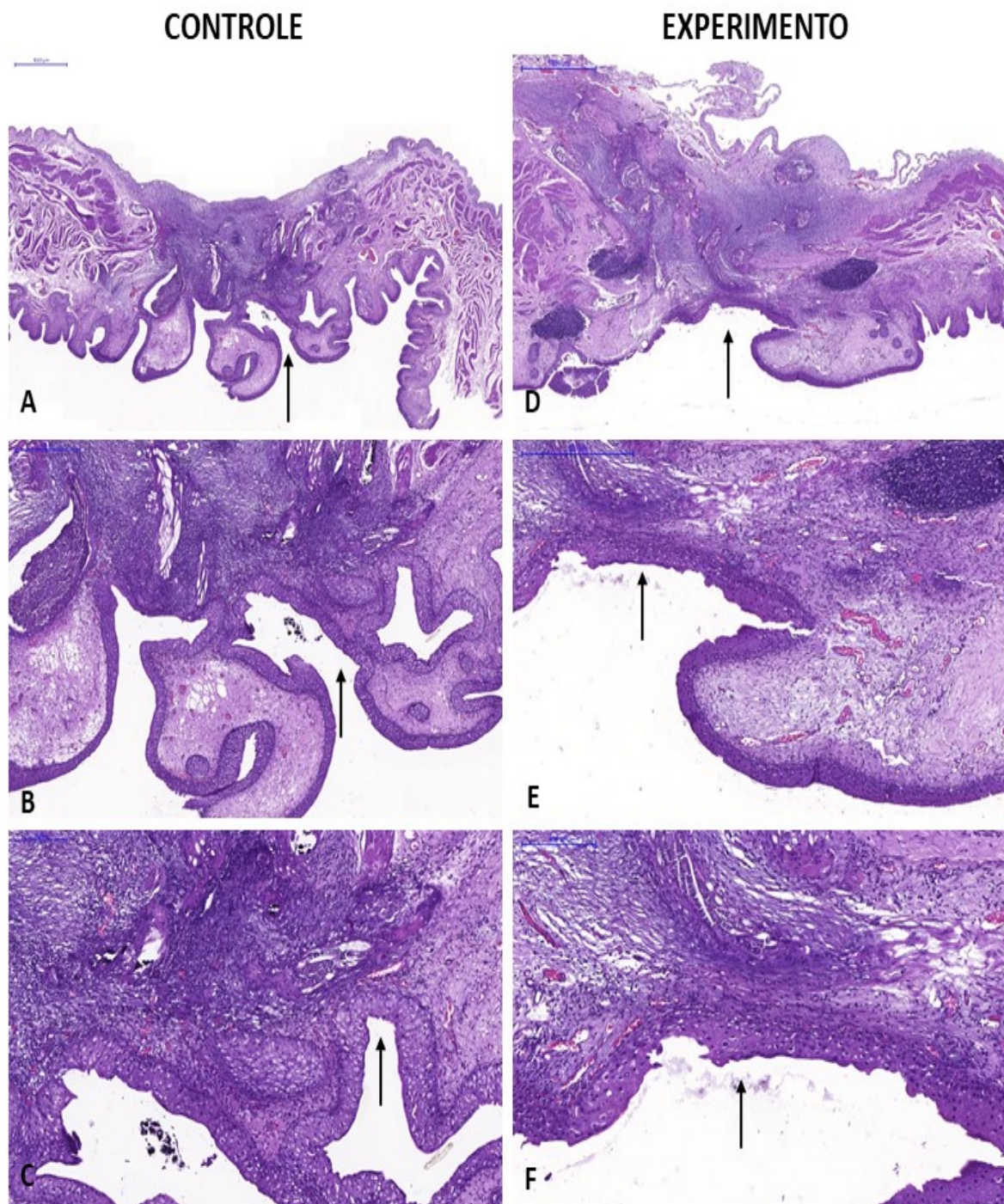


Figura 16. Fotomicrográfas em HE. **A,B e C** – grupo controle evidenciando urotelização (seta), aumento 20x, 50x e 100x respectivamente; **D, E e F** – grupo experimento evidenciando urotelização (seta), aumento 20x, 50x e 100x respectivamente. Fonte: Própria, 2019

Fatores que podem ter influenciado positivamente na urotelização dos dois grupos experimentais podem estar relacionados ao tamanho do fragmento de veia descelularizada

implantado, que por tratar-se de um remendo de 1cm² pode ter favorecido o crescimento urotelial das bordas para o centro e o tempo de seguimento do estudo permitiu resultados estatisticamente semelhantes. Dessa forma, neste segmento implantado, as CTM devem ter influenciado menos no processo de repovoamento urotelial, mas outras análises do processo regenerativo serão realizadas para que se possa ter maior clareza do papel das CTM em auxiliar com os processos regenerativos ou não.

5.8 Etapa 8 – Avaliação por microscopia eletrônica de varredura

Na microscopia eletrônica de varredura, observa-se a presença de vilosidades características da mucosa vesical no tecido normal ao redor (Fig. 15), presença de vilosidades menos desenvolvidas no grupo controle e mais desenvolvidas no grupo experimento (Fig. 16).

- Microscopia Eletrônica de Varredura

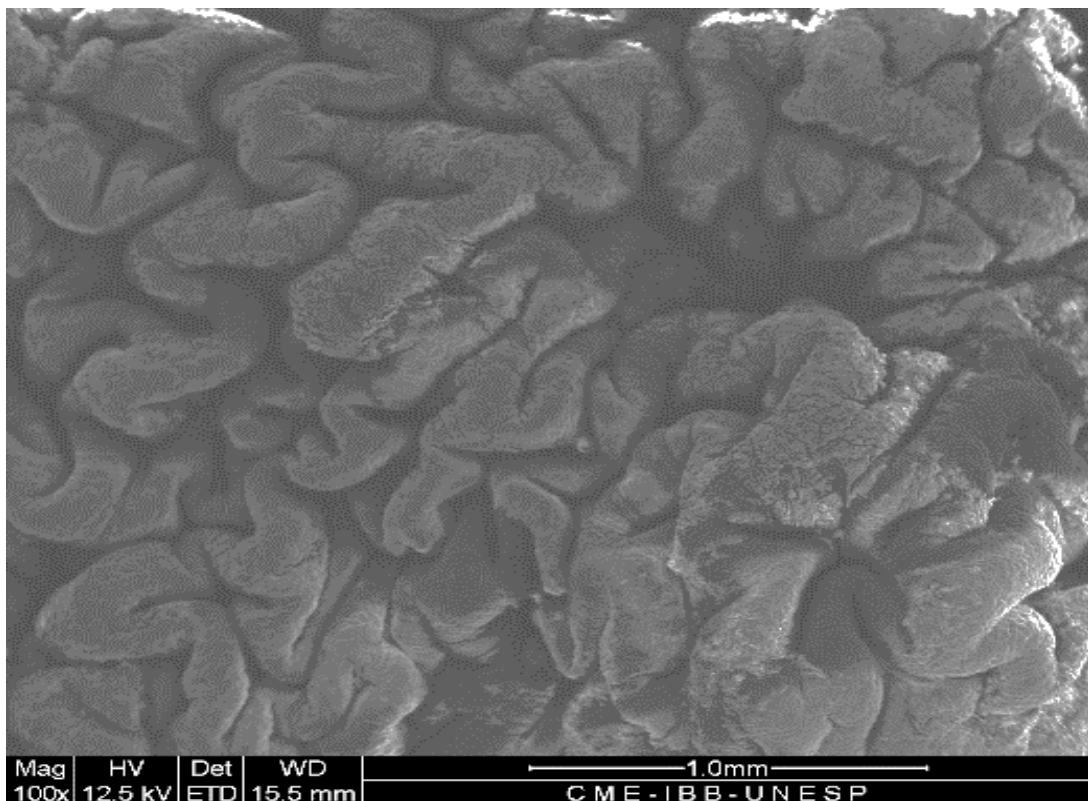


Figura 17. Aspecto da bexiga “in natura” na microscopia eletrônica com magnificação de 100x evidenciando a vilosidades da mucosa vesical. Fonte: Própria (2019)

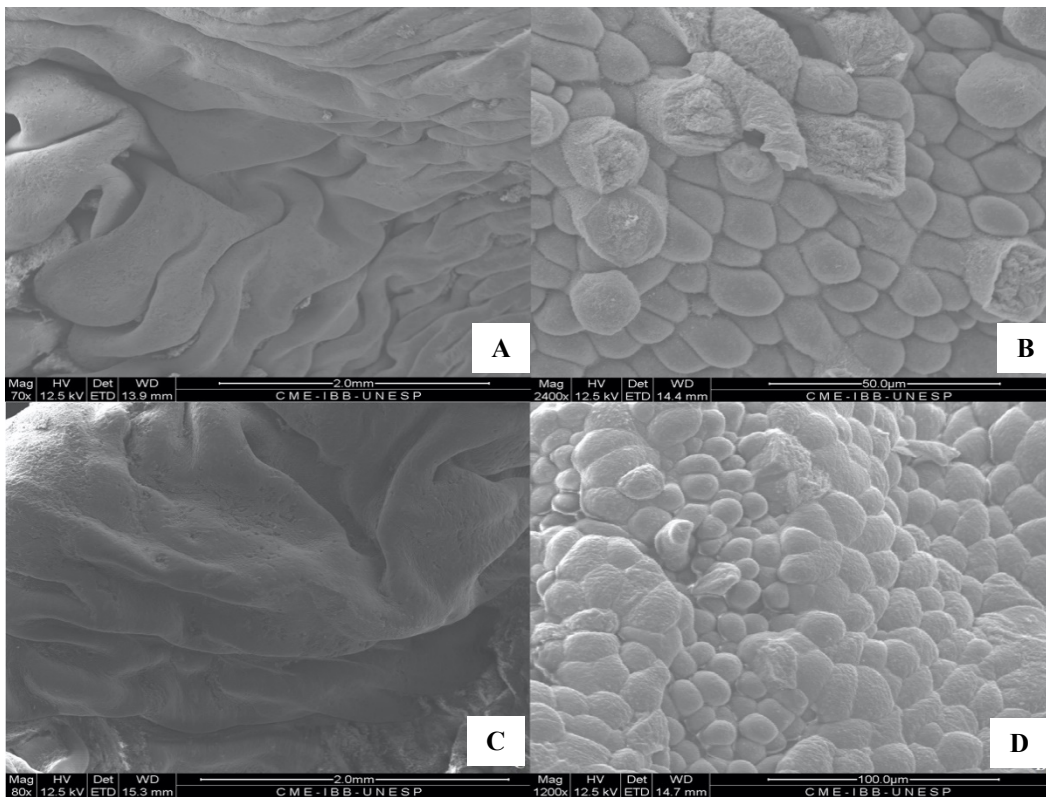


Figura 18. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos fragmentos de enxerto nos grupos controle e experimento. A: fragmento de enxerto do grupo controle com magnificação de 70x, observa-se as vilosidades da mucosa vesical; B: fragmento de enxerto do grupo controle com magnificação de 2400x, observa-se o aspecto irregular e desforme das células em contato com o lúmen vesical; C: fragmento de enxerto do grupo experimento com magnificação 80x, observa-se as vilosidades da mucosa vesical; D: fragmento de enxerto do grupo experimento com magnificação de 1200x, observa-se o padrão regular e homogêneo das células do epitélio de transição. Fonte: Própria (2019)

5.9. Considerações

Muitos materiais já foram utilizados como tecido substitutivo da bexiga urinária, porém, de forma geral os materiais sintéticos apresentam falhas mecânicas e predisõem a formação de cálculos urinários e os degradáveis evoluem com grande deposição de fibroblastos, cicatrizes e contração levando ao insucesso do enxerto.

As matrizes celulares têm sido utilizadas como base para os enxertos de bexiga urinária. A descélularização de tecidos alogênicos normalmente é a base dessa linha de pesquisa, geralmente sendo usado a própria parede vesical descélularizada. Elas podem ser utilizadas como veículo para a regeneração ou mesmo como base para recélularização com células-tronco.

Os arcabouços recelularizados com CTM tem demonstrado melhor regeneração tecidual em comparação com os arcabouços acelulares, pois não dependem somente do crescimento do tecido nativo adjacente. Além disso alguns estudos têm mostrado que a capacidade das bexigas ampliadas com arcabouços recelularizados chega a ser muito maior.

6 . Conclusão

Conclui-se que as duas formas de arcabouço de veia cava de coelho descelularizada foram capazes de manter a integridade da bexiga urinária no período de 21 dias. Entretanto, observou-se que o grupo que recebeu CTM autólogas apresentou uma aparente melhora do desenvolvimento do processo regenerativo, observado pela maturidade do povoamento da mucosa e submucosa por fibroblastos. A reepitelização urotelial foi aparentemente superior no grupo CTM autóloga, mas através da análise por escore, não foi possível obter diferença estatística. Novas avaliações dos resultados obtidos serão procedidas para aumentarmos a acurácia de futuras conclusões.

7 . Perspectivas

Novos estudos com esse modelo de arcabouço podem trazer benefícios futuros para o tratamento de pacientes com necessidade de ampliação vesical que hoje são submetidos a procedimentos que envolvem a necessidade de substituição por tecidos alternativos como intestinal e que apresentam inúmeras complicações tanto na bexiga que recebe o tecido quanto nos órgãos doadores. Algumas das complicações desse procedimento são fístulas (urinárias e/ou intestinais), produção excessiva de muco na urina, infecções do trato urinário, disfunções miccionais devido a falta de capacidade de contração do enxerto e distúrbios hidroeletrólíticos pela alteração de absorção do tecido do enxerto em contato com a urina.

8 . Referências Bibliográficas






1. Atala A. Tissue engineering in urology. Current urology reports 2001;2:83-92.
2. Atala A. New methods of bladder augmentation. BJU international 2000;85:24-34.

3. Lepper FG, Ramos TM, Trindade Filho JC, Vale FR, Padovani CR, Goissis G. Bladder augmentation in rabbits with anionic collagen membrane, with or without urotelial preservation. Cistometric and hystologic evaluation. *International Brazilian Journal of Urology*, Rio de Janeiro 2002;28:464-470.
4. Skinner DG, Lieskovsky G, Boyd S. Continent urinary diversion. *The Journal of urology* 1989;141:1323-1327.
5. Shekarriz B, Upadhyay J, Demirbilek S, Barthold JS, González R. Surgical complications of bladder augmentation: comparison between various enterocystoplasties in 133 patients. *Urology* 2000;55:123-128.
6. Zhang Y, Atala A. Bladder regeneration. *Biomaterials and Regenerative Medicine: Cambridge University Press*, 2015.
7. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T. Therapeutic Neovascularization Using Cord Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells for Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 2005;54:1823-1828.
8. Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007;11:945-957.
9. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio journal of medicine* 2005;54:132-141.
10. Rodbell M. The removal and metabolism of chylomicrons by adipose tissue in vitro. *Journal of Biological Chemistry* 1960;235:1613-1620.
11. Baksh D, Song L, Tuan R. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine* 2004;8:301-316.
12. Vigorito AC, Souza CAD. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2009.
13. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Kucia M. Bone-marrow-derived stem cells—our key to longevity? *Journal of applied genetics* 2007;48:307-319.
14. Stoltz J-F, De Isla N, Li Y, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N. Stem cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century. *Stem cells international* 2015;2015.
15. Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications: Springer*, 2011:3-8.

16. Atala A. Tissue engineering of human bladder. *British medical bulletin* 2011;97:81-104.
17. Atala A. Use of non-autologous substances in VUR and incontinence treatment. *Dialogues Pediatr Urol* 1994;17:11.
18. Bertanha M, Moroz A, Jaldin RG, Silva RA, Rinaldi JC, Golim MA, Felisbino SL, Domingues MA, Sobreira ML, Reis PP. Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds. *Experimental cell research* 2014;326:103-111.
19. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32:3233-3243.
20. Bertanha M, Sobreira ML, Bovolato ALdC, Rinaldi JdC, Reis PP, Moroz A, Moraes LNd, Deffune E. Ultrastructural analysis and residual DNA evaluation of rabbit vein scaffold. *Acta cirurgica brasileira* 2017;32:706-711.
21. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675-3683.
22. Elder BD, Eleswarapu SV, Athanasiou KA. Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs. *Biomaterials* 2009;30:3749-3756.
23. Bertanha M, Moroz A, Almeida R, Alves FC, Valério MJA, Moura R, Domingues MAC, Sobreira ML, Deffune E. Tissue-engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *Journal of vascular surgery* 2014;59:1677-1685.
24. Singer MM, Tjeerdema RS. Fate and effects of the surfactant sodium dodecyl sulfate. *Reviews of environmental contamination and toxicology*: Springer, 1993:95-149.
25. Southgate J, Varley CL, Garthwaite MA, Hinley J, Marsh F, Stahlschmidt J, Trejdosiewicz LK, Eardley I. Differentiation potential of urothelium from patients with benign bladder dysfunction. *BJU international* 2007;99:1506-1516.
26. Everaerts W, Vriens J, Owsianik G, Appendino G, Voets T, De Ridder D, Nilius B. Functional characterization of transient receptor potential channels in mouse urothelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2009;298:F692-F701.
27. Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *The Journal of urology* 1994;152:665-670.
28. Scriven S, Booth C, Thomas D, Trejdosiewicz L, Southgate J. Reconstitution of human urothelium from monolayer cultures. *The Journal of urology* 1997;158:1147-1152.

29. Liebert M, Hubbel A, Chung M, Wedemeyer G, Lomax MI, Hegeman A, Yuan TY, Brozovich M, Wheelock MJ, Grossman HB. Expression of mal is associated with urothelial differentiation in vitro: identification by differential display reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Differentiation* 1997;61:177-185.
30. Puthenveetil JA, Burger MS, Reznikoff CA. Replicative senescence in human uroepithelial cells. *Advances in Bladder Research*: Springer, 1999:83-91.
31. Neuhof H. Fascia transplantation into a visceral defect. *Surg Gynecol Obstet.* 1917;24:383-4.
32. Elbahnasy AM, Shalhav A, Hoenig DM, Figenshau R, Clayman RV. Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. *J Urol.* 1998;159:628-37.
33. Elbahnasy AM, Shalhav A, Hoenig DM, Figenshau R, Clayman RV. Bladder wall substitution with synthetic and non-intestinal organic materials. *J Urol.* 1998;159:628-37.
34. Barrett DM, Donovan MG. Prosthetic bladder augmentation and replacement. *Semin Urol.* 1984;2:167-75.
- 35 - Wang Y, et al. Bioengineered bladder patches constructed from multilayered adipose-derived stem cell sheets for bladder regeneration. *Acta biomat.* 2019;85: 131-141.
- 36 - Zhou Z, et al. Adipose-derived stem-cell-implanted poly (ϵ -caprolactone)/chitosan scaffold improves bladder regeneration in a rat model. *Regen med.* 2018;13: 331-342
- 37 - Zhe, Zhou, et al. Bladder acellular matrix grafts seeded with adipose-derived stem cells and incubated intraperitoneally promote the regeneration of bladder smooth muscle and nerve in a rat model of bladder augmentation. *Stem cells and devel.* 2016;25: 405-414.
- 38 - Bagai S, et al. Fibroblast growth factor-10 is a mitogen for urothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277: 23828-23837.
- 39 - de Graaf P, et al. Systematic review to compare urothelium differentiation with urethral epithelium differentiation in fetal development, as a basis for tissue engineering of the male urethra. *Tissue Eng Part B: Reviews.* 2017;23: 257-267.
- 40 - Tash JA, et al. Fibroblast growth factor-7 regulates stratification of the bladder urothelium. *The Journal of Urol.* 2001; 66: 2536-2541.

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética

					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012		CERTIFICADO Nº 1298/2019-CEUA	
<p> Certificamos que a proposta intitulada: "Engenharia de Tecidos em Bexiga Urinária: Modelo em Coelhos", conduzida pelo Pesquisador: Tadeu Ravazi Piovesana, sob orientação do Prof. Matheus Bertanha, registrada com o nº 1298/2019, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 28 de março de 2019. </p>					
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica				
Vigência da autorização	07/02/2020				
Espécie/Linhagem/Raça	Coelho – Nova Zelândia				
Nº de animais	18				
Idade/Peso	3 meses – 2,5 kg				
Sexo	Fêmea				
Origem	Biotério				
 Luciléia Stocco Gothardi Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		 Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP			
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1608 e 3880.1609 E-mail: Secretaria: ceua@fmb.unesp.br					